

Linda Piekuse

ENDOBIOTIĶU UN KSENOBIOTIĶU  
METABOLISMĀ IESAISTĪTO ENZĪMU  
KODĒJOŠO GĒNU POLIMORFISMI  
HRONISKA C VĪRUSHEPATĪTA  
UN AKŪTA TOKSISKA HEPATĪTA  
GADĪJUMĀ

Promocijas darbs  
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – molekulārā bioloģija, infektoloģija

Darba zinātniskais vadītājs:  
*Dr. med.* asociētais profesors **Jāzeps Keišs**



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs izstrādāts ar Eiropas sociālā fonda projekta  
“Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā  
grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu,  
vienošanās Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009.

Rīga, 2014

## ANOTĀCIJA

Cilvēka organismā neatdalīti viens no otra notiek endobiotiķu un ksenobiotiķu metabolisma ceļi. Olbaltumvielas, kas iesaistītas šajos ceļos, ir ļoti daudz, sākot ar fermentiem, kuriem tiešais substrāts ir endobiotiķis vai ksenobiotiķis, turpinot ar olbaltumvielām, kas regulē šos fermentus kodējošo gēnu darbību, un olbaltumvielām, kas iesaistītas šo vielu transportā šūnā un organismā (transporta olbaltumvielas, receptori). Galvenie atindēšanas procesi cilvēka organismā notiek aknās, un, ja tie ir izmainīti, tas var izraisīt aknu un citu orgānu bojājumu. Promocijas darbā tika apskatīti divi biežākie aknu bojājuma izraisītāji un to sekas – alkohola izraisīts aknu toksisks bojājums un C vīrushepatīta izraisīts hronisks aknu bojājums.

Pētījumā tika iekļauti 60 pacienti ar akūtu toksisku alkohola izraisītu hepatītu un tika analizēti pacientu bioķīmiskie rādītāji, kā arī gēnu *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1*, *GSTP1*, *MTHFR*, *UGT1A1*, *NAT2* un *ALDH2* funkcionālie polimorfismi un to saistība ar bioķīmiskajiem rādītājiem. Tika noskaidrots, ka sievietēm akūtam alkohola izraisītam hepatītam ir smagāka klīniskā norise. Akūta toksiska hepatīta smagumu var noteikt, izmantojot protrombīna laiku, un papildus tradicionālajiem rādītājiem būtu nepieciešams noteikt sārmaino fosfatāzi.

Analizējot ģenētiskos marķierus, akūta toksiska hepatīta pacientiem biežāk bija sastopams *GSTT1* nulles genotips, bet savukārt pacientiem, kuri mira no toksiska aknu bojājuma, biežāk bija lēnu acetilēšanu nosakošās alēles. Lēnā acetilēšana (nosaka gēna *NAT2* kodētais enzīms) arī ir saistīta ar augstākiem aknu bojājumu raksturojošajiem bioķīmiskajiem rādītājiem (GGT un sārmainās fosfatāzes līmeni).

Pētījumā tika iekļauti 233 pacienti ar hronisku C vīrushepatītu, 162 pacienti saņēma antivirālo terapiju. Pētījuma grupā tika analizēti morfoloģiskie, bioķīmiskie un ģenētiskie faktori (*GSTT1*, *GSTM1*, *UGT1A1*, *CCR5*, *SERPINA1*, *ATP7B*, *HFE* gēnos esošie polimorfismi). Tika noskaidrots, ka papildus esošajiem bioķīmiskajiem rādītājiem pacientiem terapijas efektivitāti palīdz prognozēt hialuronskābe un citokeratīna-18 līmenis. No ģenētiskajiem marķieriem vīrushepatīta C klīnisko gaitu ietekmē *GSTM1* gēna nulles genotips, *CCR5* gēna un *SERPINA1* polimorfismi.

## ANNOTATION

Endo- and xenobiotic metabolism pathways are not separated in the human body. Proteins involved in these pathways are including many proteins starting with the enzymes, which direct substrate are endo- or xenobiotic, followed by proteins, that regulates enzyme and their coding gene activity and proteins involved in the transport of these substances in the cell and the body (transport proteins receptors). The main detoxification processes in the human body are ongoing in the liver, and if they are changed, it can cause liver and other organ damage. The thesis are discussed two most common causes of liver injury and its consequences – alcohol induced liver toxicity and hepatitis C virus-induced chronic liver damage.

Study subjects comprised 60 patients with acute alcohol induced hepatitis. Eight genetic markers of the genes *UGT1A1*, *GSTA1*, *GSTP1*, *NAT2*, *GSTT1* and *GSTM1* were genotyped. There were analysed biochemical markers and their association with clinical outcome of toxic hepatitis as well as with analysed genetic markers. In our study was proved that female gender is risk factor for alcohol toxic hepatitis. Prothrombin and alkaline phosphatase could be used as markers for severity of hepatitis. *GSTT1* null genotype was identified as a risk allele for alcohol toxic hepatitis progression. *GSTT1* null genotype was found to correlate negatively with the level of prothrombin and positively with hyaluronic acid. For patients who died of toxic liver damage more frequent slow acetylation encoding alleles (*NAT2* gene) were found, that were associated also with higher levels of GGT and alkaline phosphatase.

There were 233 patients included in the study with chronic viral hepatitis C, 162 of them received antiviral therapy. In the case group morphological, biochemical and genetic factors (polymorphisms in genes *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT1A1*, *CCR5*, *SERPINA1*, *ATP7B*, *HFE*) were analysed. There was discovered that higher levels of hyaluronic acid and GGT, leukocyte count and more progressed fibrosis are associated with lower possibility to reach sustained viral response. Hyaluronic acid and cytokeratine-18 should be included in non-invasive tests in order to predict sustained viral response. From analysed genetic markers clinical outcome of chronic viral hepatitis C were influenced by *GSTM1* null genotype and polymorphisms in the *CCR5* and *SERPINA1* genes.

# SATURS

Darbā lietotie saīsinājumi .....	6
<b>1. Ievads</b> .....	8
1.1. Zinātniskā darba aktualitāte un novitāte .....	8
1.1.1. Akūts toksisks alkohola hepatīts .....	8
1.1.2. Hronisks C vīrushepatīts .....	10
1.2. Sadarbības partneri .....	12
1.3. Darba struktūra un apjoms .....	12
1.4. Ētiskie apsvērumi .....	12
1.5. Zinātniskā darbā izvirzītā hipotēze .....	12
1.6. Zinātniskā darba mērķis .....	12
1.7. Zinātniskā darba mērķa sasniegšanai nepieciešamie pētījumu uzdevumi .....	13
<b>2. Literatūras apskats</b> .....	14
2.1. Akūts toksisks alkohola izraisīts hepatīts .....	15
2.2. Alkohola (etanola) metabolisms cilvēka organismā .....	16
2.2.1. Alkohola oksidatīvais metabolisms .....	16
2.2.2. Alkohola neoksidatīvais metabolisma ceļš .....	20
2.2.3. Alkohola metabolisma sekas organismā .....	20
2.3. Akūta toksiska alkohola hepatīta aknu bojājuma noteikšana .....	23
2.4. C vīrushepatīta epidemioloģija Latvijā un pasaulē .....	24
2.5. Akūta un hroniska CVH infekcija .....	26
2.6. C vīrushepatīta ārstēšana .....	27
2.7. Antioksidantu sistēmas, to ģenētika cilvēka organismā .....	32
2.7.1. Glutaciona S-transferāzes .....	33
2.7.2. Metilēntetrahidrofolāt reduktāze (MTHFR) .....	37
2.7.3. N-acetil transferāzes (NAT2) .....	37
2.7.4. Bilirubīns .....	38
<b>3. Materiāls un metodes</b> .....	39
3.1. Materiāls .....	39
3.1.1. Ētika .....	39
3.1.2. Akūta toksiska hepatīta pacienti .....	39
3.1.3. Kontroles grupa akūta toksiska hepatīta pacientiem .....	39
3.1.4. Hroniska CVH pacienti .....	40
3.1.5. CVH pacientiem kontroles grupa .....	42
3.2. Metodes .....	42
3.2.1. Ģenētiskā materiāla izdalīšana .....	42
3.2.2. Ģenētisko marķieru atlase un analīzes metodes akūta toksiska hepatīta pacientiem .....	42
3.2.3. Ģenētisko marķieru atlase un analīzes metodes hroniska CVH pacientiem .....	44
3.2.4. Ģenētisko marķieru molekulārai analīzei izmantotās metodes .....	45
3.3. Datu statistiskā apstrāde .....	47
3.3.1. Genotipēšanas datu kvalitātes kontrole .....	48
3.3.2. Asociācijas analīze .....	48
3.3.3. Bioķīmisko un klīnisko datu apstrāde .....	49
<b>4. Rezultāti</b> .....	50
4.1. Akūta toksiska hepatīta pacientu raksturojums .....	50

4.2. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā, salīdzinot ar kontroles grupu .....	52
4.3. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā, salīdzinot letālu un neletālu iznākumu .....	53
4.4. Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem akūta toksiska hepatīta pacientiem .....	54
4.5. CVH pacientu raksturojums .....	57
4.6. CVH pacientu atbildes reakcija uz antivirālo terapiju .....	59
4.7. Bioķīmisko rādītāju izmaiņas saņemot antivirālo terapiju .....	60
4.8. CVH pacientu ģenētiskais raksturojums salīdzinājumā ar kontroles grupu ...	61
4.9. Ģenētisko marķieru analīze pacientiem, kuri ir saņēmuši terapiju .....	62
4.10. Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem un klīniskajiem rādītājiem pirms antivirālās terapijas .....	65
<b>5. Diskusija</b> .....	67
5.1. Aknu bojājumu nosakošie klīniskie un bioķīmiskie rādītāji akūta toksiska alkohola hepatīta pacientiem .....	67
5.2. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientiem .....	69
5.2.1. GSTs kodējošo ģēnu nozīme akūta toksiska hepatīta attīstībā .....	69
5.2.2. NAT2 ģēna polimorfismu nozīme akūta toksiska hepatīta attīstībā ...	71
5.2.3. UGT1A1 ģēna polimorfismu nozīme akūta toksiska hepatīta attīstībā .....	71
5.3. Hronisks vīrus hepatīts C .....	72
5.3.1. Hronisku CVH pacientu bioķīmiskais raksturojums un salīdzinājums starp dzimumiem .....	72
5.3.2. Bioķīmisko rādītāju salīdzinājums starp pacientu grupām, kas saņēma terapiju .....	74
5.3.3. Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu grupā un to ietekme uz slimības gaitu .....	75
<b>6. Secinājumi</b> .....	84
Publikācijas un ziņojumi par pētījuma tēmu .....	85
<b>Izmantotā literatūra</b> .....	88
Pielikums 1 (Ētikas atļauja) .....	106
Pielikums 2 (Alēļu kombināciju analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā salīdzinājumā ar kontroles grupu) .....	108
Pielikums 3 (alēļu asociācija totālajiem neatbildētājiem salīdzinājums starp dzimumiem .....	112

