



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka

Zakład Histologii i Embriologii

PRACA DOKTORSKA

Zbigniew Krawczuk

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

Promotor pracy: prof. dr hab. Piotr Dzięgiel

Wrocław 2021

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi - Panu
Profesorowi Piotrowi Dzięgielowi za cierpliwość, wsparcie
i poświęcony czas przy pisaniu tej rozprawy.*

*Pracę dedykuję mojej Żonie i córce – za wiarę i wsparcie
w sukces projektu.*

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW.....	7
2. WSTĘP.....	10
2.1 Zakażenie WZW typu B.....	12
2.1.1. Charakterystyka wirusa HBV.....	12
2.1.1.1. Wprowadzenie.....	12
2.1.1.2. Epidemiologia.....	14
2.1.1.3. Przebieg naturalny choroby.....	15
2.1.1.3.1. Faza immunotolerancji.....	15
2.1.1.3.2. Faza klirensu immunologicznego.....	15
2.1.1.3.3. Faza integracji wirusa z genomem.....	16
2.1.1.3.4. HBeAg-ujemna faza replikacyjna.....	17
2.1.1.4. Diagnostyka zakażenia HBV.....	19
2.1.1.5. Leczenie.....	20
2.2 Zakażenie WZW typu C.....	22
2.2.1. Charakterystyka wirusa HCV.....	22
2.2.2. Epidemiologia.....	23
2.2.3. Przebieg naturalny choroby.....	24
2.2.4. Diagnostyka zakażenia HCV.....	25
2.2.5. Leczenie.....	26

2.3. Charakterystyka białek z rodziny metalotionein.....	28
2.4. Metalotioneiny w wirusowych zapaleniach wątroby.....	29
3. CELE PRACY.....	32
4. MATERIAŁY I METODY.....	34
4.1. Materiał.....	34
4.1.1 Grupa badana i kontrolna.....	34
4.2. Metody.....	35
4.2.1. Barwienie hematoksyliną i eozyną skrawków parafinowych.....	35
4.2.2. Ocena histopatologiczna.....	35
4.2.3. Reakcje immunohistochemiczne (IHC).....	36
4.2.4. Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych.....	37
4.2.5. Metoda Real - time PCR.....	38
4.2.5.1. Izolacja całkowitego RNA.....	38
4.2.5.2. Reakcje odwrotnej transkrypcji.....	39
4.2.5.3. Reakcje Real - time PCR.....	40
4.3. Analiza statystyczna.....	41
5. WYNIKI.....	43
5.1. Real - time PCR oraz reakcje IHC.....	43
5.2. Nasilenie ekspresji IHC białka MT-I/II oraz poziom transkryptu mRNA izoform MT-I oraz MT-II.....	47

5.3. Porównanie ekspresji MT-I/II oraz mRNA izoform MT-I oraz MT-IIA w grupach pacjentów zakażonych HBV i HCV oraz grupie kontrolnej.....	50
5.4. Porównanie ekspresji MT-I/II oraz mRNA izoform MT-I oraz MT-IIA w grupach uwzględniających obecność stłuszczenia i powiększenia wątroby w badaniach obrazowych.....	52
5.5. Porównanie ekspresji MT-I/II oraz mRNA izoform MT-I oraz MT-IIA w grupach uwzględniających płeć pacjentów.....	53
5.6. Korelacje ekspresji metalotioneiny I i II na poziomie genu oraz białka w materiale biopsji wątroby.....	53
5.7. Korelacje ekspresji metalotioneiny I i II na poziomie genu oraz białka w materiale biopsji wątroby z wybranymi parametrami laboratoryjnymi.....	56
6. DYSKUSJA.....	58
7. WNIOSKI.....	64
8. STRESZCZENIE.....	65
9. SUMMARY.....	68
10. PIŚMIENNICTWO.....	71

1. WYKAZ SKRÓTÓW

ALAT - Aminotransferaza alaninowa

ALP – fosfataza zasadowa

ASPAT - Aminotransferaza asparaginowa

GGTP – gamma-glutamylotranspeptydaza

GPx - peroksydaza glutationowa

GSH - glutation

GZR - grazoprewir

HAV - ang. Hepatitis A Virus, wirus zapalenia wątroby typu A

Hb - hemoglobina

HBc, HBcAg - ang. hepatitis B virus core antygen - antygen rdzeniowy wirusa zapalenia wątroby typu B

Hbe, HBeAg - ang. hepatitis B virus extractable antygen - antygen rozpuszczalny wirusa zapalenia wątroby typu B

HBs, HBsAg - ang. hepatitis B virus surface antygen - antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B

HBV - ang. Hepatitis B Virus, wirus zapalenia wątroby typu B

HCC - ang. hepatocellular carcinoma, rak wątrobowokomórkowy

HCV - ang. Hepatitis C Virus, wirus zapalenia wątroby typu C

HCVcAg - ang. HCV core antigen, antygen rdzeniowy wirusa zapalenia wątroby typu C

HDL - ang. high density lipoprotein, lipoproteina wysokiej gęstości

HDV - ang. Hepatitis D Virus, wirus zapalenia wątroby typu D

HEV - ang. Hepatitis E Virus, wirus zapalenia wątroby typu E

HGV - ang. Hepatitis G Virus, wirus zapalenia wątroby typu G

HVR - ang. hypervariable region, region hiperzmienny

IFN - interferon

IFNL3 - ang. interferon lambda 3, genotyp interferon lambda 3

IgG - immynoglobulina G

1. WYKAZ SKRÓTÓW

IgM - immynoglobulina M

IHC - immunohistochemia

IL-1 - interleukina 1

IL-6 - interleukina 6

ISG - ang. interferon stimulating genes, geny stymulowane interferonem

kcal - kilokalorie

kDa - kilodaltony

LDV - ledipaswir

mRNA - ang. messenger RNA, matrycowy kwas rybonukleinowy

MT - metalotioneina

NBT - błękit nitrotetrazolowy

nm - nanometr

NS3 - ang. nonstructural protein 3, niestrukturalne białko 3

NS5A - ang. nonstructural protein 5A, niestrukturalne białko 5A

NS5B - ang. nonstructural protein 5B, niestrukturalne białko 5B

OBV - ombitaswir

p22cr - ang. capsid protein 22, białko kapsydowe 22

PCR - ang. polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy

PIB - pibrentaswir

PLT - ang. platellet, płytki krwi

PT - protrombin

PTV - parytaprewir

RBC - ang. red blot clot, wskaźnik czerwonych krwinek

RNA - ang. rybonuclein acid, kwas rybonukleinowy

RQ PCR - ang. Real-time quantitative PCR, ilościowy PCR czasu rzeczywistego

SOD - ang. superoxide dismutase, dysmutaza ponadtlenkowa

SOF - sofosbuwir

1. WYKAZ SKRÓTÓW

TLR3 - ang. toll like receptor 3, receptor toll-podobny 3

USA - ang. United States of America, Stany Zjednoczone Ameryki

VEL - welpataswir

VOX - woksylaprewir

WBC - ang. white blot clot, wskaźnik białych krwinek

WZW - wirusowe zapalenie wątroby

2. WSTĘP

Wirusowym zapaleniem wątroby (WZW) nazywamy ostrą lub przewlekłą wirusową chorobę zakaźną wątroby u ludzi. Spośród wszystkich rodzajów WZW, uwzględniając wrota zakażenia, wyróżniamy [1]:

- wirusa zapalenia wątroby typu A (*Hepatitis A Virus*, HAV),
- wirusa zapalenia wątroby typu E (*Hepatitis E Virus*, HEV),

przenoszone drogą fekalno-oralną (pokarmową), a także:

- wirusa zapalenia wątroby typu B (*Hepatitis B Virus*, HBV),
- wirusa zapalenia wątroby typu C (*Hepatitis C Virus*, HCV),
- wirusa zapalenia wątroby typu D (*Hepatitis D Virus*, HDV),
- wirusa zapalenia wątroby typu G (*Hepatitis G Virus*, HGV)

przenoszone drogą krwiopochodną (poprzez szeroko rozumiane przerwanie ciągłości tkanek, bezpośredni kontakt z krwią lub płynami ustrojowymi – również jako zakażenia matczyńskie oraz drogą kontaktów seksualnych) [1].

Spośród wymienionych powyżej, najistotniejsze z punktu widzenia epidemiologii, są infekcje wirusami HBV i HCV- są one najbardziej rozpowszechnione i często doprowadzają do powikłań w postaci przewlekłego zapalenia wątroby, marskości i raka wątrobowo-komórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma*, HCC). Pozostałe typy, z powodu rzadkiego występowania lub niegroźnego i pozbawionego trwałych powikłań przebiegu, nie są aż tak klinicznie istotne [1, 2].

Tabela 1. Cechy biologiczne, epidemiologiczne oraz kliniczne głównych wirusów hepatotropowych. Na podstawie Juszczak J. Ostre wirusowe zapalenie wątroby. (w) Interna Szczeklika 2018 pod red. P. Gajewskiego [3].

Cecha	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
Średnica wirionu (nm)	27	42	40–100	36	27–34
Kwas nukleinowy	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA
Okres wylęgania:					
zakres (dni)	15–49	28–160	15–160	21–140	15–65
średnio (dni)	30	70–80	50	35?	40
Wirus wykrywalny w kale	tak	nie	nie	nie	tak
Wrota zakażenia					
Droga fekalno-oralna	tak	nie	nie	nie	tak
Przez krew i kontakt seksualny	rzadko	tak	tak	tak	tak
Zakażenie okołoporodowe	nie	tak	tak	tak	nie
Przez łożysko	nie	tak	tak?	tak	nie
Zakażenia rodzinne	tak	tak	tak?	tak	tak
Nosicielstwo (przewlekłe)	nie	tak	tak	tak	tak
Ryzyko:					
przewlekłego zapalenia wątroby	nie	tak	tak	tak	tak
marskości wątroby	nie	tak	tak	tak	nie
pierwotnego raka wątroby	nie	tak	tak	nie?	nie
Szczepionka	tak	tak	nie	tak ^a	tak
Występowanie w Polsce	tak ^b	tak ^b	tak ^b	tak	tak/nie ^c

^a Szczepienia anti-HBV są jednocześnie szczepieniami anti-HDV.

^b występowanie częste

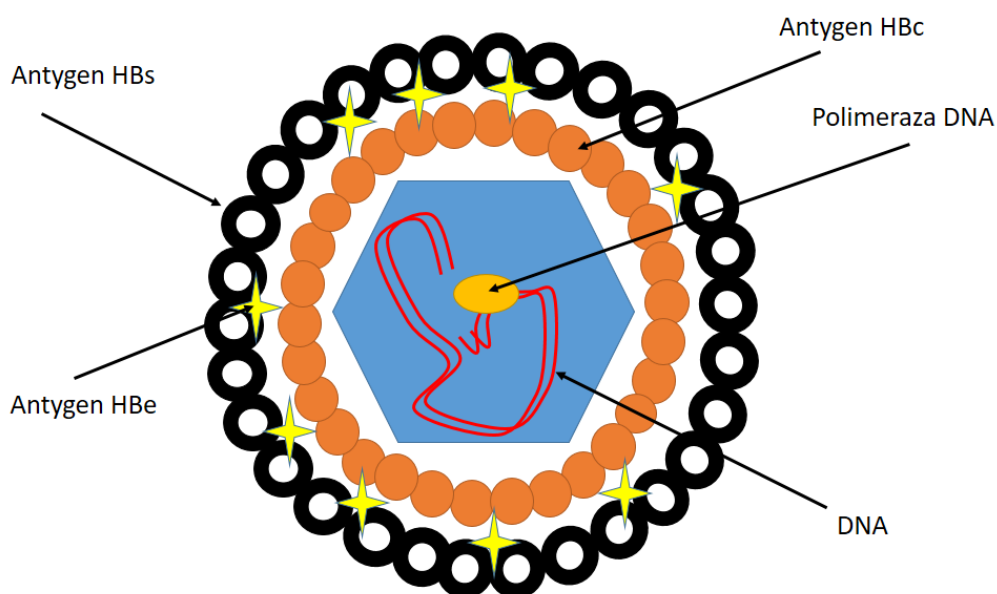
^c udowodnione zawleczenie z Azji; brak badań nad występowaniem zakażeń HEV 3 i HEV 4

2.1 Zakażenie WZW typu B

2.1.1. Charakterystyka wirusa HBV

2.1.1.1. Wprowadzenie

Wirus zapalenia wątroby typu B należy do rodziny *Hepadnaviridae* i rodzaju *Orthohepadnavirus* [1]. Ma on średnicę 42 nm. i posiada zewnętrzną lipoproteinową otoczkę (o grubości 7 nm), wewnętrzny rdzeń białkowy otaczający genom, który zbudowany jest z dwuniciowego kolistego DNA (przy czym jedna z nici jest niekompletna na długości około 10–50%), a także polimerazy DNA [1, 2]. Szczegółowa budowa oraz charakterystyka wirusa przedstawiona jest na Ryc. 1. oraz w Tabeli 1.



Rycina 1. Budowa wirusa HBV. Pojedynczy wirion ma średnicę około 42 nm. Kwas dezoksyrybonukleinowy, który znajduje się w rdzeniu wirusa razem z polimerazą DNA, otoczony jest wewnętrzną otoczką zbudowaną z antygeny HBc, a także otoczką zewnętrzną zbudowaną z antygeny HBs i HBe. Na podstawie www.mp.pl [4].

Wyróżniamy 8 genotypów wirusa (A–H). Powielenie wirusowego DNA odbywa się na matrycy RNA poprzez aktywność RNA-zależnej polimerazy DNA o cechach rewertazy – w procesie replikacji powstaje dwuniciowy kolista cccDNA (covalently closed circular DNA; 10–15 kopii w 1 hepatocycie) [1-3].

Na powierzchni wirionu HBV występuje m.in. glikoproteina „s” (ang. *surface* – powierzchnia; inaczej antygen HBs – HBsAg), a w rdzeniu (ang. *core* – rdzeń) zawierającym DNA HBV i polimerazę DNA – również antygen HBcAg. Na jedną, kompletną cząsteczkę wirusa (wirionu) zdolną do zakażenia, wydzieloną przez zainfekowany hepatocyt, z komórki również wydzielają się cząsteczki HBsAg w proporcji od 1:1000 do 1:10 000. Poza tym we krwi, płynach ustrojowych i wydzielinach osoby zainfekowanej HBV, znajduje się również antygen HBeAg, który pochodzi z cząsteczki białka wspólnej z antygenem HBcAg. Natomiast w tych płynach ustrojowych i wydzielinach nie wykrywa się antygenu HBcAg, który jest obecny tylko wewnątrz hepatocytów. Wykrywalność antygeny HBeAg oraz DNA HBV świadczy o intensywnej replikacji wirusa, a w konsekwencji wysokiej zakaźności pacjenta [1-3].

Osoba zakażona wirusem HBV syntetyzuje przeciwciała przeciwko antygenom wirusa w klasie anty-HBc (IgM oraz IgG), anty-HBe oraz anty-HBs. Kompleksy antygen-przeciwciała (przede wszystkim HBsAg–anty-HBs) wywołują powikłania infekcji WZW typu B, takie jak: guzkowe zapalenie tętnic, kłębuszkowe zapalenie nerek, czy objawy choroby posurowiczej występujące przede wszystkim w okresie prodromalnym [3].

Odpowiedź układu odpornościowego na infekcję wirusem HBV jest dość złożona. Sam wirus nie powoduje efektu cytopatycznego na komórki wątroby. W przypadku ostrego WZW typu B, które zawsze kończy się wyleczeniem, występuje silna odpowiedź cytotoksyczna limfocytów T i komórek NK. Mechanizmy odpowiedzi odpornościowej nieswoistej poprzez

uwalniane cytokiny oraz hamowanie replikacji HBV, bez wywoływania śmierci komórki również odgrywają dużą rolę w samoograniczeniu się choroby. Natomiast przejście choroby w fazę przewlekłą jest związane ze zbyt słabą odpowiedzią immunologiczną na antygeny (głównie HBcAg i HBeAg). Szczegółowe fazy procesów immunologicznych zachodzących podczas zakażenia HBV są opisane w dalszej części rozprawy.

2.1.1.2. Epidemiologia

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (ang. hepatitis B virus - HBV) jest jedną z najczęstszych infekcji wirusowych wśród ludzi. Najczęstszym efektem infekcji powodowanej przez wirusa HBV jest przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZW B), które rozpoznano u niemal 300 mln osób na całym świecie (czyli ok. 4-5% światowej populacji). Zakażenie to jest szczególnie istotnym problemem zdrowotnym w regionie Azji i Pacyfiku. W Chinach stwierdzono nosicielstwo HBV u 10% populacji. Powszechnie uważa się, że 25-40% pacjentów chorujących na przewlekłe WZW B umrze z powodu jego powikłań – marskości lub rozwijającego się na jej tle pierwotnego raka wątroby (ang. hepatocellular carcinoma - HCC). Umieralność jest zróżnicowana pod względem płci – wśród mężczyzn ocenia się ją na 50%, a wśród kobiet na 15%. [5, 6, 7]. W Polsce liczbę chorych na przewlekłe WZW B szacuje się na około 350–400 tysięcy [7].

Naturalną historię przewlekłego WZW B podzielono na trzy lub cztery etapy. Pierwszym etapem jest aktywna replikacja wirusa, w której obserwuje się jedynie niewielkie uszkodzenie wątroby (faza immunotolerancji). Następnie występuje okres aktywnego klirensu immunologicznego, któremu towarzyszy przewlekłe zapalenie wątroby. Trzecim etapem jest faza niereplikacyjna, która ostatecznie doprowadza do marskości wątroby, mogąca potencjalnie doprowadzić do rozwoju pierwotnego raka wątroby. Część chorych rozwija czwarte stadium

tzw. HBeAg-ujemne przewlekłe WZW B, charakteryzujące się wiremią i przewlekłym aktywnym zapaleniem wątroby przy nieobecności antygenu „e” HBV [7].

2.1.1.3. Przebieg naturalny choroby

2.1.1.3.1. Faza immunotolerancji

W fazie immunotolerancji nie obserwuje się objawów klinicznych zakażenia. W badaniu histopatologicznym obserwowane są zwykle łagodne i nieswoiste nieprawidłowości, które korespondują z niewielkim wzrostem aktywności aminotransferazy alaninowej (ang. alanine aminotransaminase - ALT) w surowicy. Takie zmiany wątroby często spotyka się ponadto u młodych dorosłych bezobjawowych chorych. Faza ta cechuje się małą aktywnością choroby, pomimo replikacji wirusa HBV, czego dowodem jest wykrywane wysokie stężenie wirusowego DNA w surowicy, a także wysokie stężenie antygenów HBsAg oraz HBeAg wirusa B zapalenia wątroby [7].

2.1.1.3.2. Faza klirensu immunologicznego

Faza klirensu immunologicznego jest okresem występującym pomiędzy fazą tolerancji immunologicznej a fazą niereplikacyjną. W jej trakcie zachodzi zjawisko serokonwersji - zaniku antygenu HBeAg i pojawienia się przeciwciał anti-HBeAg. Pojawienie się przeciwciał anti-HBeAg w surowicy najczęściej zbiega się w czasie z zatrzymaniem replikacji wirusa i przejściem zakażenia w fazę nieaktywną. Natomiast, w sytuacji przerwania leczenia immunosupresyjnego lub niekiedy spontanicznie bez uchwytnej przyczyny, może dojść u pacjentów z przewlekłym WZW B do progresji zmian w wątrobie, z towarzyszącą reaktywacją replikacji wirusa HBV oraz ponownym pojawieniem się wirusowego DNA oraz antygenu „e” HBV we krwi pacjentów [7].

W przebiegu choroby dość rzadko może dojść do samoistnego zaniku antygenu HBeAg. Prawdopodobieństwo takiego zaniku wzrasta wraz z wiekiem. I tak ocenia się, że do trwałego zaniku HBeAg po roku i 5 latach od początku zakażenia dochodzi do 2% i 12% u pacjentów poniżej 20 r.ż. oraz odpowiednio u 8% i 32% pacjentów w wieku pomiędzy 20-40 rokiem życia.

Faza przejściowa charakteryzuje się wzrostem aktywności choroby. Dotychczas u bezobjawowego pacjenta z przewlekłym WZW B mogą pojawiać się objawy ostrego zapalenia wątroby. Takie zaostrzenie cechuje się samoograniczającym przebiegiem, chociaż u niewielkiej części pacjentów (najczęściej z towarzyszącą marskością wątroby). Podczas zaostrzenia dochodzi do aktywacji zrazikowego zapalenia wątroby ze zmianami histologicznymi przypominającymi ostre zapalenie. Oba typy zapalenia (zrazikowe i ostre) mają zgoła odmienny obraz otrzymany z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej – w zapaleniu zrazikowym występuje ekspresja antygenu powierzchniowego (HBsAg) oraz często również antygenu rdzeniowego (HBcAg), których ekspresja nie występuje w zapaleniu ostrym [7].

2.1.1.3.3. Faza integracji wirusa z genomem

W fazie integracji wirusowego DNA z genomem hepatocytów wygasa aktywna replikacja HBV. Wirus HBV jest wtedy zintegrowany z DNA chromosomalnym komórek wątroby, które w sposób stały ekspresjonują HBsAg. Ponieważ nie występuje czynna (lub znikoma) replikacja HBV w wątrobie (poparta obserwacją niskiego miana DNA HBV w surowicy), hepatocyty nie są eliminowane przez komórki układu odpornościowego. Przebieg i rokowanie pacjentów chorujących na przewlekłe WZW B zależą od stopnia uszkodzenia miąższu wątroby w chwili ostatecznego wygaśnięcia replikacji HBV. W związku z tym u pacjentów, u których do fazy niereplikacyjnej dochodzi wolno lub z nawrotami, występuje

zwiększone ryzyko wystąpienia marskości i pierwotnego raka wątroby. Stąd rodzaj i ciężkość zmian w miększu wątroby w momencie wygasania replikacji, odgrywa kluczową rolę w rokowaniu. I tak, jeśli u pacjentów do wygaśnięcia replikacji rozwinię się marskość, zmiany nie wycofają się i ulegną wolnej i często bezobjawowej progresji. Natomiast jeśli marskość rozwinię się wcześniej – w fazie replikacyjnej – najczęściej postępuje szybko i stosunkowo wcześniej doprowadza do niewydolności wątroby i innych powikłań z rozwojem pierwotnego raka wątrobowokomórkowego. Inaczej jest w przypadku pacjentów, u których nie doszło do przemiany marskiej – u nich najczęściej cechy aktywnego zapalenia cofają się, a struktura wątroby pozostaje nienaruszona [7].

2.1.1.3.4. HBeAg-ujemna faza replikacyjna

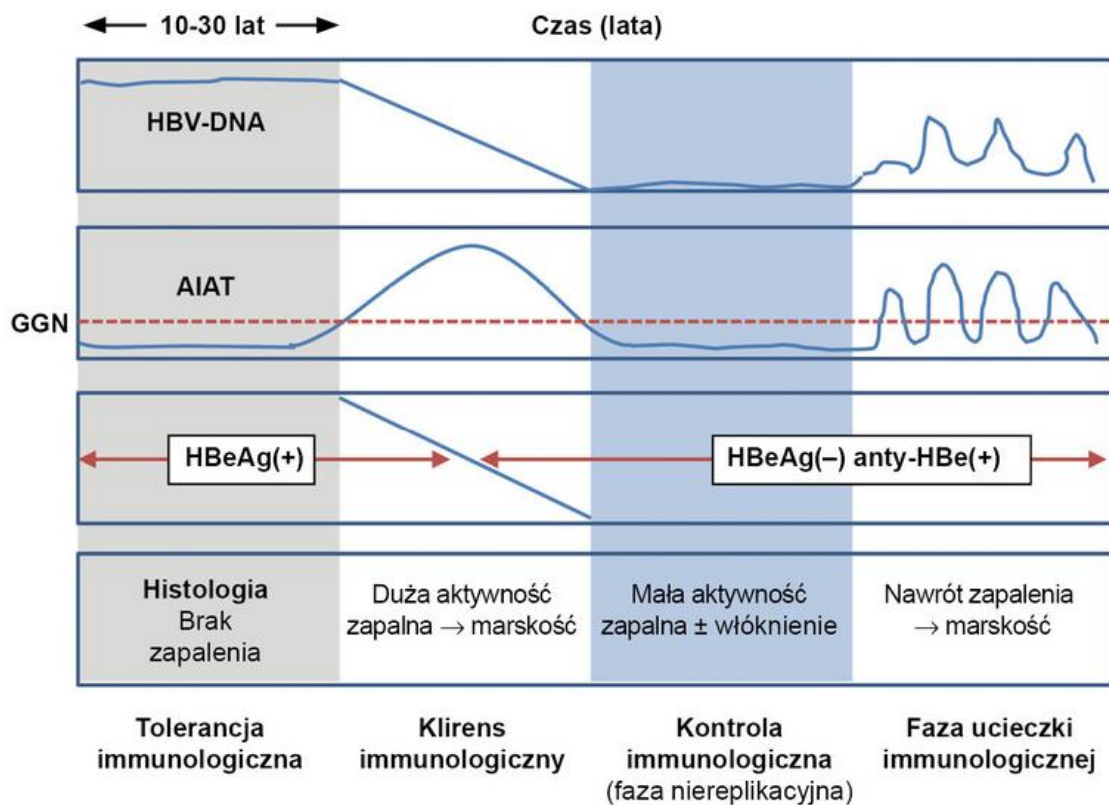
U części chorych bez cech aktywności WZW B dochodzi do reaktywacji replikacji HBV. Następuje ona samoistnie albo w wyniku immunosupresji. Faza ta ma zmienny przebieg charakteryzujący się m. in. zmianami aktywności transaminazy alaninowej oraz miana DNA HB (przekraczającym 10^4 kopii/ml), oraz trwałą nieobecnością antygenu HBeAg. W tej fazie są stwierdzane przeciwciała anty-HBe jak również mogą być one nieobecne.

Faza ta jest spowodowana pojawieniem się zmutowanej formy HBV z mutacją zmieniającą zasady guaniny na adeninę w obrębie nukleotydu 1896 regionu przedrdzeniowego. Mutacja ta powoduje tworzenie się wirionów nie posiadających HBeAg. Efektem tego jest utrzymująca się replikacja wirusa pomimo niewykrywalności HBeAg w surowicy pacjentów.

Charakterystyczny obraz histologiczny dla tej fazy odpowiada aktywnej fazie zapalenia. Rzadko występuje faza przewlekłego przetrwałego zapalenia wątroby. Natomiast, u ponad połowy pacjentów obserwuje się przewlekłe, aktywne zapalenie wątroby ze zmianami martwiczo-zapalnymi. W badaniu histologicznym preparatów barwionych metodą

hematoksylina-eozyna, cytoplazma hepatocytów obciążonych HBeAg przypomina matową szybę. Ponadto, często obserwuje się również, związane z intensywnym wytwarzaniem, wysokie stężenie HBcAg w surowicy. W badaniu immunohistochemicznym obserwuje się również ekspresję HBcAg o lokalizacji błonowej, co może potwierdzać, że to właśnie HBcAg jest celem dla cytotoksycznych limfocytów T, wywołując reakcję immunologiczną.

Liczne badania dowodzą, że w grupie pacjentów, u których doszło do rozwoju HBeAg-ujemnej fazy replikacyjnej, częściej dochodzi zarówno do marskości wątroby jak i rozwoju pierwotnego raka wątrobowokomórkowego [7].



Rycina 2. Schemat historii naturalnej przewlekłego zapalenia wątroby typu B. Na podstawie Hartleb M., Musialik I.: Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B: epidemiologia, historia naturalna i możliwości terapeutyczne, Medycyna po Dyplomie 2014, 09. [8].

2.1.1.4. Diagnostyka zakażenia HBV

Diagnostyka infekcji HBV opiera się przede wszystkim na identyfikacji czynnika etiologicznego. Można tego dokonać poprzez:

- wykonanie badań molekularnych (PCR) – w celu wykrycia DNA HBV – jest pierwszym markerem zakażenia, pojawiającym się we krwi po około 30 dniach od zakażenia;

- badania serologiczne – w zależności od czasu od początku zakażenia i fazy choroby poszukuje się w surowicy antygeny HBsAg i HBeAg oraz pośrednio HBcAg poprzez pomiar HBcrAg (tj. kompleksu HBcAg, HBeAg i p22cr), a także przeciwciała anty-HBc IgM i IgG, anty-HBe, anty-HBs w różnych wariantach (Tabela 2.).

Niewielkie ilości DNA HBV oraz DNA zintegrowane z genomem gospodarza w komórkach wątroby, mogą być wykrywalne przez wiele lat po zakażeniu.

Inne badania laboratoryjne towarzyszące zakażeniu HBV to:

- zwiększona aktywność transaminazy alaninowej (ALAT) oraz transaminazy asparaginowej (ASPAT) w osoczu krwi z przewagą transaminazy alaninowej;

- hiperbilirubinemia mieszana (podwyższone stężenie bilirubiny zarówno wolnej jak i związanej;

- niekiedy (z towarzyszącą cholestazą) występuje również podwyższona aktywność fosfatazy zasadowej (ALP) oraz gamma-glutamylotranspeptydaza (GGTP).

W przypadkach przewlekłego zapalenia wątroby w celu oceny uszkodzenia wątroby przeprowadza się również ocenę miąższu wątroby poprzez:

- nieinwazyjną ocenę włóknienia wątroby - elastografię (korelacja wyniku z obrazem histologicznym jest tym lepsza, im bardziej zaawansowane jest włóknienie);

- oraz badanie histopatologiczne wątroby - w celu oceny stopnia zaawansowania włóknienia i zapalenia wątroby. Zmiany obserwowane w biopsji wątroby to: szczególnie naciek komórek jednojądrzastych w przestrzeniach wrotnych, martwica hepatocytów oraz włóknienie [9].

Tabela 2. Interpretacja markerów serologicznych HBV [9].

Markery serologiczne	Interpretacja
HBsAg(+), HBeAg(+), anty-HBc IgM(+)	Ostre WZW B, okres wczesny
HBsAg(+), HBeAg(+), anty-HBc IgM(-)	Nosiciel HBsAg, przewlekłe zakażenie HBV, wysoka replikacja/zakaźność
HBsAg(+), HBeAg(-), anty-HBc IgM(+)	Ostre WZW B, okres późny
HBsAg(+), HBeAg(-), anty-HBc IgM(-)	Nosiciel HBsAg, przewlekłe zakażenie HBV, niska replikacja/zakaźność
HBsAg(-), anty-HBc IgM(-), anty-HBc IgG(+), anty-HBs(-)	Utajone zakażenie HBV
HBsAg(-), anty-HBc IgM(-), anty-HBc IgG(+), anty-HBs(+)	Utajone zakażenie HBV, odporność
HBsAg(-), anty-HBc IgM(-), anty-HBc IgG(-), anty-HBs(+)	Odporność poszczepienna

2.1.1.5. Leczenie

Nie istnieje leczenie przyczynowe zakażenia HBV. Celem leczenia ostrego WZW typu B jest utrzymanie prawidłowego stanu nawodnienia i odżywienia. W przypadku zakażenia istotne są:

- ograniczenie aktywności fizycznej;

- dieta wątrobowa (zwykle około 2000 kcal/d, stanowiąca: 70% łatwo przyswajalnych węglowodanów, 10–20% tłuszczów i 10% białka), którą rozszerza się zgodnie z indywidualną tolerancją. Zaleca się całkowity zakaz spożywania alkoholu do pół roku oraz ograniczenie do roku od zachorowania;

- unikanie leków o metabolizmie wątrobowym lub wywołujących cholestazę [3].

W przypadku WZW typu B o przebiegu nadoстрыm rozważa się przeszczepienie wątroby oraz stosowanie entekawiru albo dizoproksylu lub alafenamidu tenofowiru [3].

Przewlekłe WZW typu B leczone jest w zależności od stopnia niewydolności wątroby. Celami leczenia są przede wszystkim pełna supresja replikacji HBV, serokonwersja antygenu HBsAg do przeciwciał anti-HBs. Dzięki temu możliwe jest zapobieżenie rozwojowi marskości, wątroby i raka wątrobowokomórkowego. W momencie, kiedy dojdzie do rozwoju marskości celem jest regresja ewentualnie zahamowanie lub spowolnienie jej progresji. Można to osiągnąć dzięki stosowaniu interferonów alfa oraz nukleozydowych i nukleotydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (tzw. analogów nukleozydów/nukleotydów: adefowir, entekawir, lamiwudyna, dizoproksyl tenofowiru, alafenamid tenofowiru i telbivudyna [3].