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

ADH – alkohola dehidrogenāze

ALAT – alanīnaminotransferāze

ALDH – acetaldehīddehidrogenāze

AntiHCV – antivielas pret hepatīta C vīrusu

ASAT – aspartātaminoatsferāze

BETA – regresijas koeficients

BKUS – Bērnu Klīniskā universitātes slimnīca

CI 95% – 95% ticamības intervāls (*confidence interval 95%*)

CVH – C vīrushepatīts

dbSNP – SNP datubāze <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

ELISA – enzīmu imūnabsorbcijas tests (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

GGT – gamma–glutamilttransferāze

GST – glutationa S transferāze

GSTA – glutationa S transferāze alfa klase

GSTM – glutationa S transferāze mi klase

GSTP – glutationa S transferāze pi klase

GSTT – glutationa S transferāze teta klase

HAI – histoloģiskās aktivitātes indekss

HCV – hepatīta C vīruss

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss (*human immunodeficiency virus*)

Ig A – imūnglobulīns A

INR – starptautiskais standartizētais rādītājs (*international normalized ratio*)

Kb – kilobāze

MAF – retākās alēles biežums (*minor allele frequency*)

MTHFR – metilēntetrahidrofolāta reduktāze

NAD – nikotīnamīda adenīna dinukleotīds

NADH – nikotīnamīda adenīna dinukleotīda reducētā forma

OMIM – tiešsaistes datubāze pazīmēm, kuras iedzimst pēc Mendēļa likumiem

(*Online Mendelian Inheritance of Man*) – [www.omim.org](http://www.omim.org)

OR – izredžu attiecība (*odds ratio*)

p – p vērtība

PCR – polimerāzes ķēdes reakcija (*polymerase chain reaction*)

PKUS – Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca

RAKUS – Rīgas Austrumu Klīniskā universitātes slimnīca

RFLP – restrikcijas fragmentu garuma analīze (*restriction fragment length polymorphism analysis*)

RNS – ribonukleīnskābe

SVR – noturīga virusoloģiska atbilde (*sustained virological response*)

$\chi^2$  – hī kvadrāts

# 1. IEVADS

## 1.1. Zinātniskā darba aktualitāte un novitāte

Cilvēka organismā neatdalīti viens no otra notiek endobiotiķu (organismā, normāla metabolisma gadījumā veidotu vielu, piemēram, bilirubīna) un ksenobiotiķu (no ārvides uzņemtas vielas, piemēram, medikamenti, uzturā lietoti produkti) metabolisma ceļi. Olbaltumvielas, kas iesaistītas šajos ceļos, ir ļoti daudz un dažādas, sākot ar fermentiem, kuriem tiešais substrāts ir endobiotiķis vai ksenobiotiķis, turpinot ar olbaltumvielām, kas regulē šos fermentus kodējošo gēnu darbību, un olbaltumvielām, kas iesaistītas šo vielu transportā šūnā un organismā (transporta olbaltumvielas, receptori) [Omięcinski, 2011].

Cilvēka organismā galvenie atindēšanas procesi notiek aknās, kas pasargā citas organisma šūnas un arī pašas aknu šūnas no endo– un ksenobiotiķu tiešas un arī netiešas kaitīgās ietekmes, piemēram, oksidatīvā stresa. Ja tiek izmainīts to metabolisms aknās, tas var ietekmēt aknu bojājuma veidošanos un slimības tālāko attīstību, tai skaitā reakciju uz terapiju.

Vieni no biežākajiem aknu bojājuma izraisītājiem ir alkohols un hepatīta C vīruss (HCV) gan Latvijā, gan pasaulē (Slimību profilakses un kontroles centra un Pasaules veselības organizācijas dati). Alkohols un hepatīta C vīruss izraisa gan akūtu aknu bojājumu, gan hronisku. Pētījumā tika iekļauti akūta toksiska alkohola hepatīta un hroniska C vīrushepatīta (CVH) pacienti. Analizējot iesaistīto enzīmu kodējošo gēnu funkcionālos polimorfismus akūta alkohola toksiska hepatīta un hroniska CVH gadījumā, būtu iespējams atrast ģenētiskos marķierus, kas ļautu precīzāk prognozēt slimību gaitu. Latvijā nav veikti ģenētiskie pētījumi, akūta toksiska hepatīta pacientu grupā, bet veiktajos hroniska CVH pacientu grupā ir analizēti citi ģenētiskie marķieri [Eglite, 2011; Jēruma, 2012; Tolmane, 2012a].

### 1.1.1. Akūts toksisks alkohola hepatīts

Akūta toksiska alkohola izraisīta hepatīta izpēte ir nozīmīga, jo ir saistīta ar augstu mirstību stacionārā ~65% [Mathurin, 2003a]. Pašlaik ir zināmi vairāki riska faktori, kas ietekmē aknu bojājuma smaguma pakāpi akūta alkohola izraisīta toksiska



hepatīta gadījumā, piemēram, lietotā alkohola daudzums, tā piedevas, uzturs vai tā trūkums, kā arī dzimums – smagāk tas izpaužas sievietēm [Stewart, 2001]. Akūtam toksiskam alkohola izraisītam hepatītam ir nozīmīga vieta saslimstības un mirstības statistikā arī Latvijā. Analizējot mirstības rādītājus, mirušo skaitu uz 100 000 iedzīvotājiem, kuru nāves iemels bijis alkohols (gan ilgstošā tā lietošana, gan arī nejaušas saindēšanās gadījumos), ir vērojama saslimstības pieaugšana 2006. gadā (471 mirušo 2006. gadā, salīdzinoši – 2005. gadā – 371, 2004. gadā – 338 (Centrālās statistikas pārvaldes dati)), ko ir izraisījusi plaša saindēšanās ar nelegālo alkoholu Austrumeiropā, tai skaitā arī Latvijā, kuru, iespējams, ir izraisījusi saindēšanās ar poliheksametilēn-guanidīna hidrohlorīdu (*Polyhexamethyleneguanidine hydrochloride*) [Ostapenko, 2011], bet šis toksiskais piejaukums nelegālajam alkoholam Latvijā laboratoriski netika identificēts.

Akūts alkohola izraisīts toksisks hepatīts attīstās ilgstošas alkohola lietošanas, lielu alkohola devu lietošanas gadījumā, vai no dažādām, piedevām nelegālajam alkoholam. Kā arī tāpēc, ka indivīdam ir samazinātas alkohola atindēšanas spējas, ko nosaka gan ģenētiski faktori (tieši alkohola metabolismā iesaistītie enzīmi un netieši iesaistītie enzīmi, kas samazina oksidatīvo stresu šūnā, kas veidojies alkohola lietošanas rezultātā) vai neģenētiskie faktori (alkohola daudzums, uzturs u.c.).

Alkohola metabolisms organismā ierosina daudzas bioķīmiskās reakcijas, kas izraisa alkoholiķiem raksturīgos audu bojājumus un slimības. To iemesls ir hipoksija aknu audos, dažādu toksisku savienojumu veidošanās, brīvo skābekļa radikāļu formēšanās un izmaiņas šūnas oksidēšanās – reducēšanās statusā, kas rada oksidatīvo stresu šūnās un vēlāk rada to bojājumu [Zakhari, 2006]. Lai novērstu brīvo skābekļa radikāļu veidoto šūnas bojājumu, šūnās darbojas vairāki aizsargmehānismi: mehāniski un bioķīmiski. Mehānisko aizsardzību veido šūnu un organoīdu membrānas. Bet bioķīmisko aizsardzību veido reparācijas mehānismi, antioksidanti, enzīmi (superoksīdismutāze, katalāze, peroksīdāze u.c.) un mazmolekulāri antioksidanti (glutations, urīnskābe, bilirubīns, histidīna dipeptīds, lipoīlskābe u.c.) [Kohen, 2002].

Akūta toksiska hepatīta klīniskā smaguma novērtēšanai Eiropā tiek izmantotas vairākas skalas, kas iekļauj bioķīmiskos rādītājus, piemēram, bilirubīna līmeni, protrombīna laika/ INR attiecību, kreatinīna/urīnvielas attiecību, leukocītu skaitu, albumīna līmeni, pacienta vecumu [Mathurin, 2012]. Latvijas Patentu valdē 2012. gadā ir reģistrēts patents "Akūta alkohola hepatīta gaitas prognozēšanas paņēmieni"

(LV14471B), kas iesaka izmantot endogēno endotoksīnu serdes IgA antivielu koncentrāciju noteikšanu ar ELISA metodi, konstatējot endogēno serdes endotoksīnu IgA antivielu līmeni serumā 410 AMU/ml un augstāk, kas prognozē pasliktināšanos akūta alkohola hepatīta gaitā līdz pat letālam iznākumam, kā arī 2009. gadā izdots patents, kas iesaka izmantot citohromu C alkohola hepatīta gaitas prognozēšanai (LV13855B) – tā palielināšanās virs 1,1 ng/ml saistāma ar akūta toksiska hepatīta klīnisko simptomu pieaugumu vai terapijas neefektivitāti.

Ģenētisko faktoru analīzes rezultāti alkohola izraisīta aknu bojājuma gadījumā ir pretrunīgi [STICKEL, 2006], tāpēc darbā tika plānots izpētīt glutaciona metabolismā iesaistīto enzīmu kodējošo gēnu (*GSTT1*, *GSTMI*, *GSTAI*, *GSTP1*) polimorfismu, bilirubīna metabolismā iesaistīto enzīmu kodējošā gēna *UGT1A1*, homocisteīna vielmaiņā iesaistītā metilēntetrafolātoreduktāzes (*MTHFR*) kodējošā gēna *MTHFR*, alkohola metabolismā iesaistītā acetaldehīddehidrogenāzes kodējošā *ALDH2* gēna un N-acetilēšanā iesaistītā kodējošā gēna (*NAT2*) polimorfismus saistībā ar akūtu toksisku alkohola izraisītu hepatītu.

### 1.1.2. Hronisks C vīrushepatīts

Pašlaik pasaulē varētu būt ~3% (~130–210 miljonu) iedzīvotāju, kuriem ir CVH. Latvijā plašākais populācijas pētījums, lai noskaidrotu CVH prevalenci Latvijā, tika veikts 2008. gadā. Tajā tika noskaidrots, ka HVC antivielas (anti-HCV) ir sastopamas 2,4%, bet RNS 1,7% Latvijas iedzīvotāju, kas nozīmē, ka Latvijā ir aptuveni 39 000 CVH pacientu [Tolmane, 2012a; Tolmane, 2011].

CVH izraisa hepatīta C vīruss (HCV), kuram ir zināmi 6 genotipi un vairāki apakštipi [Simmonds, 2005]. Visbiežāk sastopamais ir 1. genotips. Vīrusa genotipam ir loma slimības progresēšanā, kā arī atbildes reakcijā uz antivirālo terapiju, kaut gan precīza tā loma nav zināma [Poynard, 2003b].