2.2 Zakażenie WZW typu C

2.2.1. Charakterystyka wirusa HCV

Wirus HCV należy do rodziny *Flaviviridae*, o genomie zbudowanym z pojedynczej nici RNA o dodatniej polaryzacji. Genom RNA ma długość około 9,6 kilopar zasad (kpz) i zawiera pojedynczą otwartą ramkę odczytu kodującą poliproteinę, która jest ograniczona przez nieulegające translacji regiony 5' i 3'. Koniec 5' zawiera „wewnętrzne miejsce wejścia rybosomu” (ang. internal ribosome entry site - IRES), które jest niezbędne do replikacji wirusa. Poliproteina jest przetwarzana na trzy białka strukturalne (C, E1, E2) i siedem białek niestukturalnych (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Rdzeń HCV jest wysoce konserwatywnym białkiem, które tworzy wirusowy nukleokapsyd. E1 i E2 są wysoce glikozylowanymi białkami, które uczestniczą w wejściu do komórki gospodarza. E2 zawiera trzy regiony hiperzmiennie (HVR), znane jako HVR 1-3, które znajdują się pod ciągłą presją selekcyjną wywieraną przez układ odpornościowy gospodarza. Rolą pozostałych białek niestukturalnych jest m.in. regulowanie replikacji wirusa, sygnalizowanie niezbędne do translokacji do światła endoplazmatycznego retikulum, tworzenia całych wirionów i ich uwalniania z komórki, a także zakłócanie działania interferonu i receptorów „toll-like” (ang. toll-like receptor-3 -TLR3). Na uwagę zasługuje białko NS5B, które jest polimerazą RNA zależną od HCV RNA nie posiadającą mechanizmów korekty błędów replikacyjnych, co skutkuje wysoce podatnym na mutacje procesem replikacji. Częstość mutacji HCV generuje wysoki stopień różnorodności genetycznej wirusa HCV wewnątrz jednego gospodarza umożliwiając szybką adaptację. Ta charakterystyczna „plastyczność molekularna” HCV jest kluczową właściwością biologiczną, która umożliwia rearanżację populacji wirusów wewnątrz gospodarza pod różnymi presjami selekcyjnymi, takimi jak odpowiedź immunologiczna i terapia przeciwwirusowa, gwarantując przetrwanie wirusa. Ewolucja

molekularna HCV odgrywa kluczową rolę w przenoszeniu wirusa, progresji choroby i odpowiedzi na leczenie. Jest też powodem braku skutecznej szczepionki [9].

Po związaniu się z komórką, cząsteczki HCV są następnie internalizowane. Po wejściu genom wirusa jest uwalniany z nukleokapsydu do cytoplazmy, a następnie ulega translacji. Po amplifikacji genomu i ekspresji białka, wiriony potomne są składane i uwalniane konstytywnym szlakiem wydzielniczym [9].

2.2.2. Epidemiologia

Światowa Organizacja Zdrowia oszacowała, że w 2015 r. około 100 milionów ludzi na całym świecie uległo ekspozycji na HCV (obecność przeciwciał anti-HCV), a 71 milionów ludzi było przewlekle zakażonych wirusem HCV (częstość występowania na świecie szacowana jest na około 1%). Obszarami o najwyższej chorobowości (>2%) był region wschodniego basenu Morza Śródziemnego. Umiarkowane wskaźniki chorobowości (1-2%) odnotowano w Afryce i Europie. Natomiast niski wskaźnik chorobowości (<1%) odnotowano w obu Amerykach, Azji Południowo-Wschodniej czy regionie Zachodniego Pacyfiku [10].

Również w ww. regionach występują różnice w chorobowości HCV w poszczególnych krajach. Przykładowo, częstość występowania jest wyższa w Europie Wschodniej w porównaniu z Europą Zachodnią i jest wyższa w Afryce Zachodniej w porównaniu z Afryką Wschodnią. Egipt ma najwyższe znane rozpowszechnienie na świecie ze względu na przenoszenie choroby związane z nieodpowiednią opieką zdrowotną. Cztery kraje o największej liczbie przypadków WZW typu C na świecie to: Chiny, Pakistan, Indie i Egipt. Jest to spowodowane dużą populacją, wysoką chorobowością oraz nieodpowiednią opieką zdrowotną [10].

2.2.3. Przebieg naturalny choroby

Większość zakażeń wirusem HCV w pierwszym okresie choroby przebiega bezobjawowo, w pozostałych przypadkach objawy nie różnią się od łagodnych w swoim przebiegu zakażeń WZW typu A lub B. W okresie prodromalnym mogą pojawiać się objawy takie jak pokrzywka, zmiany skórne plamisto-grudkowe, gorączka, powiększenie węzłów chłonnych, ból stawów oraz mięśni, wymioty, nudności, bóle brzucha czy biegunka (przypominające chorobę posurowiczą), związane z pojawieniem się kompleksów immunologicznych, które ustępują po pojawieniu się żółtaczki. W badaniu fizykalnym podstawową nieprawidłowością jest mierne powiększenie wątroby [3, 11].

U 15–50% chorych następuje eliminacja wirusa HCV, przede wszystkim u pacjentów z objawowym przebiegiem ostrego WZW typu C. Jeśli przebieg ostrego WZW typu C jest niepowikłany, pełny powrót do aktywności życiowej i pracy następuje do 6 miesięcy. Pozostali pacjenci rozwijają przewlekłe zapalenie. U 5–20% pacjentów przewlekłe chorych dochodzi w ciągu 20–25 lat do rozwoju marskości wątroby. Przewlekłe WZW typu C ma charakter postępujący i nieleczone niechybnie doprowadzi do marskości wątroby. Statystycznie, do marskości dochodzi w 5–20% chorych w ciągu 20–30 lat choroby. Natomiast przy zakażeniu genotypem 3 HCV, marskość i pierwotny rak wątrobowokomórkowy rozwija się szybciej w porównaniu do innych genotypów. Kolejnym niekorzystnym rokowniczo czynnikiem jest dwukrotne podwyższenie powyżej górnej granicy normy aktywności transaminazy alaninowej. Wirus HCV posiada zdolność do wnikania i replikacji także w innych tkankach poza wątrobą: limfocytach B, komórkach ośrodkowego układu nerwowego. W przeciwieństwie do zakażenia wirusem HBV, wirusy HCV nie wbudowują się w genom komórek człowieka. Ze względu na tropizm do komórek innych niż hepatocyty, istnieje teoria

sugerująca, że w przebiegu przewlekłej infekcji HCV może dochodzić do kolejnych reinfekcji wątroby szczepami wirusa pochodzącymi z innych narządów i tkanek [12].

2.2.4. Diagnostyka zakażenia HCV

Do grup wysokiego ryzyka zakażenia HCV należą:

- pacjenci, u których przetaczano krew lub preparaty krwiopochodne przed 1993 r.,
- pacjenci często hospitalizowani, operowani,
- pracownicy służby zdrowia, straży pożarnej, policji,
- osoby stosujące narkotyki dożylnie, donosowe,
- osoby u których wykonano tatuaże.

W celu identyfikacji czynnika etiologicznego w diagnostyce zakażenia WZW C wykonuje się badania serologiczne oraz molekularne (PCR). W badaniach serologicznych podstawę stanowią badania na obecność przeciwciał anti-HCV w klasie IgG, w surowicy. Można je wykryć po upływie 4–10 tyg. od zakażenia (średnio po 7 tygodniach). W momencie występowania objawów infekcji WZW typu C przeciwciała anti-HCV są obecne u 50–70% pacjentów, po 3 miesiącach u ponad 90% chorych. Osoby z niedoborami odporności oraz osoby dializowane mogą nie wytwarzać wykrywalnej ilości przeciwciał. Oznaczanie przeciwciał anti-HCV w klasie IgM w ostrym zakażeniu HCV okazało się praktycznie nieprzydatne [11-12].

Potwierdzeniem zakażenia HCV jest oznaczenie za pomocą metody PCR HCV RNA – jest on wykrywalny już po upływie 1–3 tygodni od zakażenia. Bywa jednak stwierdzany we krwi okresowo, dlatego zaleca się powtarzanie badania w razie uzyskania wyniku ujemnego. Jeśli u pacjenta z obecnymi przeciwciałami anti-HCV występuje powtarzalnie ujemny test PCR w kierunku HCV RNA, świadczy to o eradykacji zakażenia (spontanicznej lub po leczeniu) [3, 12].

Dalsza diagnostyka oraz wyniki innych badań dodatkowych nie odbiegają od wyników pacjentów z zakażeniem WZW typu B [3].

2.2.5. Leczenie

Celem leczenia WZW typu C jest eradykacja HCV, ponieważ zmniejsza to istotnie ryzyko rozwoju marskości wątroby i pierwotnego raka wątrobowokomórkowego oraz zgonu. Pacjenci ze stwierdzonym zakażeniem powinni całkowicie unikać spożywania alkoholu (alkohol nasila uszkodzenie wątroby i przyspiesza progresję choroby do marskości). Dodatkowo nie zaleca się palenia tytoniu, gdyż nasila to włóknienie wątroby i zwiększa ryzyko wystąpienia raka wątrobowokomórkowego. Uważa się, że pewne korzyści może przynosić picie kawy. Osoby, które nie były szczepione i nie przeszły infekcji HAV i HBV powinny być zaszczepione przeciwko tym wirusom. Osoby otyłe powinny zredukować masę ciała [3, 12].

Podstawowe wskazanie do leczenia przeciwwirusowego, z uwagi na bezpieczeństwo oraz skuteczność leczenia, powinno dotyczyć wszystkich zakażonych zarówno w stadium ostrym jak i przewlekłym, niezależnie od zaawansowania włóknienia (z wyjątkiem chorych ze schyłkową niewydolnością wątroby, u których leczenie można prowadzić po przeszczepieniu wątroby, i chorych o przewidywanym krótkim czasie przeżycia). Lekami stosowanymi w leczeniu WZW typu C powinny być leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (ang. direct antiviral activity – DAA; Tabela 3.). Leki te w większości stosowane są w postaci preparatów złożonych (GLE/PIB, SOF/VEL/VOX, SOF/VEL, SOF/LDV, EBR/GZR, OBV/PTV/r), a ich skuteczność w eliminacji HCV przewyższa >97%. Innym stosowanym lekiem jest rybawiryna, będąca syntetyczną pochodną nukleozydów działającą na RNA i DNA wirusów. Stosowana jest w skojarzeniu z innymi lekami [3, 12].

Aktualnie leczenie polega na łączeniu 2–4 inhibitorów NS3, NS5A i NS5B, ewentualnie z dodaniem rybawiryny. Monoterapia (stosowanie jednego leku o bezpośrednim działaniu

przeciwwirusowym) jest niedopuszczalna z powodu rozwoju ryzyka selekcji szczepów opornych. Sposób oraz schemat leczenia zależą od:

- ryzyka interakcji leków z grupy DAA z innymi lekami przyjmowanymi przez pacjenta,
- rodzaju wcześniejszego leczenia i jego rezultat (brak odpowiedzi lub odpowiedź częściowa bądź nawrót bez uzyskania trwałej odpowiedzi wirusologicznej), szczególnie gdy zawierało inhibitory NS5A,
- stopnia upośledzenia czynności wątroby (klasa B i C w skali Childa i Pugh),
- istotnego upośledzenia czynności nerek (stadium IV i V niewydolności nerek).

Za skuteczność leczenia uznaje się nieobecność we krwi RNA HCV oraz antygenu rdzeniowego HCV (HCVcAg) po 12 tyg. od zakończenia leczenia [3, 12].

Tabela 3. Leki stosowane w leczeniu przewlekłego WZW typu C [3, 12].

Grupy leków	Mechanizm działania	Leki
leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (<i>direct acting antivirals</i> – DAA)	inhibitory NS3 (proteazy)	glekaprewir (GLE) grazoprewir (GZR) parytaprewir (PTV) woksyłaprewir (VOX)
	inhibitory NS5B (polimerazy)	dazabuwir (DSV) sofosbuwir (SOF)
	inhibitory NS5A	daklataswir (DCV) elbaswir (EBR) ledipaswir (LDV) ombitaswir (OBV) pibrentaswir (PIB) welpataswir (VEL)
Inne	rybawiryne	rybawiryne (RBV)

2.3. Charakterystyka białek z rodziny metalotionein

Metalotioneiny (MT) to wewnątrzkomórkowe białka o niskiej masie cząsteczkowej (6-7 kDa) o locus w obrębie chromosomu 16 q13. Pojedyncza cząsteczka MT składa się z 61-68 aminokwasów, w zależności od izoformy, gdzie do jednej trzeciej sekwencji białka stanowią reszty cysteiny. W strukturze białka wyróżnia się dwie domeny, C-kończową α i N-kończową β , które są połączone ze sobą dimerem lizyny. MTs są podzielone na cztery główne izoformy: MT1, MT2, MT3 i MT4. Odkryto, że co najmniej 11 genów MTs koduje białka funkcjonalne: MT-IA, MT-IB, MT-IE, MT-IF, MT-IG, MT-IH, MT-IM, MT-IX, MT-IIA, MT-III i MT-IV. Natomiast izoformy MT-IC, MT-ID, MT-II, MT-IJ, MT-IK, MT-IL i MT-IIB to niekodujące

pseudogeny o nieznanym funkcjonalności. Izoformy MT-I i MT-II występują prawie we wszystkich tkankach człowieka, MT-III jest obecna głównie w tkance nerwowej oraz komórkach nabłonkowych stercza i nerek, natomiast izoforma MT-IV jest ograniczona do nabłonka wielowarstwowego płaskiego skóry i górnych odcinków przewodu pokarmowego [13].

Charakterystyczną właściwością wszystkich białek z rodziny metalotionein (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 [13, 14]. Oprócz funkcji detoksykacyjnej, MT odpowiadają także za utrzymanie homeostazy jonów metali niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Odwracalne wiązanie jonów cynku powoduje, że MT wpływają na aktywność wielu zależnych od obecności ww. jonów, enzymów i czynników transkrypcyjnych, odpowiedzialnych za przebieg wewnątrzkomórkowych procesów takich jak: replikacja DNA, transkrypcja, translacja a także proces proliferacji, różnicowania oraz apoptozy komórek organizmu [15, 16]. Ponadto, MT ze względu na dużą ilość reszt cysteinowych zawartych w swojej budowie, wykazują silne właściwości antyoksydacyjne. Stanowią, obok glutationu (GSH) oraz enzymów antyoksydacyjnych (dysmutaza nadtlenkowa - SOD, katalaza – CAT, peroksydaza glutationowa – GPx), jeden z głównych elementów ochrony komórek przed negatywnym wpływem reaktywnych form tlenu [17, 18].

Postuluje się, że rola MT może też istotnie wpływać na rozwój choroby nowotworowej. W kancerogenezie i progresji nowotworu może mieć związek z regulacją przez te białka procesów proliferacji oraz różnicowania się komórek [19, 20]. Sugerowane są różnorodne mechanizmy, dzięki którym MT mogą sprzyjać niekontrolowanej proliferacji. MT stanowią m. in. bezpośredni rezerwuar jonów cynku niezbędnych w procesach biosyntezy kwasów

nukleinowych i białek, które zachodzą intensywnie w ulegających podziałom komórkach nowotworowych. Potwierdzeniem tego jest nie tylko podwyższony poziom MT w obszarze hiperplazji, ale także translokacja białka z cytoplazmy do jądra komórkowego w fazie syntezy DNA (faza S), zaobserwowana w komórkach nowotworowych *in vitro* [21, 22]. Ponadto wykazano, że MT mogą zwiększać potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych poprzez interakcje z białkiem p53 oraz hamowanie procesu apoptozy [23]. Ważnym problemem w kontekście chorób nowotworowych jest także udział MT w powstawaniu oporności komórek nowotworowych na chemio- i radioterapię. U podłoża tego zjawiska leżą najprawdopodobniej właściwości antyoksydacyjne tych białek [24, 25].

2.4. Metalotioneiny w wirusowych zapaleniach wątroby

Organizm ludzki posiada kilka endogennych katalitycznych systemów przeciwutleniaczy, takich jak dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy, peroksydaza glutationowa oraz oksygenaza hemowa. Ponadto obfitymi zmiataczami wolnych rodników tlenowych są witaminy witaminy C i E oraz glutation, które mogą dodatkowo ograniczać działanie utleniające wpływające na makrocząsteczki [25].