3/4 CVH pacientu akūtajā infekcijas periodā nav nekādu klīniski izteiktu hepatītam raksturīgu simptomu. Apmēram 80% slimnieku akūtais hepatīts pāriet hroniskā formā, kas var progresēt, ja CVH netika ārstēts, tad 1/4 hronisko pacientu 15–20 gadu laikā attīstās aknu ciroze vai vēzis. Hronisks CVH raksturojas ar dažādas smaguma pakāpes aknu iekaisuma un fibrozes progresēšanu neatkarīgi no HCV genotipa un vīrusa slodzes [EASL, 2011]. Kā riska

faktori tiek minēti alkohola lietošana [Omiecinski, 2011], cukura diabēts [White, 2008], lielāks vecums, kad notikusi inficēšanās, ko–infekcija ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV) vai citiem hepatotropiem vīrusiem. Atkarībā no dažādu faktoru kombinācijām un neārstēšanas gadījumā ~10–40% pacientu attīstās aknu ciroze [Afdhal, 2004] un ~4% pacientu iestājas nāve no cirozes izraisītām komplikācijām [Thompson Coon, 2007].

Hroniska CVH antivirālās terapijas mērķis ir vīrusa eradikācija, kurai vajadzētu novērst slimības tālāku attīstību un komplikāciju veidošanos. Veiksmīga terapija ir, ja tiek sasniegta noturīga virusoloģiska atbilde (SVR – *sustained viral response*) – 24 nedēļas pēc terapijas beigām nav nosakāms HCV RNS asinīs [Ghany, 2011].

Standarta terapijai visiem vīrusa genotipiem tiek kombinēts pegilētais interferons un ribavirīns [EASL, 2011] – noturīga virusoloģiska atbilde tiek sasniegta 40–50% pacientu ar 1. genotipu, un ~80% ar 2. un 3. genotipu [Ghany, 2011].

Latvijā, tāpat kā pasaulē, standarta antivirālā terapija sastāv no ribavirīna un pegilētā interferona 2a vai 2b kombinācijas [EASL, 2011; Zāļu aģentūras rekomendācijas, 2005]. Antivirālo terapiju ietekmējošie faktori ir gan no vīrusa genotipa atkarīgi, gan pacienta ģenētiskiem marķieriem (piemēram, *IL28B* [EASL, 2011; Ghany, 2011]), gan citiem pacienta faktoriem – svars [Bressler, 2003], alkohola lietošana [Anand, 2006], insulīna rezistence [Romero–Gomez, 2005], aknu bojājuma pakāpe un citi [Manns, 2006].

Hroniska CVH atbildes reakcija uz antivirālo terapiju ir atkarīga arī no aknu šūnu iekaisuma, kuru var ietekmēt gēnu polimorfismi, kas ir saistīti ar dažādu mikroelementu vielmaiņas izmaiņām, piemēram, dzelzs (tā metabolismu ietekmē gēns *HFE* [Pietrangelo, 2004]), vara (tā metabolismu ietekmē gēns *ATP7B* [Harris, 2000]), dažādu aknu enzīmu sintēzes izmaiņu (piemēram, alfa 1–antitripsīna, kuru kodē gēns *SERPINA1* [Kidd, 1983]), glutationa S transferāzes (piemēram, *GSTT1* un *GSTM1*), mazmolekulārie antioksidanti (piemēram, bilirubīns un tā metabolismu ietekmējošais gēns *UGT1A1* [Bosma, 1995; Datta, 2012]), un receptori uz leukocītu virsmas, kas ietekmē imunitāti (piemēram, hemokīna CC receptors, kuru kodē gēns *CCR5* [Katsounas, 2012]). Pētījumā tika noteiktas šo gēnu polimorfismu ietekme uz hroniska CVH klīnisko gaitu.

## **1.2. Sadarbības partneri**

Darbs tika izstrādāts RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskajā laboratorijā, sadarbojoties ar SIA Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas stacionāru Latvijas Infektoloģijas centrs un APP Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru.

## **1.3. Darba struktūra un apjoms**

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā. Darbā ir 112 lappuses. Literatūras sarakstā ir autoru un autoru kolektīvu darbi. Promocijas darbs ir uzrakstīts ar 12. izmēra simboliem un 1,5 rindu atstarpēm, satur 22 tabulas un 6 attēlus.

## **1.4. Ētiskie apsvērumi**

Atļauju veikt pētījumu izsniegusi RSU medicīnas ētikas komiteja un LR Centrālās Ētikas komiteja (skatīt pielikumā 1)

## **1.5. Zinātniskā darbā izvirzītā hipotēze**

Endo– un ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto enzīmu aktivitātes izmaiņas, ko izraisa funkcionāli polimorfismi to kodējošajos gēnos, un to savstarpējā mijiedarbība ietekmē akūta toksiska hepatīta un hroniska C vīrushepatīta attīstību un gaitu, kā arī atbildes reakciju uz medikamentozo (t.sk. antivirālo) terapiju.

## **1.6. Zinātniskā darba mērķis**

Noskaidrot ģenētiskos un neģenētiskos riska faktorus, kas ietekmē akūta toksisku alkohola hepatīta un hroniska C vīrushepatīta prognozi un terapijas iznākumu.

## 1.7. Zinātniskā darba mērķa sasniegšanai nepieciešamie pētījumu uzdevumi

Darba mērķa sasniegšanai nepieciešams veikt sekojošus darba uzdevumus:

- 1) Izveidot pacientu grupas: akūta alkohola toksiska hepatīta un hroniska C vīrushepatīta grupa. No pacientu slimības vēsturēm un ambulatorajām kartēm apkopot pacientu slimību un tās smagumu raksturojošos bioķīmiskos un morfoloģiskos rādītājus. Atlasīt atbilstošas kontroles grupas katrai no pacientu grupām.
- 2) Noteikt neģenētiskos riska faktoros, kas ietekmē akūta toksiska alkohola hepatīta klīnisko gaitu, analizējot bioķīmiskos datus, kas raksturo slimības gaitu.
- 3) Noteikt gēnu *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTA1*, *GSTP1*, *MTHFR*, *UGT1A1*, *NAT2* un *ALDH2* funkcionālos polimorfismus akūta toksiska hepatīta pacientiem un atbilstošajai kontroles grupai, to asociāciju ar bioķīmiskajiem rādītājiem un slimības klīnisko gaitu.
- 4) Noteikt faktoros, kas ietekmē hroniska CVH klīnisko gaitu un antivirālās terapijas efektivitāti, analizējot bioķīmiskos, morfoloģiskos un citus rādītājus no pacientu ambulatorajām kartēm.
- 5) Noteikt gēnu *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT1A1*, *CCR5*, *HFE*, *ATP7B*, *SERPINA1* polimorfismus hroniska CVH pacientiem un atbilstošai kontroles grupai, analizēt to asociāciju ar bioķīmiskajiem un citiem slimības gaitu raksturojošajiem klīniskajiem rādītājiem no pacientu ambulatorajām kartēm.

## 2. LITERATŪRAS APSKATS

Endobiotiķi ir vielas, kas veidojas cilvēka organismā, bet, ja tās veidojas pārāk lielā daudzumā kā normā būtu nepieciešams, tās kļūst par ksenobiotiķiem. Ksenobiotiķi ir arī vielas, kuras ir svešas cilvēka organismam, un tiek uzņemtas no apkārtējās vides. Cilvēka organismā neatdalīti viens no otra notiek endobiotiķu un ksenobiotiķu metabolisma ceļi. Olbaltumvielu, kas iesaistītas šajos ceļos, ir ļoti daudz un dažādas, sākot ar fermentiem, kuriem tiešais substrāts ir endobiotiķis vai ksenobiotiķis, turpinot ar olbaltumvielām, kas regulē šos fermentus kodējošo gēnu darbību, un olbaltumvielām, kas iesaistītas šo vielu transportā šūnā un organismā, piemēram transporta olbaltumvielas un receptori [*Omięcinski, 2011*]. Endo- un ksenobiotiķu metabolismā iesaistītos enzīmus iedala I un II fāzes enzīmos. Pie pirmās fāzes, galvenokārt, oksidācijas enzīmiem pieder citohroma P450 (CYP) enzīmu sistēma (kas izvietoti gan endoplazmatiskajā tīklā, gan mitohondrijos), alkohola dehidrogenāze (ADH), aldehīddehidrogenāze (ALDH) u.c. Pie II fāzes enzīmiem pieder olbaltumvielas, kas katalizē konjugāciju, piemēram, ar glikuronskābi (enzīms UGT1A1), glutationu (enzīmi – glutationa-S-transferāzes (GST)), etiķskābi (N-acetiltransferāzes (NAT)).

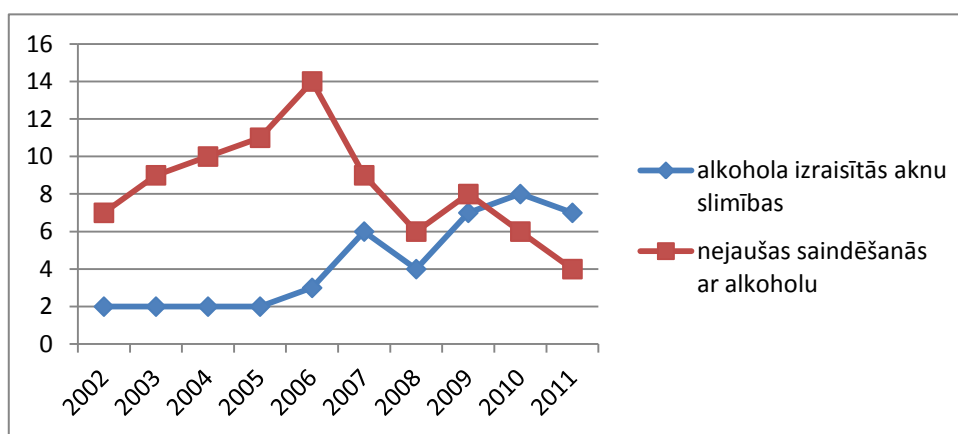
Izmaiņas šo enzīmu kodējošajos gēnos, ietekmē arī organisma atindēšanas spējas un var izraisīt tā bojājumu. Galvenie atindēšanas procesi notiek aknās, tāpēc izmainīts ksenobiotiķu atindēšanas process, var pastiprināt aknu bojājumu, kā arī ietekmēt slimības tālāko attīstību, tai skaitā reakciju uz terapiju.

Hepatīts ir aknu audu iekaisums, klīniskā izpausme ir variabla, var būt arī asimptomātiska, bet biežākie simptomi ir dažādas pakāpes dzelte, apetītes trūkums un slikta dūša [*EASL, 2012*]. Pēc norises ilguma izšķir akūtu hepatītu, kas ilgst līdz sešiem mēnešiem, un hronisku, ja tas norit ilgāk par sešiem mēnešiem. Visbiežākie hepatītu izraisītāji ir vīrusi, bet to var izraisīt arī dažādas toksiskas vielas (piemēram, alkohols, medikamenti, augi u.c.), kā arī citas infekcijas (ne hepatītu vīrusu izraisītas) un autoimūnas slimības [*Mathurin, 2012*]. Vieni no biežākajiem aknu bojājuma izraisītājiem ir alkohols un HCV gan Latvijā, gan pasaulē (Slimību profilakses un kontroles centra un Pasaules veselības organizācijas dati). Pētījumā tika iekļauti akūta toksiska alkohola hepatīta un hroniska CVH pacienti. Analizējot iesaistīto enzīmu

kodējošo gēnu funkcionālos polimorfismus akūta toksiska alkohola hepatīta un hroniska CVH, būtu iespējams atrast ģenētiskos marķierus, kas ļautu precīzāk prognozēt slimību gaitu. Latvijā nav veikti ģenētiskie pētījumi, akūta toksiska hepatīta pacientu grupā, bet veiktajos hroniska CVH pacientu grupā ir analizēti citi ģenētiskie marķieri [Eglite, 2011; Jērums, 2012; Tolmane, 2012a].

## 2.1. Akūts toksisks alkohola izraisīts hepatīts

Akūta toksiska alkohola izraisīta hepatīta izpēte ir nozīmīga, jo ir saistīta ar augstu mirstību stacionārā ~65% [Mathurin, 2003b]. Pašlaik ir zināmi vairāki riska faktori, kas ir saistīti ar aknu bojājumu, piemēram, lietotā alkohola daudzums, uzturs vai tā trūkums un dzimums – smagāk tas izpaužas sievietēm [Stewart, 2001]. Akūtam toksiskam alkohola izraisītam hepatītam ir nozīmīga vieta arī Latvijas mirstības statistikā. Analizējot mirušo skaitu uz 100 000 iedzīvotājiem, kuru nāves iemels bijis alkohols, gan ilgstoša tā lietošana, gan arī nejauša saindēšanās, ir vērojams mirstības pieaugums 2006. gadā (skatīt 2.1. attēlu), ko domājams ir izraisījusi plaša saindēšanās ar nelegālo alkoholu Austrumeiropā, tai skaitā arī Latvijā, kuru, iespējams, ir izraisījusi saindēšanās ar poliheksametilenguanidīna hidrohlorīdu [Ostapenko, 2011], toksiskais piejaukums nelegālajam alkoholam Latvijā laboratoriski netika identificēts.



2.1.att. **Mirušo skaits uz 100 000 iedzīvotājiem, kuru nāves iemels bijis alkohols.**  
LR Centrālās Statistikas pārvaldes dati no 2002. līdz 2009. gadam, Nacionālā Veselības dienesta dati no 2010. līdz 2011. gadam.

Akūts alkohola izraisīts toksisks hepatīts bieži attīstās no toksiskajām piedevām nelegālajam alkoholam, ilgstošas alkohola lietošanas, lielu alkohola

daudzuma lietošanas gadījumā vai arī tāpēc, ka indivīdam ir samazinātas alkohola atindēšanas spējas [EASL, 2012].

## 2.2. Alkohola (etanola) metabolisms cilvēka organismā

Cilvēka organisma spēja pārstrādāt alkoholu ir, galvenokārt, ir ģenētiski noteikta un apmēram 90% alkohola tiek metabolizēts aknās. Alkohola ietekmi uz dažādiem audiem nosaka tā koncentrācija asinīs, kas liecina arī par to, cik ātri alkohols tiek absorbēts, metabolizēts un izvadīts no organisma. Pēc alkohola norīšanas, pirmkārt, tas tiek absorbēts kuņģī un tievajās zarnās un ar venozajām asinīm "nonāk" aknās, kur dažādu enzīmu ietekmē notiek tā metabolizēšana. Alkohola absorbcijas ātrumu un tā koncentrāciju asinīs ietekmē neģenētiskie faktori un ģenētiskie faktori (alkohola metabolismā tieši iesaistīto enzīmu – alkohola dehidrogenāzes (ADHs) un acetaldehīda dehidrogenāzes (ALDHs) kodējošie gēni, to alēles). Neģenētisko faktoru loma alkohola vielmaiņā ir liela, jo, pat salīdzinot cilvēkus ar vienādu *ADH* genotipu, novērots, ka to alkohola izvadīšanas ātrums no organisma atšķiras pat četras reizes [O'Connor, 1998].

Alkohols/ etanols tiek metabolizēts, galvenokārt, oksidatīvā ceļā (iesaistītie enzīmi ir – ADH, citohroma P450 sistēma (CYP2E1), katalāze, ALDH), bet mazākā mērā neoksidatīvā ceļā.

### 2.2.1. Alkohola oksidatīvais metabolisms

Alkohola oksidatīvais metabolisms šūnās notiek citoplazmā, mitohondrijos un peroksisomās [Zakhari, 2006]. Etanola pārveidošana acetaldehīdā notiek gan citosolā, gan peroksisomās, gan endoplazmatiskā tīkla veidotos pūslīšos citoplazmā. Citoplazmā esošais enzīms ADH katalizē etanola oksidāciju par aldehīdu. Šajā reakcijā iesaistās arī elektronu pārnēsētājs – nikotīnamīdadenīdinukleotīds ( $\text{NAD}^+$ ), kas reakcijas laikā reducējas, veidojot NADH. Tiek uzskatīts, ka ADH ceļu iziet ~70% no etanola, un, galvenokārt, to veic ADH I klases izoenzīmi [Haseba, 2010]. Savukārt peroksisomās esošā katalāze oksidē etanolu, izmantojot ūdeņraža peroksīdu ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Endoplazmatiskā tīklā esošā citohroma P450 sistēmas enzīms – CYP2E1 etanola metabolismā iesaistās tikai gadījumos, kad ir palielināta etanola koncentrācija,



kā arī ilgstošas alkohola lietošanas gadījumā. Acetaldehīdu tālāk metabolizē, galvenokārt, acetaldehīddehidrogenāze 2 (ALDH2), kas ir aktīva mitohondrijos, veidojot acetātu un NADH.

Oksidatīvais process ietelmē elektronu pārnēsēju – NAD<sup>+</sup>, kas tiek reducēts ar diviem elektroniem, veidojot NADH. Rezultātā alkohola oksidēšanas procesi veido izteikti reducētu vidi hepatocītu citosolā, kas padara šīs šūnas jutīgas pret etanola metabolisma blakusproduktiem (piemēram, brīviem radikāļiem un acetaldehīdu).

Tālāk tiks apskatīti galvenie etanola metabolismā iesaistītie enzīmi, to alēles.

ADH ir galvenais no oksidatīvajiem enzīmiem, kas metabolizē etanolu aknās. ADH atrodas citoplazmā un sastāv no divām subvienībām. Tas ir cinku saturošs NAD atkarīgs enzīms, kuram ir daudz izoenzīmu – cilvēkiem ir identificētas septiņas ADH izoenzīmu klases, kas ir izveidotas, balstoties uz to substrātiem, specifiskumu, jutību pret inhibitoriem, lokalizāciju, elektroforētisko migrāciju un imunoloģiskajām īpašībām [Jelski, 2008], pēdējā laikā ir mainīta ADH izoenzīmu un to kodējošo gēnu nomenklatūra (skatīt 2.1. tabulu).

2.1. tabula

**ADH nomenklatūra un izoenzīmus kodējošie gēni [Edenberg, 2007]**

Jaunā gēnu nomenklatūra <sup>a</sup>	Vecais gēna nosaukums	References secība <sup>b</sup>	Kodētā olbaltumviela	ADH klase
<i>ADH1A</i>	<i>ADH1</i>	NM_000667	$\alpha$	I
<i>ADH1B</i>	<i>ADH2</i>	NM_000668	$\beta$	I
<i>ADH1C</i>	<i>ADH3</i>	NM_000669	$\gamma$	I
<i>ADH4</i>	<i>ADH4</i>	NM_000670	$\pi$	II
<i>ADH5</i>	<i>ADH5</i>	NM_000671	$\chi$	III
<i>ADH6</i>	<i>ADH6</i>	NM_000672	ADH6	V
<i>ADH7</i>	<i>ADH7</i>	NM_000673	$\sigma$	IV

<sup>a</sup>gēna nosaukums, kas tiek lietots saskaņā ar Cilvēka Genoma organizācijas (*Human Genome Organisation – HUGO*) nomenklatūru ([www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/)), <sup>b</sup>References gēns no NCBI datubāzes ([www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq), GRCh37.p13).

ADH izoenzīmu kodējošie gēni atrodas ~380 kb lielā reģionā 4. hromosomas garajā plecā (4q21–23). Aminoskābju līdzība starp dažādiem ADH izoenzīmiem ir ~60% (70% salīdzinot I un IV klasi).

ADH I klases enzīmi ir dimēriskas olbaltumvielas, veidotas no  $\alpha$ ,  $\beta$  un  $\gamma$  subvienībām, kuras kodē *ADH1A*, *ADH1B* un *ADH1C* gēni. 95% no aknās esošajām ADH ir I klases izoenzīmi, tāpēc arī šie enzīmi tiek dēvēti par "klasiskajām" alkohola

dehidrogenāzēm. Etanols nav vienīgais šo enzīmu substrāts, jo tie iesaistās arī bioamīnu un prostaglandīnu metabolismā, steroīdu dehidrogenizācijā,  $\omega$  taukskābju oksidācijā, kā arī iesaistās vitamīna A (retinola) biosintēzē. II klases enzīmam – *ADH4* gēna kodētajam izoenzīmam ir nozīme augstas etanola koncentrācijas gadījumā un it īpaši hidrofobā vidē [Haseba, 2010]. Tiek uzskatīts, ka *ADH4* ir atbildīgs par etanola metabolismu augstās tā koncentrācijās un ilgstošas lietošanas laikā, bet šis enzīms ir mazāk aktīvs sievietēm [Haseba, 2010], kas, iespējams, varētu izskaidrot sliktāku akūta etanola hepatīta prognozi sievietēm. III klases izoenzīmi netiek intensīvi iesaistīti etanola metabolismā pat augstās tā koncentrācijās, bet iesaistās dažādu lipīdu metabolisma blakusproduktu, piemēram, endogēno garo ķēžu alkoholu un aldehīdu metabolismā. IV klases izoenzīmi tiek ekspresēti, galvenokārt, kuņģa epitēlijā, tāpēc tiem ir svarīga loma alkohola uzsūkšanās procesā [Jelski, 2008].

*ADH* gēnos ir zināmi polimorfismi/alēles, kurām ir atšķirīga spēja metabolizēt etanolu un zināmas ievērojamas atšķirības biežumā starp populācijām.