Sugerowano również, że MT mogą działać jako zmiatacze rodników tlenowych dzięki posiadaniu licznych reszt cysteinowych. [26]. Metalotioneiny ssaków w swojej sekwencji aminokwasów zawierają 20 reszt cysteinowych, które zwykle wiążą 7 atomów cynku, jednak mogą również tworzyć kompleksy z atomami miedzi i innych metali ciężkich. W badaniach *in vitro* wykazano możliwość utleniania reszt cysteinowych wypierając tym samym z połączeń jony metali, co sugeruje możliwość wykorzystywania przez komórki metalotionein jako buforów przeciwko czynnikom utleniającym [27]. Potwierdzać mogą to obserwacje wzrostu ekspresji metalotionein w przypadku narażenia komórek na stres oksydacyjny lub działanie cytokin zapalnych takich jak IL-1 oraz IL-6, co może zmniejszać szkody

wywoływane przez czynniki generujące stres oksydacyjny [28]. Ponadto, w badaniach u myszy z nokautem genów MT, komórki są bardziej wrażliwe na uszkodzenia wywołane przez wolne rodniki tlenowe niż komórki grupy zwierząt kontrolnych [29].

Badania na modelu, w którym transgeniczne myszy wykazywały podwyższony poziom genu MT-I (MT-I) obserwowano podwyższony poziom MT-I we wszystkich tkankach, w których MT-I jest zwykle ekspresjonowany [30]. Jednak poziom ekspresji MT-I w ww. badaniu był najwyższy w tkance wątroby i był on aż 10-krotnie wyższy niż w grupie kontrolnej. Jednocześnie, myszy z nadekspresją MT-I nie wykazywały zmian w aktywności innych przeciwutleniaczy - obejmujących dysmutazę ponadtlenkową, katalazę, glutation i peroksydazę [30].

Przewlekłe procesy zapalne, m.in. indukowane infekcją wirusową mogą promować również rozwój choroby nowotworowej oraz mogą przyczyniać się do progresji nowotworu. Zostało to udowodnione m.in. dzięki badaniom przeprowadzonym na modelu mysim, w którym wykorzystano transgeniczne myszy, w których genom wbudowano fragment DNA kodujący białko HBsAg w miejscu regulacji ekspresji genu albuminy, co spowodowało ekspresję HBsAg w komórkach wątroby [31]. Transgen wywoływał ekspresję wirusowego białka powierzchniowego, które dzięki modyfikacji genetycznej gromadziło się w siateczce endoplazmatycznej hepatocytów. Powodowało to charakterystyczną zmianę morfologii komórek wątroby, zwanej obrazem „szlifowanego szkła” (ang. ground glass). [31]. Stała ekspresja transgenu HBsAg skutkowałą apoptozą komórek wątrobowych, lokalnym stanem zapalnym oraz procesami regeneracyjnymi. Taki obraz histopatologiczny wątroby przypomina fenotyp nosicieli przewlekłe zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B. Ponadto u większości osobników myszy transgenicznym alb-HBsAg, po 18 miesiącach obserwacji rozwijał się rak wątrobowokomórkowy [31]. Postuluje się, że transformacja nowotworowa hepatocytów w tym modelu jest spowodowana przez działanie na regenerujące się komórki

wątroby na generowanie wolnych rodników tlenowych, których źródłem były komórki zapalne odpowiadające na uszkodzenie tkanki wątroby [31]. Hipotezę tę dodatkowo wspiera fakt, że podczas dożylniej perfuzji NBT błękitu nitrotetrazolowego (NBT) myszom transgenicznym, wykazano zwiększoną redukcję barwnika, co świadczy o intensywniejszym tworzeniu się nadtlenu w porównaniu z myszami kontrolnymi. Zaobserwowano także zwiększony poziom 8-okso-2'-deoksyguanozyny (8-okso-dG), co również jest związane z uszkodzeniem oksydacyjnym DNA i zazwyczaj poprzedza proces kancerogenezy [32].

W badaniach O'Connor i wsp. wykazano, że genotyp IFNL3 (interferon lambda 3) pacjentów jest ściśle związany z prawidłową odpowiedzią na leczenie interferonem oraz spontanicznym klirensiem wirusa HCV i jest on związany z niższą ekspresją genów stymulowanych interferonem (ang. interferon stimulating genes- ISG, w tym MT) w biopsjach wątroby pochodzących od pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. Co ważne, w biopsjach wątroby pochodzących od pacjentów zakażonych HCV odpowiadających na leczenie, MT uległy znacznej nadekspresji w przeciwieństwie do większości innych ISG. W pracy tej wykazano również zależność między niższymi wskaźnikami włóknienia wątroby a wyższą ekspresją MT [33].

Powyższe badania sugerują udział MTs w regulacji mechanizmów zaangażowanych w patogenezę WZW B oraz WZW C, jednak ich rola nie jest dotychczas dobrze poznana.

3. CELE PRACY

Wirusowe zapalenie wątroby typu B oraz C ze względu na wysoką zachorowalność i wszechobecność są powszechnym problemem zdrowotnym ludzi na całym świecie [5]. Dotychczasowe niezadowalające wyniki leczenia szczególnie przewlekłych postaci tych chorób wskazują, iż celowym wydaje się być lepsze poznanie mechanizmów regulujących przebieg choroby, co może przyczynić się do podniesienia efektywności leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu B oraz C.

Procesem mającym znaczący wpływ na rozwój przewlekłych postaci wirusowego zapalenia wątroby oraz następczych zmian: marskości oraz rozwoju raka wątrobowokomórkowego, jest przewlekły proces zapalny oraz związane z tym stałe narażenie na wysoką aktywność wolnych rodników tlenowych w tkance wątroby. Stosunkowo dobrze poznanymi białkami mającymi właściwości przeciwutleniające są metalotioneiny, jednak ich rola w procesach związanych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B i C, oprócz niewielu prac na modelach zwierzęcych oraz tkankach ludzkich, nie była dotychczas dobrze zbadana. Brak jest również porównania roli MTs w tych dwóch typach zapalenia wątroby.

Powyższe fakty skłoniły mnie do zbadania roli ekspresji białek MT-I/II w WZW B oraz WZW C i sformułowania następujących celów pracy:

1. Wykazanie ekspresji mRNA izoform MT-I oraz MT-II oraz określenie lokalizacji ekspresji białek z użyciem metody immunohistochemicznej (IHC) MT-I/II w komórkach tkanki wątroby pacjentów z WZW B, WZW C oraz w grupie kontrolnej.
2. Ocena związku pomiędzy ekspresją mRNA izoform MT-I oraz MT-II oraz ekspresją białek MT-I/II w badanych przypadkach HBV i HCV z parametrami klinicznymi pacjentów.

3. Ocena przydatności określania poziomu ekspresji mRNA izoform MT-I oraz MT-II oraz ekspresji białek MT-I/II w diagnostyce różnicowej zapaleń wątroby o etiologii HBV i HCV.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Materiał

4.1.1 Grupa badana i kontrolna

Materiał do przeprowadzonych eksperymentów stanowiły pobierane oraz archiwizowane fragmenty tkankowych biopsji wątroby, uzyskanych śródoperacyjnie podczas zabiegów chirurgicznych na jamie brzusznej, utrwalonych w formalinie a następnie zabezpieczonych w postaci bloczków parafinowych. Dodatkowo bioptaty zostały utrwalone w płynie RNAlater - do późniejszego wykorzystania w badaniach molekularnych. Materiał ten pochodził od pacjentów operowanych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym im. J. Gromkowskiego we Wrocławiu (Oddział V Chirurgii Ogólnej) oraz Powiatowym Zespole Szpitali w Oleśnicy (Oddział Chirurgii Ogólnej), po uzyskaniu wcześniej świadomej zgody od pacjentów.

Badana grupa obejmowała:

- **29** biopsji pochodzących od pacjentów z patologiami wątroby, w tym:
 - **11** pacjentów zakażonych HBV,
 - **18** pacjentów zakażonych HCV,

Kontrolę dla ww. materiału stanowiło:

- **9** biopsji pochodzących od pacjentów z hepatopatiami nieznanego pochodzenia (charakteryzującymi się podwyższoną aktywnością ALT, AST), będącymi wskazaniem do biopsji wątroby, u których ostatecznie nie stwierdzono mikroskopowo patologii tego narządu.

Do wszystkich badanych przypadków uzyskano, z zachowaniem anonimowości, dane kliniczne z archiwum Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. J. Gromkowskiego we Wrocławiu oraz Powiatowego Zespołu Szpitali w Oleśnicy, które stanowiły: stężenie

bilirubiny, aktywność transaminazy asparaginowej i transaminazy alaninowej, gamma-glutamylotranspeptydazy, fosfatazy alkalicznej, stężenie białka całkowitego, albumin, cholesterolu całkowitego, frakcji HDL cholesterolu, trójglicerydów, morfologię (wskaźnik leukocytów, płytek krwi, erytrocytów, stężenie hemoglobiny) oraz wskaźnikami krzepnięcia krwi (APTT, aktywność protrombiny), a także opisy radiologiczne badań obrazowych jamy brzusznej, wiek oraz płeć.

Zaplanowane badania otrzymały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr KB 298/2009 oraz KB 472/2018).

4.2. Metody

4.2.1. Barwienie hematoksyliną i eozyną skrawków parafinowych

Barwienie hematoksyliną i eozyną wykonano w celu weryfikacji rozpoznania klinicznego. Skrawki parafinowe zostały nałożone na szkiełka podstawowe, a następnie odparafinowane poprzez 15 min. inkubację w ksylene, oraz ponownie uwodnione przeprowadzając je przez szereg alkoholi o malejącym stężeniu (alkohol absolutny, 96%, 70%). Następnie szkiełka zostały przepłukane wodą destylowaną oraz przez 3 minuty inkubowano je w hematoksylinie, po czym skrawki przepłukano wodą destylowaną i inkubowano przez 10 m.in. eozyną. Po inkubacji preparaty zostały ponownie odwodnione, przeprowadzając je przez szereg alkoholowy o wzrastającym stężeniu (70%, 96%, alkohol absolutny) oraz ksylene. Tak przygotowane szkiełka podstawowe ze skrawkami zamykano szkiełkami nakrywkowymi przy użyciu żywicy syntetycznej.

4.2.2. Ocena histopatologiczna

Weryfikację prawidłowości rozpoznań histopatologicznych badanych przypadków patologii wątroby oraz kontroli stanowiących przypadki prawidłowego mięszu wątroby

4. MATERIAŁY I METODY

dokonano z użyciem dwustanowiskowego mikroskopu świetlnego OLYMPUS BX-41 sprzężonego z torem wizyjnym oraz komputerowym systemem analizy obrazu Cell^D (Olympus, Tokio, Japonia).

4.2.3. Reakcje immunohistochemiczne (IHC)

Skrawki parafinowe grubości 4µm nakładano na szkiełka podstawowe SuperFrost Plus (Menzel Gläser, Braunschweig, Niemcy), następnie były inkubowane w buforze Target Retrieval Solution o pH 9.0 w aparacie PT Link (Dako Cytomation, Glostrup, Dania) przez 20 minut celem ich deparafinizacji, uwodnienia oraz odsłonięcia determinant antygenowych. Następnie, preparaty ostudzono w buforze płuczącym (TBS z 0,1% Tween) przez 3 min. Do wizualizacji został użyty system EnVision™ FLEX, High pH (Link) (nr kat. K8000). Endogenną peroksydazę blokowano poprzez inkubację przez 5 min. w EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent. Resztki odczynnika usunięto poprzez przepłukanie w buforze (TBS z 0,1% Tween). Następnie nakropiono przeciwciała pierwszorzędowe: monoklonalne mysie przeciwciała anty MT-I/II (klon E9, DakoCytomation, Glostrup, Dania) w rozcieńczeniu 1:100 – inkubacja trwała 20 min. w temperaturze pokojowej. Pozostałości roztworu przeciwciał usunięto przepłukując szkiełka buforem (TBS z 0,1% Tween). Następnym etapem było naniesienie przeciwciała drugorzędowego znakowanego peroksydazą chrzanową (EnVision FLEX/HRP) oraz inkubacja przez 20 min. Resztki roztworu przeciwciał również usunięto przepłukując szkiełka buforem (TBS z 0,1% Tween). Następnie szkiełka poddawano inkubacji przez 5 min. w buforze (TBS z 0,1% Tween), a na preparat dodawano świeżą diaminobenzydynę (DAB), będącą substratem dla peroksydazy chrzanowej, inkubując je przez 10 min. Preparaty przepłukano w buforze (TBS z 0,1% Tween) w celu usunięcia pozostałości DABu. W kolejnym kroku, tak przygotowane preparaty zostały poddane kontrastującemu barwieniu w celu uwidocznienia jąder komórkowych i struktury tkanki –

4. MATERIAŁY I METODY

poprzez 5 minutową inkubację z odczynnikiem EnVision FLEX Hematoxylin. W wodzie destylowanej wypłukano pozostałości odczynnika, a następnie skrawki odwodniono, przeprowadzając przez szereg alkoholowy o wzrastającym stężeniu, inkubując przez 5 minut w roztworach: 70%, 96% i alkoholu absolutnym, a na końcu w ksylenie. Preparaty zamknięto szkiełkiem nakrywkowym za pomocą środka SUB-X Mounting Medium w urządzeniu Cover slipper. Pozostałe odczynniki oraz sprzęt był produkcji firmy Dako Cytomation, Glostrup, Dania.

Pozytywną próbą kontrolną niezbędną dla weryfikacji prawidłowości wykonanych reakcji IHC dla przeciwciał anty MT-I/II były skrawki raka gruczołu piersiowego.

4.2.4. Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych

Do oceny nasilenia cytoplazmatycznej ekspresji antygeny MT-I/II w hepatocytach stosowano skalę określającą iloraz intensywności reakcji immunohistochemicznej oraz odsetek komórek o pozytywnej ekspresji antygeny. Do oceny jądrowej ekspresji MT stosowano półilościową skalę punktową stanowiącą odsetek hepatocytów - wykazujących pozytywną jądrową ekspresję antygeny w stosunku do wszystkich hepatocytów w obrębie badanego skrawka tkanki wątroby. Skala ta przedstawiona jest w Tabeli 4. oraz Tabeli 5.

4. MATERIAŁY I METODY

Tabela 4. Skala oceny preparatów immunohistochemicznych wg Remmele i Stagnera stosowana do oceny nasilenia ekspresji cytoplazmatycznej MT-I/II. Ostateczny wynik to iloczyn liczby punktów właściwych dla intensywności i odsetka komórek z pozytywną reakcją IHC (AxB) [34].

Ilość punktów	Intensywność reakcji barwnej (A)	Procent komórek wykazujących reakcję (B)
0	brak reakcji	0%
1	słaba reakcja	< 10%
2	średnia reakcja	10% - 50%
3	silna reakcja	51% - 80%
4		81% - 100%

Tabela 5. Skala oceny jądrowej reakcji IHC stosowana do oceny ekspresji MT-I/II [35].

Odsetek pozytywnych komórek	Punktacja
0%	0 pkt
1-10%,	1 pkt.
11-25%,	2 pkt
26-50%,	3 pkt
>50%.	4 pkt

4.2.5. Metoda Real - time PCR

4.2.5.1. Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzano z materiału (śródooperacyjnych biopłatów wątroby) utrwalonego w RNAlater (Qiagen, Niemcy) stosując zestaw RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niemcy).