*ADH1B* alēļu biežums ir atšķirīgs starp dažādam populācijām, piemēram, *ADH1B\*1* ir sastopama galvenokārt Eiropas izcelsmes un afroamerikāņu populācijās, savukārt *ADH1B\*2* – biežākas ir Ķīnas un Japānas populācijās. *ADH1B\*2* homozigotiskiem indivīdiem ir pat nedaudz (< 15%) augstāks alkohola izvadīšanas ātrums, salīdzinot ar indivīdiem ar *ADH1B\*1* alēlēm. *ADH1C\*1* un *ADH1C\*2* sastopamības biežums ir aptuveni vienāds visās Eiropas izcelsmes populācijās [Zakhari, 2006].

Lai novērtētu indivīda spēju metabolizēt etanolu, ir svarīga I klases biežāk sastopamo alēļu kombinācija. Par atskaites jeb references spēju metabolizēt etanolu tiek uzskatīts indivīds, kurš ir homozigotisks pēc *ADH1B\*1* un *ADH1C\*1* alēlēm. 70% no etanola tiek metabolizēts ar I klases enzīmu palīdzību, bet attiecīgi 30% ar *ADH4* enzīmu līdzdalību [Edenberg, 2007]. Salīdzinot indivīdus, kuriem ir vienāds svars un alkohola koncentrācija asinīs, ir novērots, ka indivīdiem, kuri ir homozigotiski pēc *ADH1B\*1* un *ADH1C\*2* alēlēm, etanola metabolizēšanas spēja ir tikai 80% no references metabolizēšanas spējas, bet homozigotiem pēc *ADH1B\*2* un *ADH1C\*1* alēlēm etanola oksidēšanas spējas ir 8 reizes augstākas, bet *ADH1B\*3* un *ADH1C\*1* – gandrīz divas reizes augstākas oksidēšanas spējas [Edenberg, 2007; Lee, 2006]. Šie etanola metabolisma rādītāji ir aptuveni, pieņemot, ka abas alēles tiek

vienādi ekspresētas, bet gēnu ekspresiju ietekmē ne tikai minētās alēles, bet arī neģenētiskie faktori.

Lai gan *ADH* gēnu un to polimorfismu ietekme uz alkohola/ etanola metabolismu ir pierādīta, tomēr to saistība ar alkohola izraisītu aknu slimību joprojām ir pretrunīga [Stickel, 2012; STICKEL, 2006].

Citohroma P450 sistēmas izoenzīmi darbojas endoplazmatiskā tīkla membrānas veidotos pūslīšos (vezikulās), svarīgākais no izoenzīmiem etanola metabolismā ir CYP2E1. CYP2E1 aktivitāti ietekmē hroniska alkohola lietošana, un tam ir nozīme liela etanola daudzuma gadījumā, etanolu pārvēršot acetaldehīdā, kā arī tas ir galvenais enzīms, kas nosaka etanola metabolismu audos, kuros *ADH* koncentrācija ir zema vai nav vispār, piemēram, smadzenēs. CYP2E1 darbības rezultātā veidojas brīvie skābekļa radikāļi (*reactive oxygen species*), ieskaitot hidroksietil-, superoksīda jonus, hidroksilgrupu radikāļus, kas paaugstina audu bojājuma risku.

*CYP2E1* gēns atrodas 10. hromosomā, tā aktivitāti ietekmē ne tikai dažādas gēna alēles, bet arī aptaukošanās, badošanās, aknu disfunkcija, kā arī etanola lietošana, medikamentu lietošana (piemēram, disulfīrama un hlormetiazola) vai uzturā esoši izotiocianāti [Marchand, 1999]. Visvairāk pētītās *CYP2E1* alēles ir 5' gēna reģionā (rs3813867 un rs2031920 – veido *RsaI* restrikcijas saitu) un 6. intronā esošā alēle (rs6413432 – veido *DraI* restrikcijas saitu). *RsaI* restrikcijas saitu veidojoša alēle tiek uzskatīta par c1 vai normas variantu (*wild type*) alēli, un, ja restrikcijas saits tiek zaudēts, tad c2 alēli. Šī alēle tiek saistīta ar 10x lielāku transkripcijas aktivitāti, paaugstinātu veidotās olbaltumvielas daudzumu, un paaugstinātu enzimatisko aktivitāti [Druesne–Pecollo, 2009], c2 alēle ir sastopama ~20–25% Āzijas indivīdu un < 10% eiropiešu izcelsmes indivīdiem un kā ļoti reta, netika iekļauta šajā pētījumā.

Katalāze ir enzīms, kuru kodējošais gēns ekspresējas peroksisomās. Katalāze spēj oksidēt etanolu ūdeņraža peroksīda klātbūtnē, veidojot sistēmu, piemēram, enzīmu kompleksu NADPH oksidāzi vai enzīmu – ksantīnoksidāzi. Salīdzinot ar diviem iepriekšminētajiem ceļiem, šim ir ļoti maza loma etanola oksidācijā, izņemot badošanās stāvokli [Handler, 1990].

ALDH enzīmi ir iesaistīti daudzu endogēnu un eksogēnu substrātu metabolismā, tai skaitā arī etanola metabolismā veidotā acetaldehīda pārvēršanā acetātā. Lai gan aknās tiek ekspresēti vairāki ALDH veidi, tomēr izoenzīms –

ALDH2, kas darbojas mitohondrijos un kuru kodē gēns *ALDH2*, ir galvenais no tiem, kas ir iesaistīts acetaldehīda metabolismā. *ALDH2\*2* alēle ir viena no visplašāk zināmajām alēlēm, kas tiek minēta ne tikai saistībā ar etanola metabolismu, bet tai skaitā arī ar populāciju ģenētiku, jo tā ir galvenokārt sastopama Āzijā, bet nav attiecīgi Eiropas izcelsmes indivīdiem [Edenberg, 2007]. *ALDH2\*2* alēles (rs671) gadījumā ir notikusi lizīna aizvietošanās ar glutamātu 504. pozīcijā. *ALDH2\*2* veidotais enzīms ir gandrīz neaktīvs, un līdz ar to nenotiek acetaldehīda metabolisms, savukārt indivīdiem, kuriem ir *ALDH2\*2* alēle heterozigotiskā formā, enzīma aktivitāte ir 6% [Crabb, 1989]. Indivīdi ar *ALDH2\*2* alēlēm homozigotiskā formā pat pēc nelielas alkohola lietošanas sajūt spēcīgu nelabumu, piesarkšanu, sliktu dūšu un tahikardiju, līdzīgu reakciju izraisa medikamenta disulfirama lietošana, kuru izmanto alkoholisma ārstēšanā, lai izraisītu nepatiku pret alkohola lietošanu, līdz ar to šī alēle ir aizsargājoša pret alkoholisma attīstību. Tā kā *ALDH2\*2* alēlei ir izteiktas populāciju atšķirības, ir novērots, ka Āzijā ir mazāks alkohola izraisīto cirožu risks, kā arī citu slimību biežums, kas saistāms ar alkohola lietošanu [Chao, 1994; Nagata, 2002].

### 2.2.2. Alkohola neoksidatīvais metabolisma ceļš.

Neoksidatīvais alkohola metabolisma ceļš salīdzinoši ir neliels, bet tajā veidotajiem produktiem ir diagnostiska un patoģenētiska nozīme. Alkohols neoksidatīvā ceļā metabolizējas vismaz divos ceļos. Vienā no ceļiem alkoholam konjugācijas reakcijā ar taukskābēm, veidojas molekulas – taukskābju etilesteri. Citā neoksidatīvajā ceļā ar lipīdu molekulās esošajiem fosfātiem veidojas fosfatidiletanols. Taukskābju etilesterus ir iespējams noteikt serumā un arī citos audos pēc alkohola lietošanas, un tie ilgi saglabājas pat pēc alkohola izvadīšanas no organisma [Werner, 2002].

Oksidatīvais un neoksidatīvais alkohola metabolisma ceļš ir savā starpā saistīti. Nomācot etanola oksidāciju ar vielām, kas nomāc ADH, CYP2E1 un katalāzi, tiek pastiprināts alkohola neoksidatīvais ceļš, kas palielina taukskābju etilesteru koncentrāciju aknās un aizkuņģa dziedzerī [Werner, 2002].

### 2.2.3. Alkohola metabolisma sekas organismā

Alkohola metabolisms organismā izraisa ļoti daudz dažādu reakciju, kas nosaka alkoholiķiem raksturīgo audu bojājumu un slimību veidošanos.

Šīs sekas ir:

- hipoksija aknu audos,
- dažādu toksisku savienojumu veidošanās,
- brīvo skābekļa radikāļu formēšanās un izmaiņas šūnas oksidēšanās – reducēšanās statusā, jo ir izmainīta NADH/ NAD<sup>+</sup> attiecība.

Etanola oksidatīvajā metabolisma ceļā veidojas NADH, kas tālāk tiek metabolizēts mitohondrijos, pārnesot elektronus skābekļa molekulai, kas piesaista protonus, veidojot ūdeni. Lai nodrošinātu NADH metabolismu, hepatocīti pastiprināti uzņem skābekli no asinīm [Tsukamoto, 1989], kas var būt pietiekami hepatocītiem, kas atrodas tuvu artērijām, bet perifērijā esošajiem hepatocītiem skābekļa nepietiek, un var rasties aknu bojājums [Ishak, 1991]. Etanola ietekmē notiek arī Kupfera šūnu aktivācija, kas palielina skābekļa patēriņu šūnās, jo tās izdala stimulējošas molekulas, piemēram, prostaglandīnus E2, kas veicina vielmaiņu aknu šūnās [Zakhari, 2006].

Etanola metabolisma ceļā ADH un CYP2E1 veido tādas aktīvas molekulas, kā acetaldehīds un brīvie skābekļa radikāļi, kas, mijiedarbojoties ar olbaltumvielām, veido stabilus un nestabilus savienojumus.

Acetaldehīds mijiedarbojas ar atsevišķām aminoskābēm, kas atrodas, piemēram, eritrocītu membrānu olbaltumvielās, lipoproteīnos, kas ir saistīti ar sirds slimības attīstību, tubulīnos, hemoglobīnā, albumīnā, kolagēnā, citohromos u.c. [Tuma, 2003]. Dažus no savienojumiem, kā piemēram, acetaldehīda – lizīna savienojumu, neatpazīst organisma imūnsistēma un līdz ar to pret to sāk veidot antivielas. Šādu antivielu veidošanās ir raksturīga pēc ilgstošas alkohola lietošanas [Israel, 1986; Lin, 1990; Worrall, 1990]. Acetaldehīda saistīšanās ar eritrocītu membrānas olbaltumvielām izraisa makrocitozi [Niemela, 2004], kas tiek uzskatīta par alkohola atkarības marķieri. Acetaldehīds saistās arī ar biogēniem amīniem, tai skaitā neurotransmiteriem – serotonīnu un dopamīnu, kuriem ir farmakoloģisks efekts uz centrālo nervu sistēmu.