Procedura izolacji RNA zawierała następujące etapy:

4. MATERIAŁY I METODY

1. Pobranie 30 mg fragmentu tkanki do 600 μ l buforu RLT z dodatkiem 1 μ l β -merkaptoetanolu.
2. Homogenizacja utrwalonej próbki za pomocą QIAshredder homogenizer (Qiagen, Niemcy).
3. Wirowanie – 3 min., 13 400 obr./min.
4. Następnie supernatant przeniesiono do probówek „Eppendorf.”
5. Do tak przygotowanych próbek dodano jedną objętość 70% etanolu, a roztwór dokładnie wymieszano.
6. 700 μ l roztworu nanoszono na kolumnienki ze złożem do oczyszczania kwasów nukleinowych umieszczonych w probówkach o pojemności 2 ml.
7. Następnie, wirowano materiał przez 15 s. z prędkością 10 000 obr./min.
8. Następnie, naniesiono na kolumnienki 700 μ l buforu RW1.
9. Po raz kolejny próbki wirowano przez 15 s. z prędkością 10 000 obr./min.
10. Naniesiono na kolumnienki 500 μ l buforu RPE.
11. Wirowanie – 15 s., 10 000 obr./min.
12. Następnie, umieszczano kolumnienki w probówkach o pojemności 2 ml.
13. Wirowanie przez 1 minutę z prędkością 13 400 obr./min.
14. Następnie, naniesiono 30 μ l wody wolnej od RNaz w celu elucji RNA i inkubowano przez 4 min.
15. Wirowanie – 1 min., 10 000 obr./min.

W celu oznaczenia stężenia i czystości wyizolowanego RNA, mierzono absorbancję próbek za pomocą metody spektrofotometrycznej, w długości fali 260 nm, wykorzystując spektrofotometr NanoDrop1000 (NanoDrop Technologies, USA). Próbki wyizolowanego RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

4.2.5.2. Reakcje odwrotnej transkrypcji

Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzono na matrycy wyizolowanego RNA używając zestawu QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 6.

Tabela 6. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji (łącznie objętość 20 µl).

Składnik	Objętość
matrycowe RNA (400 ng)	10 µl
bufor reakcyjny (10x stężony)	2 µl
mieszanina nukleotydów, dNTP (5 mM)	0,8 µl
primery oligo-dT (10 µM)	2 µl
inhibitor RNaz (10 U/µl)	1 µl
odwrotna transkryptaza	1 µl
woda wolna od RNaz	3,2 µl

Mieszaninę umieszczono w termocyklerze DNA Engine® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Reakcja odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przez 45 min. w temperaturze 42° C. Następnym etapem reakcji było inaktywowanie termiczne odwrotnej transkryptazy poprzez ogrzewanie próbek przez 5 min. w temperaturze 99° C. Uzyskane w ten sposób cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania reakcji PCR.

4.2.5.3. Reakcje Real - time PCR

Badanie poziomu ekspresji izoform MT-I i MT-II (*MT-IA*, *MT-IB*, *MT-IE*, *MT-IF*, *MT-IG*, *MT-IH*, *MT-IX* oraz *MT-IIA*) metodą Real - time PCR wykonywano z wykorzystaniem aparatu 7900HT Fast Real - time PCR System (Applied Biosystems, USA), oraz stosując

4. MATERIAŁY I METODY

następujące primery dla poszczególnych genów (z firmy Applied Biosystems/Life Technologies):

1. *MT1A* Hs00831826_s1
2. *MT1B* Hs01875377_s1
3. *MT1E* Hs01938284_g1
4. *MT1F* Hs00744661_sH
5. *MT1G* Hs02578922_gH
6. *MT1H* Hs00823168_g1
7. *MT1X* Hs04194245_g1
8. *MT2A* Hs01591333_g1
9. *GUSB* Hs00939627_m1

Do reakcji użyto sond TaqMan® MGB Probe (Applied Biosystems, USA), które są wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym FAM. Warunki przeprowadzania reakcji przedstawiono w Tabeli 7. Procedura obejmowała 40 cykli.

Tabela 7. Warunki reakcji Real - time PCR.

Etap reakcji	Temperatura	Czas
aktywacja polimerazy	50°C	2 min.
wstępna denaturacja	94°C	10 min.
Denaturacja	94°C	15 s.
Przyłączenie starterów i sondy oraz synteza	60°C	1 min.

Względną ekspresję badanych genów obliczano metodą $\Delta\Delta Ct$. Wyniki normalizowano w oparciu o ekspresję genu referencyjnego *GUSB*, zgodnie z zaleceniami stosowanymi powszechnie w literaturze.

4.3. Analiza statystyczna

Rezultaty wykonanych eksperymentów poddano analizie statystycznej za pomocą programu Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, Kalifornia, USA). Przy użyciu testu Kołomorowa-Smirnowa zbadano rozkład badanych zmiennych. Ponadto dla zmiennych określono wartości: minimalną, maksymalną, średnią, odchylenie standardowe, medianę oraz rozrzut. W zależności od tego, czy uzyskane dane cechowały się rozkładem parametrycznym lub nieparametrycznym, do analizy statystycznej różnicy badanych cech w dwóch grupach wykorzystywano odpowiednio test t-Studenta lub test U-Manna-Whitney'a. W przypadku porównania badanej cechy pomiędzy wieloma grupami dla cech z rozkładem parametrycznym wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji z testem post hoc Dunna, a dla cech z rozkładem nieparametrycznym test Kruskalla-Wallisa z testem post hoc Bonferroniego. Ewentualny związek pomiędzy badanymi cechami (uwzględniając ich rozkład) sprawdzano przy pomocy testu korelacji Pearsona lub Spearman'a. Za istotne uznawano wyniki analiz statystycznych, dla których poziom istotności $p < 0,05$.

5. WYNIKI

5.1. Real - time PCR oraz reakcje IHC

W celu określenia poziomu ekspresji izoformy MT na poziomie genu wykonano reakcje Real - time PCR określając poziom mRNA badanych izoform *MT-I* oraz *MT-II*, podczas gdy badanie ekspresji białka przeprowadzono dla MT-I/II na całym zgromadzonym materiale, który podzielono na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowiły przypadki kontrolne – pochodzący od osób bez rozpoznanej w badaniu histopatologicznym patologii wątroby (Tabela 8.). Z kolei drugą grupę stanowiły przypadki pacjentów z rozpoznaniem przewlekłym WZW B (podgrupa 1) lub przewlekłym WZW C (podgrupa 2; Tabela 9.). Ekspresję badanych MTs analizowano w odniesieniu do podgrup oraz w aspekcie danych klinicznych (parametry morfologii - wskaźnik leukocytów, płytek krwi, erytrocytów, stężenie hemoglobiny, parametry biochemiczne krwi - stężenie bilirubiny, aktywność transaminazy asparaginowej i transaminazy alaninowej, gamma-glutamylotranspeptydazy, fosfatazy alkalicznej, stężenie białka całkowitego, albumin, cholesterolu całkowitego, frakcji HDL cholesterolu, trójglicerydów, krzepnięcia krwi: APTT, aktywność protrombiny, a także powiększenie i stłuszczenie wątroby, wiek, płeć).

5. WYNIKI

Tabela 8. Dane kliniczne pacjentów w grupie kontrolnej.

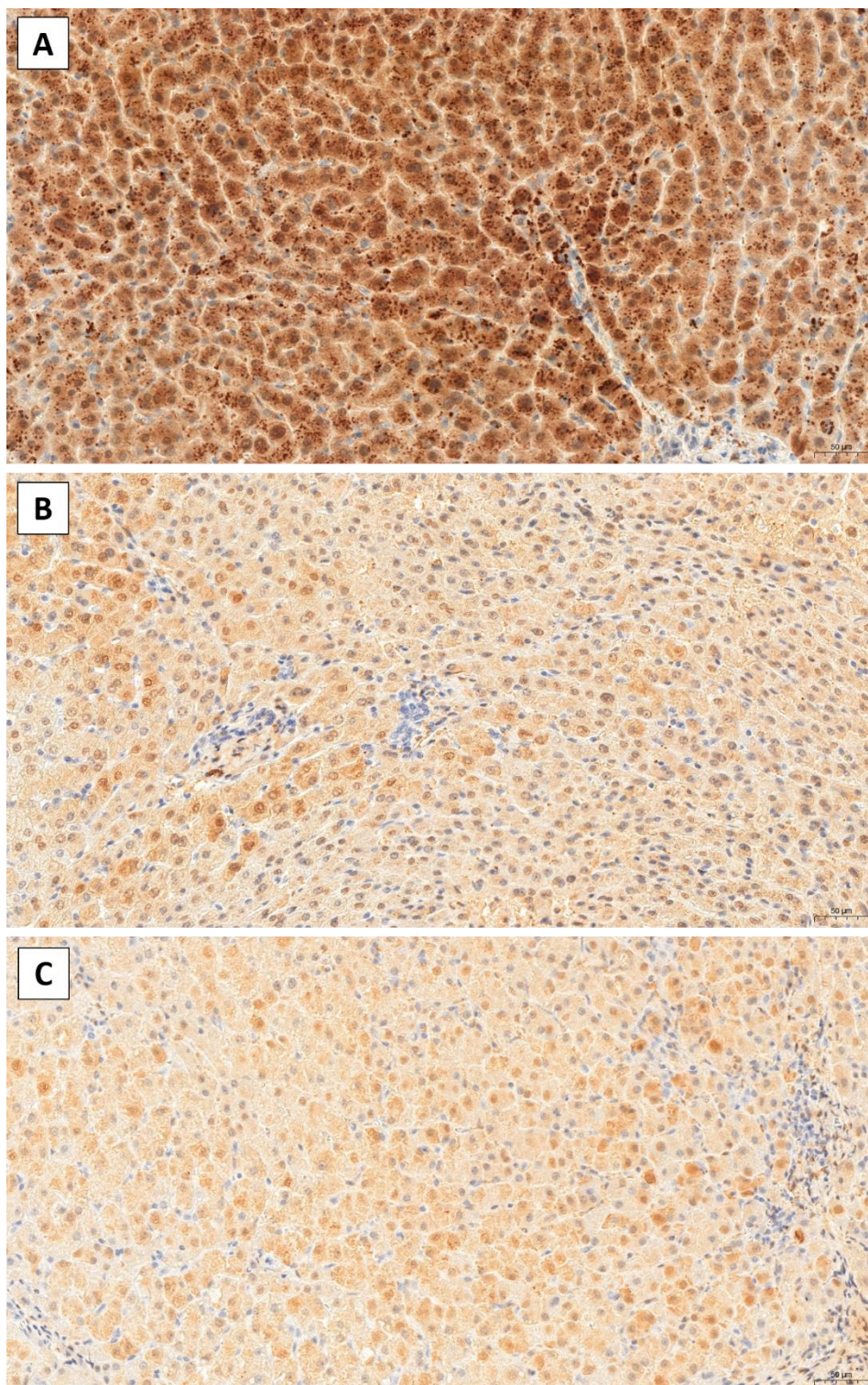
N=9	Norma	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Wiek	-	49,7778	49,0000	39,0000	68,0000	9,54958
bilirubina [mg/dL]	0,2-1,2	1,2667	1,2000	0,9000	1,7000	0,35000
AST [IU/L]	0-40	37,1111	37,0000	24,0000	57,0000	12,78128
ALT [IU/L]	0-40	31,5556	36,0000	23,0000	42,0000	8,44262
GGTP [IU/L]	11-43	103,4444	89,0000	75,0000	151,0000	36,12171
fosfataza alkaliczna [IU/L]	30-99	118,8889	92,0000	69,0000	164,0000	43,71340
białko całkowite [g/dL]	6,3-8,2	22,3333	8,0000	6,3000	75,0000	29,86649
albuminy [g/dL]	3,5-5,0	39,5444	4,7000	3,0000	164,0000	70,56276
cholesterol całk. [mg/dL]	150-200	196,5000	196,5000	187,0000	206,0000	10,40673
HDL [mg/dL]	29-71	56,3000	56,3000	54,0000	58,6000	2,51952
trójglicerydy [mg/dL]	50-180	84,0000	84,0000	74,0000	94,0000	10,95445
PT [%]	70-120	84,6333	81,3000	77,3000	95,3000	8,18535
APTT [sek]	25-41	36,8333	36,7000	29,4000	44,4000	6,49596
WBC [$10^3/uL$]	4,0-10,0	4,6533	4,9300	3,2000	5,8300	1,15757
RBC [$10^6/uL$]	4,0-5,2	4,5733	4,5100	4,0900	5,1200	0,44853
Hb [g/dL]	12,0-16,0	14,0000	13,5000	13,1000	15,4000	1,06419
PLT [$10^3/uL$]	150-450	146,6667	124,0000	109,0000	207,0000	45,71378

5. WYNIKI

Tabela 9. Dane kliniczne pacjentów w grupie badanej.

N=29	Norma	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Wiek	-	52,6552	53,0000	29,00000	78,000	10,7380
bilirubina [mg/dL]	0,2-1,2	1,4458	0,9000	0,40000	6,300	1,3775
AST [IU/L]	0-40	89,5769	59,0000	18,00000	246,000	71,7831
ALT [IU/L]	0-40	78,2308	56,0000	15,00000	222,000	54,0180
GGTP [IU/L]	11-43	140,7600	53,0000	11,00000	952,000	218,4674
fosfataza alkaliczna [IU/L]	30-99	107,0833	90,5000	36,00000	280,000	64,4656
białko całkowite [g/dL]	6,3-8,2	7,3190	7,1000	6,20000	9,600	0,7763
albuminy [g/dL]	3,5-5,0	3,5143	3,7800	1,80000	4,300	0,7145
cholesterol całk. [mg/dL]	150-200	181,1538	177,0000	95,00000	315,000	55,9223
HDL [mg/dL]	29-71	38,3500	46,7000	2,50000	69,600	20,2883
trójglicerydy [mg/dL]	50-180	104,3167	94,0000	52,00000	225,000	46,9550
PT [%]	70-120	86,9172	85,1000	65,00000	104,500	9,1741
APTT [sek]	25-41	36,7655	34,2000	26,70000	52,700	7,2221
WBC [$10^3/uL$]	4,0-10,0	6,2586	6,3800	2,07000	11,560	2,0173
RBC [$10^6/uL$]	4,0-5,2	4,4069	4,5100	2,82000	5,180	0,5618
Hb [g/dL]	12,0-16,0	13,2897	13,6000	8,30000	16,400	1,7247
PLT [$10^3/uL$]	150-450	164,8414	183,0000	55,10000	335,000	70,4887

W przypadku badań IHC dla MT-I/II była obecna ekspresja zarówno cytoplazmatyczna jak i jądrowa. MT-I/II ekspresjonowana była w hepatocytach zarówno prawidłowej tkanki wątroby jak i przypadkach zmian patologicznych. (Rycina 3.)



Rycina 3. Badania immunohistochemiczne ekspresji MT-I/II w biopsatach wątroby. (A) Wysoką pozytywną cytoplazmatyczną oraz jądrową ekspresję MT-I/II obserwowałem w hepatocytach prawidłowej tkanki wątroby. Niska cytoplazmatyczna oraz jądrowa ekspresja MT-I/II występowała w hepatocytach pacjentów zakażonych HBV (B), oraz HCV (C).

5. WYNIKI

(pozytywna reakcja barwna oznacza brązowe zabarwienie cytoplazmy oraz jąder komórkowych). Powiększenie 100 x.

5.2. Nasilenie ekspresji IHC białka MT-I/II oraz poziom transkryptu mRNA izoform MT-I oraz MT-II

Tabela 10. Ekspresja IHC MT-I/II oraz izoform *MT-I* oraz *MT-IIA* mRNA – grupa kontrolna.