Brīvo skābekļa radikāļi izraisot lipīdu peroksidāciju, veicina toksisku savienojumu veidošanos. Lipīdu peroksidācijas laikā veidojas malondialdehīds un

4–hidroksi–2–neonenals – abi savienojumi veido savienojumus ar olbaltumvielām [Worrall, 2001]. Savukārt acetaldehīds un malondialdehīds ar olbaltumvielām veido stabilu savienojumu, kas var ierosināt imūno atbildi [Tuma, 2003], kas pastiprina un nosaka aknu bojājuma veidošanos.

Oksidatīvo stresu šūnā izraisa izmainīts oksidēšanās – reducēšanās stāvoklis, tai skaitā arī brīvo skābekļa radikāļu veidošanās. Brīvie skābekļa radikāļi, ieskaitot superoksīdu ( $O_2^{\cdot-}$ ), ūdeņraža peroksīdu ( $H_2O_2$ ), hipohlorīta jonu ( $OCl^-$ ) un hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikāļus, dabiski veidojas daudzās šūnā notiekošās reakcijās. Brīvie skābekļa radikāļi piesaista ūdeņraža atomus no citām molekulām, arī tās pārvēršot ļoti aktīvos radikāļos, gan arī, saistoties ar stabilām molekulām, tiek veidoti radikāļi. Abi mehānismi ir nozīmīgi vēža, aterosklerozes, diabēta, iekaisuma attīstībā, novecošanās [Wu, 2003].

Organismā tiek veidoti arī antioksidanti, kas neitralizē brīvos skābekļa radikāļus. Normālos metabolisma apstākļos pastāv līdzsvars starp abām sistēmām, ja pārsvarā ir brīvie skābekļa radikāļi, tad šūnā veidojas oksidatīvais stress. Etanola lietošanas gadījumā brīvie skābekļa radikāļi veidojas vairākos posmos [Wu, 2003]:

- izmaiņas šūnas oksidēšanās – reducēšanās statusā (izmainīta attiecība starp NADH un  $NAD^+$ ), ko nosaka ADH un ALDH etanola metabolisms;
- acetaldehīda veidošanās;
- CYP2E1 aktivācija augstās etanola koncentrācijās;
- hipoksija, kas attīstās alkohola metabolisma laikā;
- alkohola ierosināts mitohondriju bojājums;
- Kupfera šūnu aktivācija;
- noteiktu antioksidantu samazinājums (piemēra, mitohondriju un citoplazmas reducētais glutations);
- 1–hidroksietil radikāļu veidošanās.

Brīvo skābekļa radikāļu koncentrācijas palielinājumam ir vairāki postoši efekti, piemēram, tas stimulē audzēju nekrozes faktora alfa atbrīvošanos no Kupfera šūnām. Tas ir citokīns, kam ir loma iekaisuma reakcijās, kas veicina audu bojājuma un fibrozes attīstību aknās. Brīvie skābekļa radikāļi var inducēt arī lipīdu, olbaltumvielu un DNS peroksidāciju. Mitohondriju membrānu peroksidācija ietekmē to caurlaidību, un līdz ar to daļa vielu no mitohondriju enzīmiem nonāk citosolā, kas ierosina virkni reakciju, piemēram, citohroma C nonākšana citosolā ierosina virkni

bioķīmisku reakciju, izraisot šūnu apoptozi. Mitohondriju membrānā esošo molekulu peroksidācija izraisa elektriskā lādiņa izmaiņu membrānā [Wu, 2003], kas samazina ATP sintēzi un veicina šūnu nekrozi. Citohroma C izmantošana, lai noteiktu alkohola hepatīta klīnisko gaitu, iekļauta arī Latvijā reģistrētā patentā (LV13855B).

Lai novērstu brīvo skābekļa radikāļu kaitīgo ietekmi, tiek meklētas iespējas lietot antioksidantus. Atsevišķos pētījumos ir pierādīts, ka glutationa priekšteča S–adenozil–l–metionīna vai citu antioksidantu lietošana mazina alkohola izraisītu aknu bojājumu [Wu, 2003].

Hroniska etanola lietošana un tā metabolisms ietekmē arī citus vielmaiņas ceļus, tādā veidā izraisot dažādas slimības, kas ir raksturīgas alkoholiķiem, kā piemēram, aknu steatoze, hiperlipidēmija, pienskābes uzkrāšanās organismā, pastiprināta ketonu un paaugstināta urea veidošanās organismā [Zakhari, 2006].

Ilgstoša alkohola lietošana sākotnēji izraisa aknu steatozi, tad seko iekaisums, fibroze un ciroze. Aknu steatozi izraisa novirze oksidēšanās – reducēšanās statusā, ko izraisa etanola metabolisms, kas veicina taukskābju uzkrāšanos, nevis to oksidāciju, kā arī tiek ietekmēta dažādu olbaltumvielu aktivitāte, kas regulē taukskābju sintēzi un oksidāciju [Nagy, 2004]. Tiek ietekmēts arī citu etanola vielmaiņā iesaistīto enzīmu substrātu metabolisms, piemēram, ADH un ALDH ir iesaistīti vitamīna A metabolismā, kas ir svarīgs augšanas un diferencēšanās procesos. Etanola ietekme uz retinola metabolismu var izraisīt smagus defektus augļa attīstībā, cilmes šūnu diferenciācijā, ietekmēt orgānu diferencēšanos un normālu to struktūru un funkciju [Crabb, 2001]. CYP2E1 enzīma citi substrāti ir medikamenti (piemēram, propranolols, acetaminofēns, varfarīns un diazepāms), dažādi kancerogēni, līdz ar to, ja enzīms tiek piesātināts ar etanolu, tad šo vielu ārstnieciskais efekts samazinās.

Hroniska alkohola lietošana izraisa izmaiņas sēra saturošu aminoskābju cisteīna, metionīna metabolismā, kas, savukārt, izraisa glutamāta, aspartāta un homocisteīna uzkrāšanos, kas var izraisīt audu bojājumu, piemēram, paaugstinātais homocisteīna līmenis var izraisīt smadzeņu audu atrofiju, jo tas izmaina noteiktus nervu šūnu signālus, it īpaši alkohola abstinences gadījumā [Bleich, 2004].

### **2.3. Akūta toksiska alkohola hepatīta aknu bojājuma noteikšana**

Eiropā tiek izmantotas dažādas aknu bojājuma smagumu nosakošas skalas (Maddrey, MELD, GAHS, ABIC skalas) alkohola bojājuma gadījumā, kas izmanto bioķīmiskus rādītājus (piemēram, protrombīna/ INR attiecību, bilirubīnu, GGT), bet nav izveidota vienota klasifikācija, jo katrai no tām ir savas priekšrocības un trūkumi [EASL, 2012; Topic, 2013]. Latvijā netiek izmantota viena konkrēta skala alkohola bojājuma noteikšanai, bet tas tiek izvērtēts, analizējot bioķīmiskās izmaiņas un anamnēzi. Akūta toksiska hepatīta gadījumā netiek lietota aknu biopsija, un tās morfoloģiska izmeklēšana, jo to bieži nevar veikt izteiktā aknu bojājuma dēļ. Latvijā ir reģistrēti divi patenti, kas ieteiktu izmantot endogēno endotoksīnu serdes IgA antivielu (LV14471B) un citohromu C (LV13855B) – nosakot, ka, ja citohroma C līmenis ir augstāks par 1,1 ng/ml, tad var prognozēt klīnisko simptomu pasliktināšanos vai terapijas neefektivitāti. Citohroms C atbrīvojās šūnu bojājuma gadījumā, kad palielinās mitohondriju membrānas caurlaidība. Abi rādītāji pētījumā iekļautajiem pacientiem netika noteikti, tāpēc izvērtēt to nozīmību nebija iespējams, bet iepriekš publicētā pētījumā Latvijā tika apstiprināts abu apoptozes marķieru paaugstināšanās alkohola hepatīta gadījumā [Vīksna, 2009].

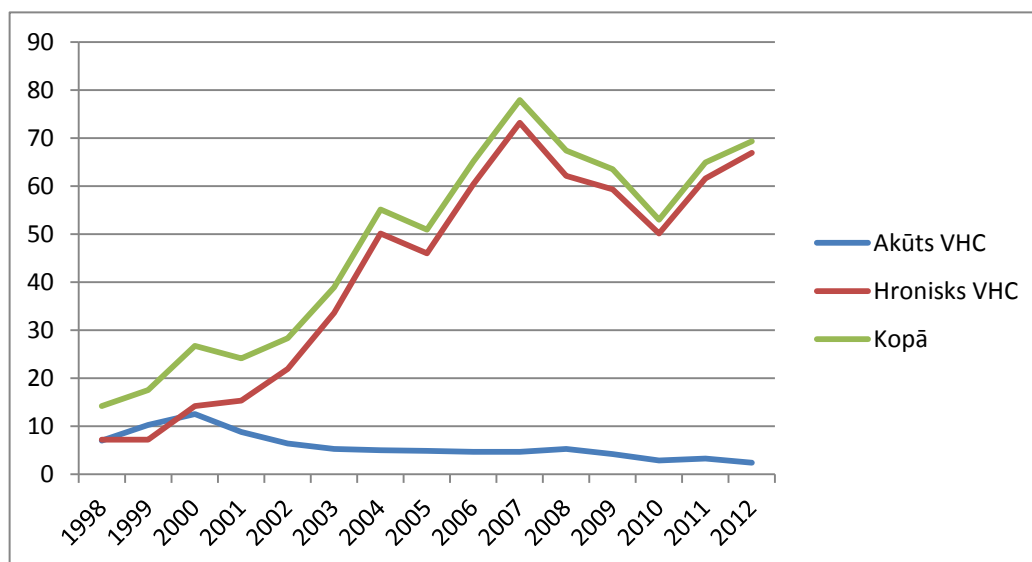
No bioķīmiskajiem rādītājiem alkohola izraisītu bojājumu, tai skaitā, gan akūtu, gan hronisku bojājumu raksturo GGT un sārmainā fosfatāze, kas tomēr nav iekļauta nevienā no alkohola izraisītā aknu bojājuma izvērtējuma skalām [EASL, 2012]. GGT raksturo oksidatīvā stresa līmeni organismā un to palielina etanola lietošana, smēķēšana un aptaukošanās it īpaši pēc 40 gadu vecuma [EASL, 2012]. Pierādīts, ka alkohola lietošanas gadījumā samazinās glutaciona peroksidāzes aktivitāte un tas izraisa GGT palielināšanos [EASL, 2012]. Sārmainā fosfatāze ir sastopama daudzos audos, un ir iesaistīta dažādu vielu fosforilēšanā. Tās paaugstināšanās tiek aprakstīta hroniskiem alkohola lietotājiem, un tās līmenis saistās ar alkohola izraisītas aknu slimības attīstību [Keiding, 1994].

### **2.4. C vīrushepatīta epidemioloģija Latvijā un pasaulē**

Pašlaik pasaulē varētu būt ~3% (~130–210 miljonu) iedzīvotāju, kuriem ir C vīrushepatīts (CVH). Latvijā plašākais populācijas pētījums, lai noskaidrotu CVH prevalenci Latvijā, tika veikts 2008. gadā. Tajā tika noskaidrots, ka hepatīta C vīrusa



antivielas (anti-HCV) ir 2.4%, bet RNS 1.7% Latvijas iedzīvotāju – kas nozīmē, ka aptuvenais pacientu skaits Latvijā vajadzētu būt 39 000 [Tolmane, 2012a; Tolmane, *EASL*, 2011]. Starp CVH pacientiem bija vērojams, ka vairāk ir vīrieši [Tolmane, *EASL*, 2011].



2.2.att. C vīrushepatīta incidence Latvijā no 1998.–2012. gadam.  
Slimību profilakses un kontroles centra dati.

Saskaņā ar Slimību profilakses un kontroles centra datiem pašlaik pieaug saslimstība ar CVH – CVH incidenci no 1998–2012. skatīt attēlā 2.2.

CVH izraisa hepatīta C vīruss (HCV), kuram ir zināmi 6 genotipi un vairāki apakštipi [Bressler, 2003], bet to nomenklatūra mainās un citos avotos tiek minēti arī septiņi HCV genotipi [Nakano, 2012]. Visbiežāk sastopamais ir 1. genotips (apakštipi a un b) – 1a genotips ir visbiežākais Eiropā un 1b – Amerikas Savienotajās valstīs. Genotips 3a ir Eiropā visbiežāk sastopamais starp intravenozo narkotiku lietotājiem, 4.genotips ir sastopams Vidusjūras reģionā, bet 5. un 6. genotipi ir reti sastopami [Antaki, 2010]. Vīrusa genotipam ir loma slimības progresēšanā, kā arī atbildes reakcijā uz antivirālo terapiju, kaut gan precīza tā loma nav zināma [Manns, 2006].

2004. gadā veiktajā pētījumā tika noskaidrots, ka Latvijā HCV genotipu sadalījums ir atšķirīgs kā Rietumeiropā un tuvāks ir Austrumeiropas un Āzijas populācijām [Kurbanov, 2003; Lvov, 1996] – Latvijā 85% no HCV ir 1b subtips [Jansons, 2004], kuram ir slikta atbildes reakcija uz antivirālo terapiju [Manns, 2006], 3a genotips ir ~10% pacientu, šim genotipam ir laba atbildes reakcija uz

antivirālo terapiju [Zein, 2000]. Reti ir sastopami vīrusa genotipi a un 2 [Romero–Gomez, 2005]. Pēc Slimību profilakses un kontroles centra datiem 1. genotips ir sastopams 65% pacientu, 3. genotips 30% un 5% gadījumu ir 2. un 4. genotipi.

## 2.5. Akūts un hronisks CVH

Pēc 3–12 nedēļu inkubācijas perioda apmēram 3/4 CVH saslimušo akūtajā infekcijas periodā nav nekādu klīniski izteiktu hepatītam raksturīgu simptomu. Apmēram 80% slimnieku akūtais hepatīts pāriet hroniskā formā, kas var progresēt – nērstēšanas gadījumā 1/4 hroniskā CVH 15–20 gadu laikā attīstās aknu ciroze un vēzis.

Akūts CVH ir asimptomātisks 50–90% gadījumu. Aptuveni 15–20% gadījumu nenotiek spontāna atveseļošanās, kas ir atkarīga no inficēšanās veida, vecuma, kad notikusi inficēšanās un aknu iekaisuma rakstura [Santantonio, 2008; Wiegand, 2008]. Eiropā CVH izraisa ~10% no visiem akūtajiem hepatītiem [Esteban, 2008].

Akūts CVH tiek definēts, ja pacients atbilst kaut vienam no šādiem kritērijiem [Santantonio, 2008]:

- zināma vai iespējama inficēšanās epizode pēdējo 4 mēnešu laikā,
- dokumentēta serokonversija (parādījušās antivielas pret HCV),
- seruma ALAT aktivitātes līmenis pārsniedz normas augšējo robežu vairāk kā 20 reizes (ja ir dokumentēts normāls līmenis iepriekšējā gada laikā).

Hroniska CVH gadījumā HCV– RNS ir noteikta vismaz sešus mēnešus. Hroniska infekcija raksturojas ar dažādas smaguma pakāpes aknu iekaisuma un fibrozes progresēšanu neatkarīgi no HCV genotipa un vīrusa slodzes [2011]. Kā riska faktori, kas veicina slimības progresu, tiek minēta alkohola lietošana [Omielinski, 2011], cukura diabēts (arī CVH predisponē tā attīstībai) [Afdhal, 2004] – CVH pacientiem, kuri tiek ārstēti ar interferonu, cukura diabēts 1,7 reizes palielina risku attīstīties hepatocelulārajai karcinomai [Arase, 2013]; lielāks vecums, kad notikusi inficēšanās; ko–infekcija ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV) vai citiem hepatotropiem vīrusiem. Atkarībā no dažādu faktoru kombinācijām ~10–40% pacientu attīstās ciroze [Morgan, 2010], nāve no cirozes izraisītām komplikācijām ir ~4% CVH pacientu gadā [Ghany, 2011]. HCV infekcija izraisa izmaiņas ne tikai

aknās, bet arī krioglobulinēmiju, porfīriju, membranozo glomerulonefrītu [Nocente, 2003].

## 2.6. C vīrushepatīta ārstēšana

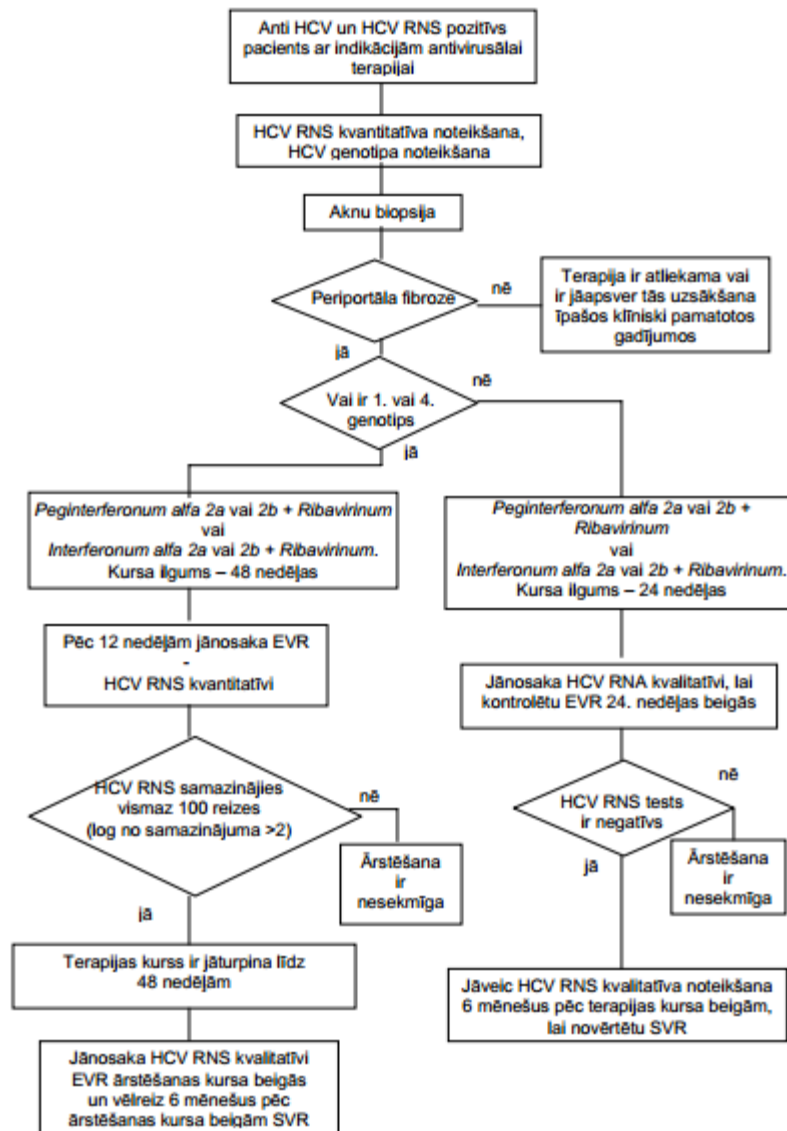
Hroniska CVH terapijas mērķis ir vīrusa eradikācija, kurai vajadzētu novērst komplikāciju veidošanos, jo pat pacientiem ar CVH izraisītu ievērojamu aknu bojājumu, kuriem ir sasniegta SVR, ir ievērojami samazināta mirstība un aknu bojājums. Veiksmīga terapija ir, ja tiek sasniegta noturīga virusoloģiska atbilde (SVR – *sustained viral response*) – 24 nedēļas pēc terapijas beigām nav nosakāms HCV RNS līmenis asinīs [Bosma, 1995].

Standarta terapijai visiem vīrusa genotipiem tiek kombinēts pegilētais interferons un ribavirīns [EASL, 2011] – noturīga viroloģiska atbilde tiek sasniegta 40–50% pacientu ar 1. genotipu, un ~80% ar 2. un 3. genotipu [Bosma, 1995]. Atkarībā no atbildes reakcijas pacienti tiek iedalīti trijās grupās:

- 1) pilnīgi neatbildētāji (*null responders*) – kuriem ārstēšanas laikā HCV RNS kopiju skaits nav samazinājies vismaz 100 reizes (log no samazinājuma > 2) 12 nedēļu laikā no terapijas uzsākšanas – šiem pacientiem antivirālā terapija tiek pārtraukta saskaņā ar Latvijas CVH ārstēšanas vadlīnijām;
- 2) daļēji atbildētāji – kuriem ārstēšanas laikā HCV RNS kopiju skaits samazinājies vismaz 100 reizes (log no samazinājuma > 2) 12 nedēļu laikā no terapijas uzsākšanas, bet vīruss joprojām ir nosakāms 24 terapijas nedēļā (ir ~15–25% no pacientiem, kas saņem kombinēto antivirālo terapiju [2011]);
- 3) recidivējošie pacienti – pacienti, kuriem terapijas laikā nav nosakāma HCV–RNS, bet pēc terapijas ir nosakāma;
- 4) atbildētāji – pacienti, kuriem tiek sasniegta SVR.

HCV antivirālās terapijas nepieciešamību izvērtē visiem pacientiem, kuri ir diagnosticēti, kuriem ir kompensēts aknu bojājums, tā ir nopietni jāapsver pacientiem ar vidēju fibrozi un nekavējoties ir jāuzsāk pacientiem ar izteiktu fibrozi. Savukārt pacientiem ar vieglu aknu bojājumu jāizsver terapijas ieguvumi un riski [2011].