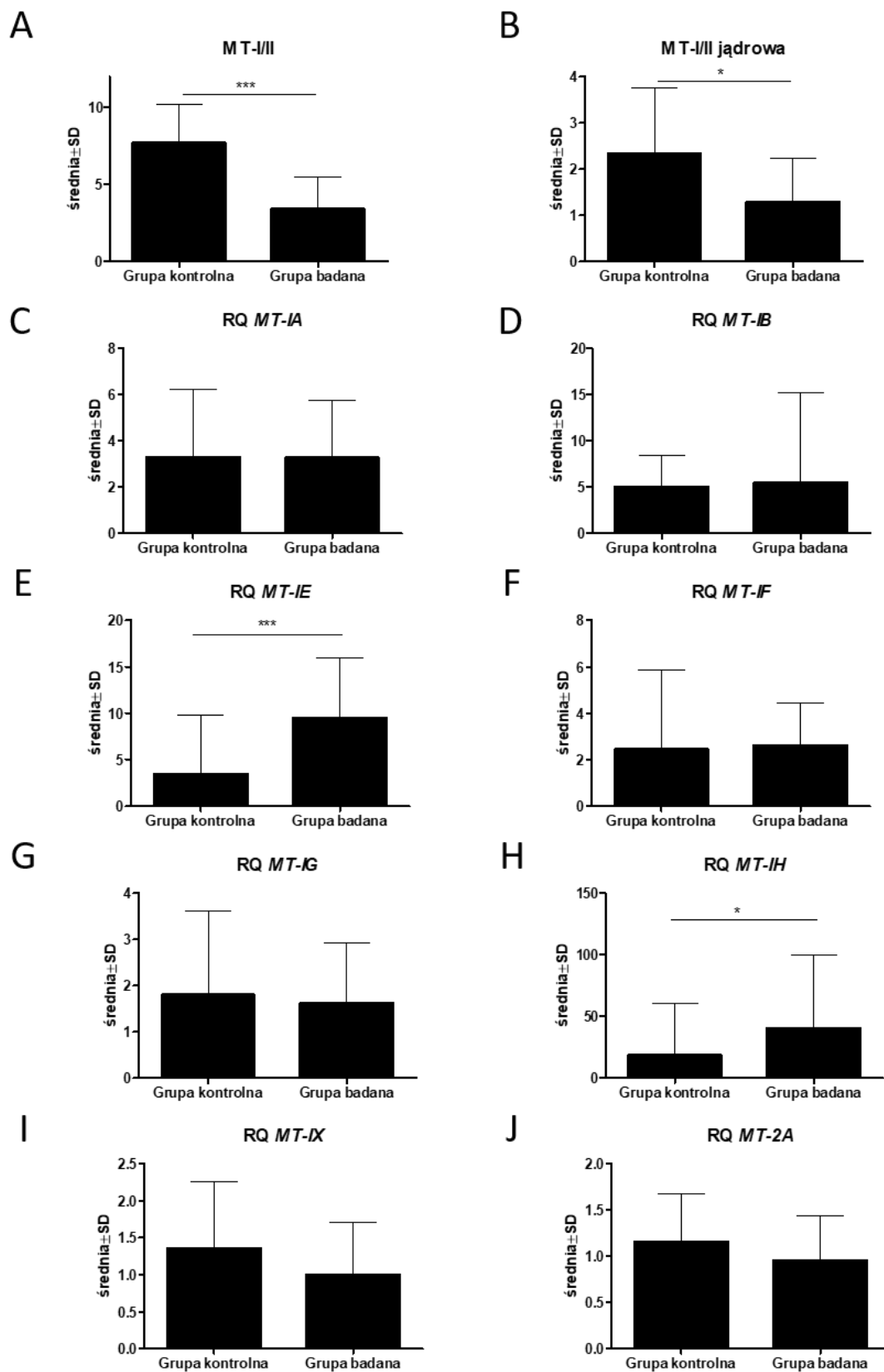
N=9	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
MT-I/II IRS	7,66666667	8	3	12	2,5
MT-I/II jądrowa.	2,33333333	2	1	4	1,41421356
RQ <i>MT1A</i>	2,54790223	0,708087719	0,235043551	16,5412918	5,27429403
RQ <i>MT1B</i>	5,03270316	4,78214686	1	10,1612079	3,36979986
RQ <i>MT1E</i>	3,44487336	1,13918338	0,557869661	20,1401148	6,28963719
RQ <i>MT1F</i>	2,42993302	1,29056249	0,670356296	11,4955214	3,43768482
RQ <i>MT1G</i>	1,79419799	1,31494276	0,668037039	6,58872814	1,8241276
RQ <i>MT1X</i>	1,35824285	1,09581177	0,498270131	3,68330279	0,904543454
RQ <i>MT1H</i>	18,4649684	1,34536721	0,446582926	128,711754	42,3921197
RQ <i>MT2A</i>	1,15556341	1	0,584793832	2,2022832	0,525403931

5. WYNIKI

Tabela 11. Ekspresja IHC MT-I/II oraz izoform *MT-I* oraz *MT-IIA* mRNA – grupa badana.

N=29	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
MT-I/II IRS	3,39286	3	0	6	2,09655
MT-I/II jądrowa.	1,28571	1	0	4	0,93718
RQ <i>MT1A</i>	3,34161	2,92900	0,462011	10,3603	2,51121
RQ <i>MT1B</i>	5,62581	1,27420	0,191445	46,8832	9,89598
RQ <i>MT1E</i>	9,70948	8,61033	3,120982	35,8525	6,46346
RQ <i>MT1F</i>	2,68286	2,26169	0,400535	7,8191	1,83478
RQ <i>MT1G</i>	1,67835	1,47106	0,061512	5,0246	1,28261
RQ <i>MT1X</i>	1,02923	0,75212	0,162893	2,9059	0,70297
RQ <i>MT1H</i>	41,74680	21,21538	0,901250	275,8997	59,61704
RQ <i>MT2A</i>	0,98157	0,91406	0,214195	2,0577	0,47282

Ekspresja IHC białka MT-I/II w badanym materiale, zarówno cytoplazmatyczna jak i jądrowa, była zróżnicowana, z tendencją do obecności przypadków z wyższą ekspresją w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej (Rycina 3.). Podobny trend zaobserwowałem w przypadku porównania ekspresji izoform mRNA *MT-IX* oraz *MT-IIA*. W przypadku ekspresji mRNA izoform *MT-IE* oraz *MT-IH* zaobserwowałem istotnie wyższą ekspresję w przypadkach z kontroli w porównaniu do grupy badanej (Rycina 4. A i B). Natomiast nie wykazano istotnych różnic ani trendów pomiędzy grupami kontrolną i badaną dla ekspresji mRNA *MT-IA*, *MT-IB*, *MT-IF*, *MT-IG* (Rycina 4. C-J).



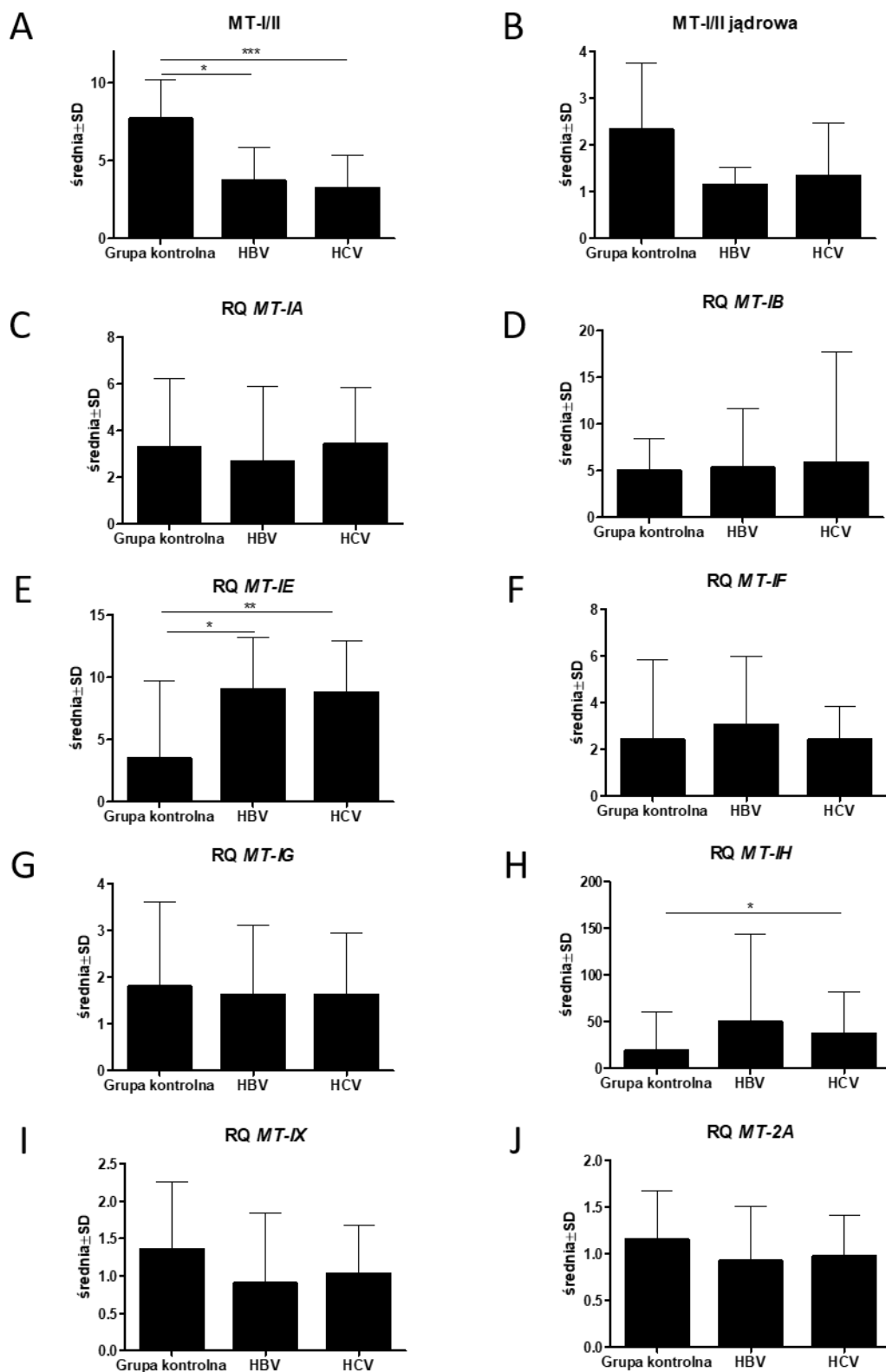
Rycina 4. Analiza statystyczna ekspresji IHC cytoplazmatycznej MT-I/II (A), oraz jądrowej (B) wykazały istotnie wyższą ekspresję badanych białek w grupie kontrolnej w porównaniu

5. WYNIKI

do grupy badanej (odpowiednio: $p < 0,001$; $p < 0,05$, test Manna-Whitney'a), W przypadku analizy poziomu ekspresji mRNA *MT-IA* (C), *MT-IB* (D) oraz *MT-IF* (F) wykazałem porównywalny poziom ekspresji obu izoform MT (odpowiednio: $p = 0,93$; $p = 0,18$; $p = 0,20$; test Manna-Whitney'a). Ekspresja *MT-IE* (E) oraz *MT-IH* (H) była istotnie wyższa w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio: $p < 0,001$; $p < 0,05$; test Manna-Whitney'a). W przypadku izoform *MT-IG*, *MT-IX*, *MT-IIA* wykazałem nieistotny trend wyższej ekspresji w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą badaną (odpowiednio: $p = 0,86$; $p = 0,32$; $p = 0,41$; test Manna-Whitney'a), (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5.3. Porównanie ekspresji MT-I/II oraz mRNA izoform MT-I oraz MT-IIA w grupach pacjentów zakażonych HBV i HCV oraz grupie kontrolnej

Podjąłem również analizę porównania ekspresji IHC MT-I/II oraz mRNA izoform *MT-I* i *MT-IIA* w podgrupach pacjentów zakażonych HBV, HCV oraz grupie kontrolnej. Przeprowadzona analiza wykazała istotnie wyższą ekspresję zarówno cytoplazmatycznej jak i jądrowej w grupie kontrolnej w porównaniu do grup HBV oraz HCV dla ekspresji IHC MT-I/II (Rycina 5 A i B). Podobne nieistotne statystycznie trendy wykazałem dla ekspresji *MT-IX* oraz *MT-IIA* (Rycina 5. I i J). W przypadku ekspresji *MT-IE* oraz *MT-IH* wykazałem istotnie wyższą ekspresję w obu podgrupach badanych (HBV, HCV) w porównaniu z grupą kontrolną (Rycina 5. E i H). Nie zauważyłem wyraźnych, istotnych statystycznie trendów dla ekspresji *MT-IA*, *MT-IB*, *MT-IF*, *MT-IG* (Rycina 5. C, D, F, G). Nie wykazałem również istotnych różnic w przypadku wszystkich badanych izoform MT pomiędzy grupą pacjentów zakażonych HBV a HCV.



Rycina 5. Analiza statystyczna ekspresji IHC cytoplazmatycznej MT-I/II (A) wykazała istotnie niższą ekspresję badanych białek w grupie kontrolnej w porównaniu z grupami

5. WYNIKI

pacjentów zakażonych wirusem HBV oraz HCV ($p < 0,001$; test Kruskala-Wallisa, test post hoc Dunna). W przypadku ekspresji IHC MT-I/II jądrowej (**B**) wykazałem nieistotny trend wyższej ekspresji badanych białek w grupie kontrolnej w porównaniu do obu podgrup grupy badanej ($p = 0,12$, test Kruskala-Wallisa). W przypadku analizy poziomu ekspresji mRNA *MT-IA* (**C**), *MT-IB* (**D**) oraz *MT-IF* (**F**), *MT-IG* (**G**) nie wykazała ona takiej zależności (odpowiednio: $p = 0,35$; $p = 0,36$; $p = 0,57$; $p = 0,94$; test Kruskala-Wallisa). Ekspresja *MT-IE* (**E**) oraz *MT-IH* (**H**) była istotnie wyższa w podgrupach pacjentów zakażonych HBV oraz HCV w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio: $p < 0,001$; $p < 0,05$, test Kruskala-Wallisa). W przypadku izoform *MT-IX*, *MT-IIA* wykazano nieistotny trend wyższej ekspresji w grupie kontrolnej z podgrupami pacjentów zakażonych HBV oraz HCV (odpowiednio: $p = 0,33$; $p = 0,70$; test Kruskala-Wallisa). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

5.4. Porównanie ekspresji MT-I/II oraz mRNA izoform MT-I oraz MT-IIA w grupach uwzględniających obecność stłuszczenia i powiększenia wątroby w badaniach obrazowych

Dla materiału badawczego przypadków pacjentów z WZW B oraz WZW C udało mi się uzyskać dane kliniczne w postaci opisów badań USG jamy brzusznej dla 23 pacjentów grupy badanej. W analizie uwzględniono dane na temat powiększenia wątroby oraz obecności stłuszczenia mięszu wątroby.

W przypadku powiększenia wątroby u 13 pacjentów stwierdzono ww. patologię, prawidłową wielkość wątroby stwierdzono u 10 pacjentów. Obecność stłuszczenia wykazano u 7 pacjentów, natomiast nie stwierdzono jej u 16 pacjentów.

Podjęta przeze mnie analiza poziomu ekspresji badanych izoform MT względem wyżej wymienionych cech nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi podgrupami (test Manna-Whitney'a).

5.5. Porównanie ekspresji MT-I/II oraz mRNA izoform MT-I oraz MT-IIA w grupach uwzględniających płeć pacjentów

Pozyskany do badania materiał w grupie badanej pochodził od 13 kobiet i 16 mężczyzn, natomiast w grupie kontrolnej od 5 kobiet i 4 mężczyzn.

Podjęta przeze mnie analiza poziomu ekspresji badanych izoform MT względem płci nie wykazała istotnych różnic w ekspresji badanych markerów pomiędzy badanymi podgrupami (test Manna-Whitney'a).

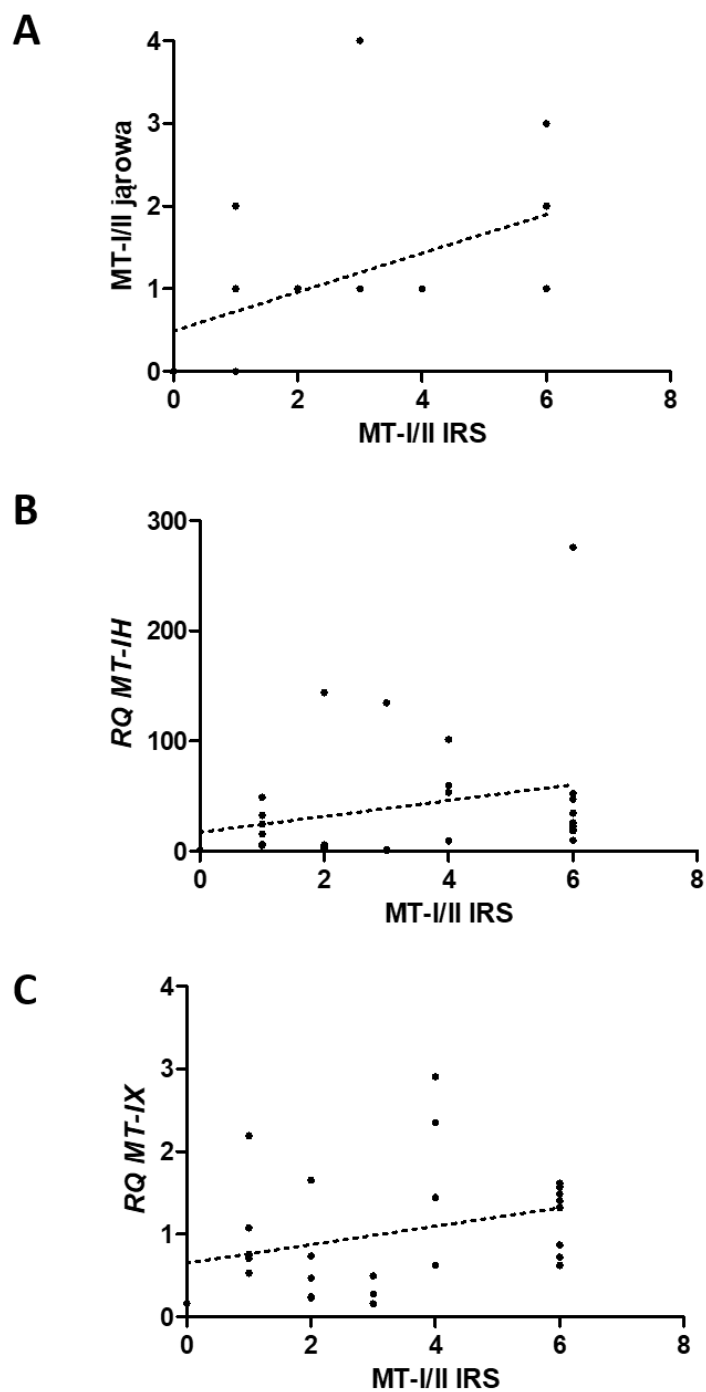
5.6. Korelacje ekspresji metalotioneiny I i II na poziomie genu oraz białka w materiale biopsji wątroby

W grupie badanej (HBV i HCV) w odniesieniu do ekspresji wszystkich badanych izoform mRNA *MT-I* i *MT-IIA* oraz cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC *MT-I/II* nie wykazałem ich rozkładu normalnego w analizowanych grupach (test testu Kołomorowa-Smirnowa). Analiza korelacji badanych markerów z wykorzystaniem testu Spearman'a wykazała liczne istotne statystycznie pozytywne korelacje pomiędzy m.in.:

- ekspresją cytoplazmatyczną *MT-I/II* vs. ekspresją jądrową *MT-I/II* ($r=0.593$, $p=0.0004$; Rycina 6. A),
- ekspresją cytoplazmatyczną *MT-I/II* vs. *MT-IH* ($r=0.410$; $p=0.022$; Rycina 6. B),
- ekspresją cytoplazmatyczną *MT-I/II* vs. *MT-IX* ($r=0.414$; $p=0.021$; Rycina 6. C).

5. WYNIKI

Szczegółowe wyniki analizy korelacji pomiędzy badanymi izoformami zawiera Tabela 12.



Rycina 6. Korelacja cytoplazmatycznej ekspresji MT-I/II (IRS) z: (A) ekspresją MT-I/II jąrową ($r=0.593$; $p<0,001$, test korelacji Spearmana), (B) ekspresją mRNA izoformy *MT-IH* ($r=0.410$; $p<0,05$; test korelacji Spearmana) oraz (C) ekspresją mRNA izoformy *MT-IX* ($r=0.414$; $p<0,05$; test korelacji Spearmana).

5. WYNIKI

Tabela 12. Macierz korelacji pomiędzy ekspresją izoform MT I i II na poziomie genu oraz białka (MT-I/II) w materiale biopsji wątroby. W tabeli przedstawiono współczynniki korelacji, wyniki istotne statystycznie zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

	MT-I/II jądrowa	RQ MT-IA	RQ MT-IB	RQ MT-IE	RQ MT-IF	RQ MT-IG	RQ MT-IH	RQ MT-IX	RQ MT-IIA
MT-I/II IRS	0,618****	0,084	-0,097	0,157	0,208	0,255	0,374*	0,356*	0,220
MT-I/II jądrowa		0,102	-0,010	-0,187	0,108	-0,079	0,219	0,054	0,065
RQ MT-IA			0,448*	0,047	0,631***	0,559**	0,598***	0,575**	0,539**
RQ MT-IB				0,134	0,644***	0,335	0,589**	0,344	0,352*
RQ MT-IE					0,413*	0,488***	0,351	0,453*	0,253
RQ MT-IF						0,840****	0,927****	0,761****	0,605****
RQ MT-IG							0,770****	0,882****	0,657****
RQ MT-IH								0,765****	0,555**
RQ MT-IX									0,763****

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

5.7. Korelacje ekspresji metalotioneiny I i II na poziomie genu oraz białka w materiale biopsji wątroby z wybranymi parametrami laboratoryjnymi

Analizę korelacji przeprowadziłem także dla wszystkich badanych izoform mRNA *MT*, cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC MT-I/II z parametrami biochemicznymi (stężenie bilirubiny, aktywność transaminazy asparaginowej i transaminazy alaninowej, gamma-glutamylotranspeptydazy, fosfatazy alkalicznej, stężenie białka całkowitego, albumin, cholesterolu całkowitego, frakcji HDL cholesterolu, trójglicerydów), morfologią (wskaźnik leukocytów, płytek krwi, erytrocytów, stężenie hemoglobiny) oraz wskaźnikami krzepnięcia krwi (APTT, aktywność protrombiny). W tym celu wykorzystałem test Spearman'a (po wcześniejszym sprawdzeniu rozkładu badanych cech), która wykazała liczne istotne statystycznie korelacje pomiędzy badanymi białkami a wynikami badań laboratoryjnych związanych z funkcją wątroby. Szczegółowe wyniki przedstawia Tabela 13. Podobnych zależności nie wykazałem dla przypadków w grupie kontrolnej.

5. WYNIKI

Tabela 13. Macierz korelacji pomiędzy ekspresją izoform metalotioneiny I i II na poziomie genu oraz białka w materiale biopsji wątroby oraz wybranymi parametrami laboratoryjnymi w grupie badanej pacjentów zakażonych HBV i HCV. W tabeli przedstawiono współczynniki korelacji, wyniki istotne statystycznie zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

	MT-I/II IRS	MT-I/II jądrowa	RQ MT1A	RQ MT1B	RQ MT1E	RQ MT1F	RQ MT1G	RQ MT1X	RQ MT1H	RQ MT2A
bilirubina [mg/dL]	-0,384	-0,207	-0,243	-0,184	-0,388	-0,419*	-0,546***	-0,564**	-0,425*	-0,137
ALT [IU/L]	-0,083	0,285	-0,127	-0,118	-0,350*	0,003	-0,102	-0,160	0,024	0,018
AST [IU/L]	-0,180	0,217	-0,209	-0,071	-0,602**	-0,173	-0,350*	-0,449*	-0,185	-0,060
GGTP [IU/L]	-0,134	0,158	-0,299	-0,124	-0,352	-0,212	-0,347	-0,378	-0,290	-0,030
fosfataza alkaliczna [IU/L]	-0,033	0,141	-0,430*	-0,111	-0,142	-0,330	-0,456*	-0,513*	-0,355	-0,306
białko całkowite [g/dL]	-0,205	-0,061	-0,090	0,207	-0,346	-0,016	-0,119	-0,258	-0,079	-0,169
albuminy [g/dL]	0,183	-0,060	0,368	0,185	0,326	0,357	0,458	0,531	0,203	0,383
cholesterol calc. [mg/dL]	0,326	0,223	0,027	0,168	0,044	0,797**	0,720***	0,577*	0,786***	0,253
HDL [mg/dL]	0,489	0,426	0,115	-0,333	0,370	0,636*	0,709*	0,915****	0,782***	0,345
trójglicerydy [mg/dL]	-0,052	-0,282	-0,014	0,305	-0,343	-0,193	-0,354	-0,588*	-0,333	-0,494
PT [%]	0,149	0,146	0,355	0,172	0,209	0,450*	0,546***	0,604****	0,409*	0,351
APTT [sek]	-0,187	0,114	-0,243	-0,295	-0,462*	-0,617***	-0,674****	-0,733****	-0,542***	-0,550**
WBC [$10^3/uL$]	0,299	0,217	0,122	0,338	0,131	0,238	0,150	0,148	0,184	0,345
RBC [$10^6/uL$]	0,204	0,333	0,078	0,210	0,125	0,187	0,120	0,174	0,040	0,195
Hb [g/dL]	0,170	0,361	-0,087	0,005	-0,078	-0,092	-0,177	0,023	-0,151	0,136
PLT [$10^3/uL$]	0,263	0,097	0,367*	0,513**	0,140	0,516****	0,532***	0,411*	0,469*	0,330

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

6. DYSKUSJA

Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby jest chorobą trwającą ponad 6 miesięcy, do rozpoznania której wymagana jest obecność markerów zakażenia wirusowego, cech biochemicznych uszkodzenia komórki wątrobowej oraz zmian histopatologicznych miększu wątroby. Przyczynami przewlekłego zapalenia wątroby są m. in. infekcje wirusami HBV (w przypadku WZW B) oraz HCV (w przypadku WZW C). Infekcje te u 20–25% powodują marskość oraz/lub pierwotnego raka wątroby. Rozwój marskości i nowotworzenie są procesami długotrwałymi, trwającymi od kilkunastu do kilkudziesięciu lat od zakażenia. 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. Infekcja wirusem HBV przyczynia się do 1 miliona zgonów rocznie, jednocześnie pierwotny rak wątrobowokomórkowy jest piątym co do częstości nowotworem na świecie. W Polsce liczbę chorych na przewlekłe WZW B szacuje się na około 350–400 tysięcy. Wśród nowych przypadków zakażeń HBV ponad 20% dotyczy ludzi młodych, a zapadalność na WZW B osób w wieku 15–24 lata przewyższa zapadalność ogólną. 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%, jednak brak jest dokładnych populacyjnych badań epidemiologicznych, stąd dane mogą być niedoszacowane. Wyżej wymienione fakty pokazują, że przewlekłe wirusowe zapalenia wątroby jest istotnym problemem klinicznym, a lepsze zrozumienie mechanizmów (także molekularnych) jego powstawania jest kluczowe dla skuteczniejszego leczenia oraz przeciwdziałania odległym powikłaniom tych infekcji [1-6].

Rola metalotionein w przypadku przewlekłego zapalenia wątroby o etiologii HBV i HCV do tej pory nie była w pełni przebadana. W badaniach przeprowadzonych z udziałem transgenicznych myszy ekspresjonujących antygen powierzchniowy HBV (HBsAg) w hepatocytach lub HBsAg oraz MT-I nie wykazano istotnych różnic w poziomie markerów

uszkodzenia wątroby. cech zapalenia wątroby w badaniu histopatologicznym oraz rozwoju raka wątrobowokomórkowego. Jednak zauważono istotnie mniej komórek o cechach hiperplazji oraz aneuploidalnych. Może to dowodzić częściowej ochronnej roli MT na komórki wątroby ekspresjonujących HbsAg – naśladujących przewlekłe WZW B [36]. Inne badania *in vitro* wykazały, że w komórkach wykazujących nadekspresję wirusowych białek HBeAg, HBcAg oraz HBxAg, antygeny te wykazywały ko-immunoprecypitację z metalotioneinami [37].

W mojej pracy wykazałem, że ekspresja MT-I/II na poziomie białka oznaczona metodą immunohistochemiczną w przypadkach pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B oraz typu C była niższa w porównaniu do kontroli. W przypadku pacjentów z WZW typu C podobną obserwację podaje Carrera i in.. W przytoczonych badaniach ekspresja cytoplazmatyczna ale przede wszystkim jądrowa MT w tkance wątroby była niższa u pacjentów chorujących na HCV w porównaniu do kontroli [38]. Ekspresja MT korelowała również z indeksem histologicznej aktywności zapalenia wątroby (ang. histological activity index), stopniem martwicy oraz stopniem włóknienia mięszu wątroby [38]. W pracy tej podkreślano również, że u pacjentów z HCV leczonych interferonem ekspresja MT była o połowę mniejsza w podgrupie chorych nie odpowiadających na terapię w porównaniu z pomyślnie leczonymi tym lekiem. Ponadto zauważono, że w przypadkach, w których ekspresja MT była obniżona, poziom ekspresji mRNA *IL-6* był również niski [38].

MTs regulują m. in. homeostazę cynku w komórce [39]. Metal ten jest silnym induktorem ekspresji MTs. Zaobserwowano, że suplementacja tego pierwiastka zwiększa odpowiedź terapeutyczną podawanego INF u pacjentów z HCV, natomiast niedobór cynku hamuje indukcję ekspresji MTs przez IFN i może być czynnikiem negatywnym dla pacjentów z infekcją HCV otrzymujących terapię IFN [39]. Ponadto badania *in vitro* wykazały, że nadmiar reaktywnych form tlenu wywołanych inkubacją z białkiem rdzeniowym HCV

nie wiązał się ze zmianami w żywotności komórek i zwiększonej indukcji mRNA MT [39]. W przypadku zakażenia HCV również obserwowany jest wzmożony uszkodzający wpływ stresu oksydacyjnego na komórki wątroby. Dowiedziono, że niestrukturalne białko NS3 wirusa HCV, może indukować „wybuch tlenowy” w ludzkich monocytach [40]. Ponadto komórki wątroby pacjentów zakażonych HCV wykazują oznaki zmian morfologii mitochondriów, a samo białko rdzeniowe HCV zmienia funkcję mitochondriów tak, że zwiększają one produkcję reaktywnych formy tlenu [40]. MTs jest najsilniejszym niespecyficznym zmiataczem wolnych rodników hydroksylowych, a jego ekspresja jest indukowana przez cytokiny, stres oksydacyjny, interferon (IFN), zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [40]. Dzięki temu MTs chronią DNA przed uszkodzeniem oksydacyjnym [40]. Ponadto ekspresja MTs hamuje aktywację czynnika jądrowego kappa B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), którego aktywacja odgrywa kluczową rolę w hamowaniu wkraczania na drogę apoptozy komórek wątroby zainfekowanych HCV. Wzmacnianie procesów aktywujących apoptozę przez MTs jest jednym z ważniejszych mechanizmów obronnych eliminujących replikację wirusa HCV [40-43]. Być może, u części pacjentów rozwijających postać przewlekłego zapalenia wątroby wywołanej wirusami HBV i HCV, wirusy te blokują mechanizmy ochronne komórek wątroby oparte na ekspresji metalotionein. Moje badania, w których w tkance wątroby pacjentów z przewlekłym HBV oraz HCV ekspresja MT-I/II była niższa niż w grupie kontrolnej, potwierdzać mogą wyżej przytoczony mechanizm.

Wyniki moich badań wykazały również, że ekspresja mRNA izoform metalotioneiny I nie jest jednorodna pod względem różnic i trendów między grupą kontrolną i grupą badaną. Odmienna ekspresja cechuje przede wszystkim ekspresję mRNA dla *MT-IE* oraz *MT-IH*. Może to świadczyć o odmiennej regulacji ekspresji genów dla tych izoform. Skomplikowane procesy regulacji ekspresji genów dla MT obejmujące stymulujący wpływ metali ciężkich, metylację promotora, nasilenie stresu oksydacyjnego jak i możliwe

modyfikacje potranslacyjne sprawiają, że interpretacja tego zjawiska jest trudna i przekracza możliwości analizy tutejszej pracy. Jest ona jednak ciekawym zagadnieniem i wymaga dalszych, bardziej zaawansowanych badań. Tym bardziej, że zróżnicowana rola poszczególnych izform metalotioeniny była już wielokrotnie opisywana w przypadku choroby nowotworowej [44].

Obniżona ekspresja MTs w hepatocytach zakażonych HBV i HCV może być spowodowana przede wszystkim ich uszkodzeniem. Z drugiej strony obniżona ekspresja MTs zmniejsza możliwości ochronne i regeneracyjne hepatocytów zakażonych wirusami hepatotropowymi, co może być bezpośrednią przyczyną uszkodzania mięszu wątroby przez przewlekłe zapalenia wirusowe [40, 41]. W mojej pracy może to potwierdzać fakt, że ekspresja mRNA dla licznych izoform *MT-I* oraz *MT-IIA* korelują ujemnie z markerami biochemicznymi uszkodzenia mięszu wątroby (stężenie bilirubiny, aktywność ALT, AST, fosfatazy alkalicznej) jak i parametrami krzepnięcia, będącymi odzwierciedleniem produkcji przez wątrobę czynników krzepnięcia obu torów aktywacji trombiny - toru zewnątrzpochodnego (ang. protrombin time, PT- będący miarą aktywności osoczowych czynników krzepnięcia: I, II, V, VII i X) jak i wewnątrzpochodnego (ang. activated partial thromboplastin time, APTT - będący miarą aktywności osoczowych czynników krzepnięcia XII, XI, IX i VIII). W mojej pracy zaobserwowałem, że niska ekspresja izoform *MT* wiąże się z obniżoną aktywnością (pośrednio ekspresją) czynników krzepnięcia toru wewnątrzpochodnego, co w konsekwencji wydłuża czas APTT. Podobnie dodatnia korelacja pomiędzy izoformami *MT* a aktywnością protrombiny wyrażoną jako odsetek aktywności wobec surowicy wzorcowej również sugeruje, że w przypadkach o wysokiej ekspresji *MT* występuje wyższa aktywność czynników krzepnięcia toru zewnątrzpochodnego. Co ciekawe nie zaobserwowałem takich zależności dla stężenia białka całkowitego oraz albumin, także produkowanych przez hepatocyty oraz będących miarą zaawansowania marskości wątroby.

Według mojej wiedzy do tej pory brak jest dostatecznych danych literaturowych na potwierdzenie tych obserwacji w przypadku przewlekłego zapalenia wątroby. Jednak podobne badania były przeprowadzone w przypadku toksycznego uszkodzenia wątroby m.in. kumulacją metalami ciężkimi (cynkiem, miedzią czy glinem), czy akrylamidem, jednak w ich przypadku podwyższone markery uszkodzenia wątroby wiązały się z wyższą ekspresją MT w hepatocytach [45]. Natomiast w badaniach Lian i wsp. u transgenicznych myszy z nokautem genu dla MT stosowanie ryfampicyny i izoniazydu wiązało się z podwyższoną aktywnością AST w osoczu i cechami nasilonego uszkodzenia hepatocytów w ocenie histopatologicznej w porównaniu do myszy ekspresjonujących MTs [46]. Być może podobny mechanizm zachodzi w przypadku infekcji HBV i HCV.

W przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu B oraz C często jest obserwowana małopłytkowość. Sugeruje się, że przyczyna tego stanu jest dwojaka. W pierwszej kolejności mogą być za to odpowiedzialne procesy autoimmunologiczne wyzwalane przewlekłym procesem zapalnym wątroby [1-3, 12]. Z drugiej strony w przebiegu przewlekłego WZW często dochodzi do nadciśnienia wrotnego na tle rozwijającej się marskości wątroby i powoduje to splenomegalię, która jest znanym czynnikiem sprawczym małopłytkowości [1-3, 12]. Rola MTs w tym kontekście nie jest do końca jasna. W swojej pracy wykazałem istnienie dodatniej korelacji pomiędzy ilością płytek krwi w morfologii a ekspresją mRNA izoform *MT*, które mogą być miarą niskiego zaawansowania procesów zapalnych wątroby, a co za tym idzie niewielkiej aktywności procesów autoimmunologicznych. Z kolei w pracy Hayashi i wsp. dowiedziono, że dożylne podawanie szczurom kompleksu metalotionein I i II z miedzią wywołuje trombocytopenię, co stoi w sprzeczności z naszymi wynikami [47]. Jednak w moich badaniach nie dysponuję oznaczeniami poziomu MTs w surowicy krwi pacjentów, co uniemożliwia potwierdzenie wpływu MTs na indukcję trombocytopenii. Zagadnienie to wymagałoby dalszych, bardziej zaawansowanych badań.

W wirusowych zapaleniach wątroby w miarę zaawansowania stanu choroby, obserwowana jest hipocholesterolemia oraz hipotriglicydemia [48-51]. Stężenie cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu HDL są więc pośrednio miarą prawidłowej funkcji wątroby, gdzie lipidy są w dużej części metabolizowane. W surowicy krwi są one transportowane w formie fosfolipidów, zbudowanych z hydrofobowego rdzenia lipidowego (estry cholesterolu i trójglicerydy) oraz polarnej powłoki zbudowanej z fosfolipidów, wolnego cholesterolu i białek zwanych apolipoproteinami [52]. Większość z 5 klas apolipoprotein (oprócz ApoA_{IV} oraz ApoB₄₈) są syntetyzowane w wątrobie, która ma również największy wpływ na gospodarkę lipidową organizmu ludzkiego [52]. W moich badaniach zaobserwowałem dodatnie korelacje pomiędzy izoformami *MT* a stężeniem cholesterolu całkowitego oraz HDL w surowicy krwi. Ponieważ stężenie frakcji cholesterolu bezpośrednio zależy od ilości apolipoprotein, wykazana korelacja sugeruje, iż wyższa ekspresja *MT* może być związana z lepszą zdolnością wątroby do metabolizmu lipidów i mniejszym zaawansowaniem przewlekłego zapalenia wątroby.

Podsumowując, można stwierdzić, że nasilenie ekspresji zarówno białka (*MT-I/II*) jak również poszczególnych izoform *MTs* w przewlekłych zapaleniach wątroby spowodowanych infekcją wirusami HBV i HCV jest zróżnicowana i w dalszym ciągu trudna do jednoznacznych interpretacji. Jednocześnie stwierdzenie obniżonego poziomu ekspresji *MT-I/II*, badanego z wykorzystaniem metody IHC, w hepatocytach preparatów z HBV oraz HCV, może świadczyć o jej ochronnej roli, być może w mechanizmie uszkodzenia wolnorodnikowego. Niewątpliwie, niezbędne są dalsze, precyzyjne badania, które pomogą wyjaśnić rolę białek z rodziny metalotionein w patogenezie zmian w przebiegu zakażeń wirusami HBV oraz HCV.

7. WNIOSKI

1. Obniżona ekspresja MT-I/II na poziomie białka, obserwowana w hepatocytach z infekcją HBV oraz HCV w porównaniu z grupą kontrolną, może świadczyć o udziale tych białek w patogenezie zmian związanych z przewlekłym zapaleniem wątroby o ww. etiologii.
2. Liczne korelacje z parametrami klinicznymi pod postacią stężenia bilirubiny, aktywności ALT, AST, fosfatazy alkalicznej, czasu APTT, aktywności PT, stężenia cholesterolu całkowitego i frakcji HDL, oraz wskaźnika płytek krwi w badaniu morfologii krwi mogą sugerować ochronną rolę wysokiej ekspresji MTs na hepatocyty pacjentów zakażonych HBV oraz HCV, być może przeciwdziałając ich uszkodzeniu.
3. Brak różnic w ekspresji wszystkich badanych izoform MT-I oraz MT-II, a także cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji immunohistochemicznej MT-I/II między pacjentami zakażonymi HBV oraz HCV świadczy o braku możliwości wykorzystania tych białek oraz ich genów jako markerów różnicujących oba typy wirusowego zapalenia wątroby.

8. STRESZCZENIE

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 procesem zapalnym o etiologii wirusowej.

9. SUMMARY

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.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Dziubek Z, Duszczyk E. Choroby zakaźne i pasożytnicze. Wyd. IV. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2017, 313 oraz 341–342.
2. Marcellin P. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver Int*, 2009; 29(1): 1-8.
3. Juszczak J, Mrukowicz J, Gajewski P. (red.) Ostre wirusowe zapalenie wątroby (WZW). (w) *Interna Szczeklika 2018, Medycyna Praktyczna, Kraków, 2018, 1144 –1153.*
4. www.mp.pl/pacjent/gastrologia/lista/65708,ryzyko-zakazenia-wzw-b, dostęp z dnia: 09.12.2021.
5. Noele NP, Easterbrook PJ, McMahon BJ. Epidemiology of hepatitis B virus infection and impact of vaccination on disease. *Clinics in Liver Disease*, 2016, 20(4): 607-628.
6. MacLachlan JH, Cowie BJ. Hepatitis B virus epidemiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015, 5(5): a021410.
7. Chee-Kin Hui, Lau GK. Treatment of Hepatitis Treatment of Hepatitis B e Antigen–negative Patients Current Treatment Options in *Gastroenterology*, 2007, 10: 474-482.
8. Hartleb M, Musialik J. Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B: epidemiologia, historia naturalna i możliwości terapeutyczne, *Medycyna po Dyplomie*, 2014, 09.
9. Klamann J, Smiatacz T: Diagnostyka wirusowych zapaleń wątroby w praktyce lekarza pierwszego kontaktu *Forum Medycyny Rodzinnej*, 2016, 10(2): 66–72.
10. Coppola N., Alessio L., Onorato L., Sagnelli C., Macera M., Sagnelli E, Pisaturo M. Epidemiology and management of hepatitis C virus infections in immigrant populations. *Infectious Diseases of Poverty*, 2019, 8: artykuł nr 17.

11. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015 Dec, 44(4): 717-734.
12. Simon K. (red). Zakaźne choroby wątroby i dróg żółciowych. Termedia, Poznań, 2011, 11-66.
13. Stępkowska IM. Właściwości biologiczne metalotionein i ich udział w procesach oksydoredukcyjnych w komórkach, ze szczególnym uwzględnieniem ośrodkowego układu nerwowego człowieka. *Postępy Biol. Komórki*, 2010, 37: 869-885.
14. Theocharis SE, Margeli AP and Koutselinis A. Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. *The International journal of biological markers*, 2002, 18(3): 162-169.
15. Vašák M. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of TraceElements in Medicine and Biology*, 2005, 19(1) 13-17.
16. Wierzowiecka B, Gomulkiewicz A, Cwynar-Zajac L, Olbromski M, Grzegorzolka J, Kobierzycki C, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P. Expression of Metallothionein and Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms in Breast Cancer Cells. *In Vivo*, 2016, 30(3): 271-278.
17. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*, 2004, 45(2): 103-118.
18. Romero-Isart N, Vašák M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 88(3): 388-396.
19. Bay BH, Jin R, Huang J, Tan PH. Metallothionein as a prognostic biomarker in breast cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 2006, 231(9): 1516-1521.

20. Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicological Sciences*, 2003, 73(2): 294-300.
21. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003, 533(1): 201-209.
22. Dziegiel P, Pula B, Kobierzycki C, Stasiolek M, Podhorska-Okolow M. Metallothioneins in Normal and Cancer Cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2016, Vol. 218.
23. Ostrakhovitch EA, Olsson PE, Jiang S, Cherian MG. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Letters*, 2006, 580(5): 1235-1238.
24. Ostrakhovitch EA, Olsson PE, von Hofsten J, Cherian MG. P53 mediated regulation of metallothionein transcription in breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, 102(6): 1571-1583.
25. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CmLS*, 2002, 59(4): 627-647.
26. Markant A., Pallauf J. Metallothionein and Zinc as Potential Antioxidants in Radical-Induced Lipid Peroxidation in Cultured Hepatocytes, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 1996, 10(2): 88-95.
27. Maret W, Vallee BL. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1998 Mar 31, 95(7): 3478-3482.
28. Ebadi M, Iversen PL, Hao R, Cerutis DR, Rojas P, Happe HK, Murrin LC, Pfeiffer RF. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int.* 1995 Jul, 27(1) :1-22.

29. Zheng H, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. Hepatocytes from metallothionein-I and II knock-out mice are sensitive to cadmium- and tert-butylhydroperoxide-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 1996 Oct, 87(2-3): 139-145.
30. Iszard MB, Liu J, Liu Y, Dalton T, Andrews GK, Palmiter RD, Klaassen CD. Characterization of metallothionein-I-transgenic mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995 Aug, 133(2): 305-312.
31. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell.* 1989 Dec 22, 59(6): 1145-1156.
32. Hagen TM, Huang S, Curnutte J, Fowler P, Martinez V, Wehr CM, Ames BN, Chisari FV. Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1994 Dec 20, 91(26): 12808-12812.
33. O'Connor KS, Parnell G, Patrick E, Ahlenstiel G, Suppiah V, van der Poorten D, Read SA, Leung R, Douglas MW, Yang JY, Stewart GJ, Liddle C, George J, Booth DR. Hepatic metallothionein expression in chronic hepatitis C virus infection is IFNL3 genotype-dependent. *Genes Immun.* 2014 Mar, 15(2): 88-94.
34. Remmele W, Stegner HE: Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*, 1987, 8(3): 138.
35. Grzegorzolka J, Biala M, Wojtyra P, Kobierzycki C, Olbromski M, Gomulkiewicz A, Piotrowska A, Rys J, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P. Expression of EMT Markers SLUG and TWIST in Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2015 Jul, 35(7): 3961-3968.

36. Quaife CJ, Cherne RL, Newcomb TG, Kapur RP, Palmiter RD. Metallothionein overexpression suppresses hepatic hyperplasia induced by hepatitis B surface antigen. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999 Mar 1, 155(2): 107-116.
37. Lu YY, Liang YD, Cheng J, Chen TY, Wang L, Liu Y, Li K, Zhang LX, Yang YP. [Mutual interaction between hepatitis B virus antigen and metallothionein]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2004 Sep, 12(9): 540-542.
38. Carrera G, Paternain JL, Carrere N, Folch J, Courtade-Saïdi M, Orfila C, Vinel JP, Alric L, Pipy B. Hepatic metallothionein in patients with chronic hepatitis C: relationship with severity of liver disease and response to treatment. *Am J Gastroenterol.* 2003 May, 98(5): 1142-1149.
39. Read SA, Parnell G, Booth D, Douglas MW, George J, Ahlenstiel G. The antiviral role of zinc and metallothioneins in hepatitis C infection. *J Viral Hepat.* 2018 May, 25(5): 491-501.
40. Arciello M, Gori M, Balsano C. Mitochondrial dysfunctions and altered metals homeostasis: new weapons to counteract HCV-related oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2013, 2013:971024.
41. Nagamine T, Suzuki K, Kondo T, Nakazato K, Kakizaki S, Takagi H, Nakajima K. Interferon-alpha-induced changes in metallothionein expression in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol.* 2005 Aug, 19(8): 481-486.
42. Nagamine T, Nakajima K. Significance of metallothionein expression in liver disease. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013, 14(4): 420-426.
43. Pan Y, Huang J, Xing R, Yin X, Cui J, Li W, Yu J, Lu Y. Metallothionein 2A inhibits NF- κ B pathway activation and predicts clinical outcome segregated with TNM stage in gastric cancer patients following radical resection. *J Transl Med.* 2013 Jul 19, 11: 173.

44. Werynska B, Pula B, Muszczyńska-Bernhard B, Gomulkiewicz A, Piotrowska A, Prus R, Podhorska-Okolow M, Jankowska R, Dziegiel P. Metallothionein 1F and 2A overexpression predicts poor outcome of non-small cell lung cancer patients. *Exp Mol Pathol*. 2013, Feb; 94(1): 301-308.
45. Ghorbel I, Elwej A, Chaabene M, Boudawara O, Marrakchi R, Jamoussi K, Boudawara TS, Zeghal N. Effects of acrylamide graded doses on metallothioneins I and II induction and DNA fragmentation: Biochemical and histomorphological changes in the liver of adult rats. *Toxicol Ind Health*. 2017 Aug, 33(8): 611-622.
46. Lian Y, Zhao J, Xu P, Wang Y, Zhao J, Jia L, Fu Z, Jing L, Liu G, Peng S. Protective effects of metallothionein on isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One*. 2013 Aug 13, 8(8): e72058.
47. Hayashi T, Sudo J. Thrombocytopenia and leukocytosis induced by single intravenous injections of cadmium-saturated metallothioneins-I and -II in rats. *J Toxicol Sci*. 1992 May, 17(2): 31-39.
48. Felmler DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses*. 2013, 5(5): 1292-1324.
49. Butt AA, Yan P, Simon TG, Chung RT, Abou-Samra AB; ERCHIVES study team. Changes in circulating lipids level over time after acquiring HCV infection: results from ERCHIVES. *BMC Infect Dis*. 2015 Nov 11, 15: 510.
50. Arain SQ, Talpur FN, Channa NA, Ali MS, Afridi HI. Serum lipid profile as a marker of liver impairment in hepatitis B Cirrhosis patients. *Lipids Health Dis*. 2017 Mar 1, 16(1): 51.

51. Su TC, Lee YT, Cheng TJ, Chien HP, Wang JD. Chronic hepatitis B virus infection and dyslipidemia. *J Formos Med Assoc.* 2004 Apr, 103(4): 286-291.

52. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984 Dec 1, 25(12): 1277-1294.