2005. gadā Latvijā ir pieņemtas vadlīnijas, pēc kurām tiek ārstēti CVH pacienti, to algoritms ir attēlots 2.3. attēlā [Santantonio, 2008].



2.3.att. CVH ārstēšanas algoritms Latvijā [Santantonio, 2008]  
(Valsts Zāļu aģentūras rekomendācijas, 2005)

Pacienti, kuriem kombinētā terapija ir neefektīva, ir jāmaina terapijas kombinācija, pievienojot specifiskākus medikamentus, kas ievērojami uzlabo ārstēšanas rezultātus [Chou, 2013].

Latvijā 2010. un 2011. gadā antivirālā terapija lietota ~50 % no reģistrētajiem pacientiem (Slimību profilakses un kontroles centra dati). Iemesli, kāpēc tā nav lietota visiem, ir visdažādākie, viens no nozīmīgākajiem ir ekonomiskais – pacientiem nav naudas līdzmaksājumam: no 2009.–2011. gadam pacientiem tika kompensēts 50% no zāļu maksas, no 2006.–2009. un no 2011. gadam līdz 2013. gadam tiek kompensēti 75% no zāļu maksas (Nacionālā Veselības dienesta dati), un terapija ir

nepieciešama 24 – 48 nedēļas, pacientiem ir kontrindikācijas terapijas saņemšanai – palielināta jutība pret aktīvo vielu, grūtniecība, dažādas blakus slimības [EASL, 2011; Santantonio, 2008], vai arī pacients ir/vai nokļūst apcietinājumā, kas ir viens no iemesliem, kāpēc terapija tiek pārtraukta.

Terapija var tikt pārtraukta, ja tā nav efektīva vai pacientam radušās komplikācijas. Kombinētajai pegilētā interferona un ribavirīna terapijai tiek atzīmētas šādas komplikācijas: slikta dūša, depresija, aizkaitināmība, ādas reakcijas, elpas trūkums, neitropēnija, anēmija, trombocitopēnija un ALAT paaugstinājums [Nakano, 2012]. Latvijā par terapijas nepieciešamību izlemj infektologu–hepatologu konsīlijs (RAKUS, PSKUS vai BKUS) [Santantonio, 2008].

Latvijā tāpat kā pasaulē standarta antivirālā terapija sastāv no ribavirīna un interferona 2a vai 2b kombinācijas [EASL, 2011; Santantonio, 2008], pašlaik tiek lietots pegilētais interferons 2a vai 2b, kuriem ir mazāka imunogenitāte un lielāks pusizvades laiks. Antivirālo terapiju ietekmējošie faktori ir gan no vīrusa genotipa atkarīgi (SVR labi tiek sasniegta pacientiem ar vīrusa genotipiem 2 un 3, bet ievērojami sliktāk ar vīrusa genotipu 1 [Bosma, 1995], pacienta ģenētika – *IL28B* marķieris tiek atzīts par būtiskāko, bet tomēr nevar tikt izmantots, lai atliktu terapiju [EASL, 2011; Bosma, 1995], citi pacienta faktori – svars [Antaki, 2010], alkohola lietošana [Lvov, 1996], insulīna rezistence [Kurbanov, 2003], aknu bojājuma pakāpe un citi [Nakano, 2012].

Īpaši būtiski prognozēt terapijas efektivitāti ir pacientiem ar genotipu 1, jo tā gadījumā SVR tiek sasniegta retāk.

2009. gadā tika publicēts pētījums, kas aprakstīja polimorfismu, kas atrodas netālu no *IL28B* gēna un ir saistīts ar SVR [Tanaka, 2009] un arī ar spontānu HCV elimināciju [Thomas, 2009], bet nav saistīts ar rezistenci pret HCV infekciju [Knapp, 2011]. Polimorfisms rs12979860 atrodas 3kb no *IL28B* gēna, tā promotera rajonā, un var ietekmēt tā aktivitāti, bet precīzs mehānisms joprojām nav zināms [Jia, 2012]. *IL28B* marķieris korelē ar SVR pacientiem ar vīrusa genotipu 1, pie citiem vīrusa genotipiem šāda asociācija netiek atrasta. Vairākās veiktajās meta–analīzēs ir pierādīta šī polimorfisma saistība ar SVR [Arase, 2013; Chen, 2012; Jimenez–Sousa, 2013], bet tā iekļaušana klīniskajās vadlīnijās vēl nav notikusi, jo līdz 2011. gadam nebija citas alternatīvas kombinētai pegilētā interferona un ribavirīna terapijai [2011], un tā noteikšana iekļauta Amerikas Aknu slimību asociācijas vadlīnijās ar

rekomendējošu raksturu, ja pacientam vai ārstējošajam ārstam ir nepieciešama papildus informācija, lai izvēlētos – uzsākt vai neuzsākt terapiju [Bosma, 1995].

Latvijā ir veikta *IL28B* marķiera genotipēšana un analizēšana saistībā ar terapijas efektivitāti un tika apstiprināts, ka arī Latvijā šī marķiera genotipēšana varētu būt nozīmīgs terapijas efektivitātes rādītājs, bet tomēr nozīmīgāki rādītāji ir HCV genotips, ķermeņa masas indekss un Knodēļa histoloģiskās aktivitātes indekss (HAI) [Tolmane, 2011].

Viens no antivirālās terapijas riska faktoriem ir aknu bojājums. Lai noteiktu aknu bojājuma pakāpi – „zelta standarts” joprojām ir aknu biopsija, tiek lietotas vairākas skalas, lai noteiktu aknu bojājumu – HAI ir viens no visplašāk lietotajiem Eiropā [Bedossa, 2008] – HAI skalā tiek izvērtēti šādi rādītāji: periportāla un tiltveida nekroze (izvērtēta no 0–10 punktiem), intralobulāra deģenerācija un fokāla nekroze (izvērtēta no 0–4 punktiem), portāla infiltrācija (izvērtēta no 0–4 punktiem) un fibroze (izvērtēta no 0–4 punktiem) [Knodell, 1981].

Aknu bojājuma smagumu pirms terapijas un terapijas gaitā nosaka arī pēc ALAT līmeņa. Pacienti, kuriem ir normas robežās ALAT un nav aknu cirozes, ir diskutabla antivirālās terapijas uzsākšana, jo pacientiem ar augstākiem ALAT rādītājiem terapija ir efektīvāka [Zeuzem, 2000], bet pacientiem ar kompensētu aknu cirozi ir nekavējoties jāuzsāk antivirālā terapija [EASL, 2011].

Kā nozīmīgs antivirālās terapijas riska faktors ir aknu audu fibroze un ciroze [EASL, 2011], kuru var noteikt morfoloģiski, bet tā kā aknu biopsija saistās ar dažādām komplikācijām, tad tiek meklēti dažādi bioķīmiskie marķieri, kas varētu tikt izmantoti aknu bojājuma noteikšanai. Līdz šim kā fibroģenēzes marķieri asins serumā tika lietoti: trombocītu skaits, protrombīna laiks, ALAT un ASAT attiecība, GGT un albumīna līmenis [Poynard, 2004], bet aizvien tiek meklēti informatīvāki rādītāji. Kā viens no daudzsološākajiem tiek ieteikts hialuronskābe [McHutchison, 2000]. Hialuronskābe tiek sintezēta aknu šūnās un noārdīta aknu sinusoīdu epitēlajās šūnās. Tā ir sastopama visu audu ekstracelulārajā matricā. Aknu fibrozes gadījumā samazinās tās noārdīšanās un tāpēc pieaug tās līmenis asins serumā. Iepriekš veiktajos pētījumos, kuros Latvijas CVH pacientiem tika analizēti bioķīmiskie marķieri un to asociācija ar SVR, tika atklāts, ka hialuronskābe ir vērtīgs fibroģenēzes marķieris [Jērums, 2012; Vīksna, 2009].

CVH patoģenēzē ir nozīmīga loma šūnu apoptozei, tāpēc tiek pētīta arī iespēja

izmantojot šūnu apoptozes marķierus gan aknu fibrozes noteikšanā, gan CVH gaitas prognozēšanā. Apoptoze ir prognozēta šūnu nāve, kas nepieciešama, lai organismā varētu tikt iznīcinātas bojātās šūnās, tās ceļā šūnu bojāeja neizraisa iekaisumu [Schinoni, 2006], un tai ir liela nozīme arī CVH gadījumā. Tās raksturošanai tiek izmantoti divi rādītāji citokeratīna-18 epitops un citohroms C. Citohroms C atbrīvojas serumā, kad šūna iet bojā, un var raksturot kā apoptozi, tā arī nekrozi. Citokeratīns-18, savukārt paaugstinās pēc apoptotiskā procesā aktivizēto kaspāžu šķeļošās iedarbības uz šūnā esošajām olbaltumvielām [Papatheodoridis, 2010]. Iepriekš veiktajos pētījumos Latvijā CVH pacientiem tika noteikti abi apoptozes rādītāji un citokeratīns-18 bija paaugstināts, bet tas bija zemāks kā vīrushepatīta B gadījumā [Vīksna, 2009], un ievērojami paaugstināts tas bija CVH pacientiem, kuri neatbildēja uz antivirālo terapiju [Jērums, 2012]. Citohroma C līmenim normā vajadzētu būt 0 ng/ml, un CVH pacientiem tas bija paaugstināts [Vīksna, 2009], bet netika atrasta saistība ar atbildi uz antivirālo terapiju [Jērums, 2012].

Dzelzs vielmaiņa un to ietekmējošie ģenētiskie faktori, piemēram, gēna *HFE* mutācijas tika aktīvi pētītas saistībā ar CVH, jo dzelzs ne vien pastiprina iekaisumu aknās [Drakesmith, 2008; Franchini, 2008], bet arī ir nepieciešams HCV replikācijai [Coelho-Borges, 2012; Jia, 2012]. Dzelzs vielmaiņu aknu šūnās CVH gadījumā var ietekmēt ne tikai *HFE* gēna mutācijas, bet arī HCV, izraisot hepatocītu nekrozi un ietekmējot dzelzs uzsūkšanos no zarnu trakta [Chen, 2012]. Lai uzlabotu pacientu atbildes reakciju uz antivirālo terapiju, lai gan rezultāti ir pretrunīgi, tomēr veiktajā meta-analīzē ir pierādīta dzelzs samazināšanas pozitīvā ietekme uz SVR sasniegšanu [Desai, 2008], arī flebotomijas lietošana bez antivirālās terapijas samazina aknu iekaisumu un ALAT rādītājus, bet ne HCV-RNS līmeni [Sartori, 2001].

Dzelzs uzkrāšanās organismā notiek ne tikai CVH infekcijas gadījumā, bet arī uztura īpatnībām, piemēram, lietojot alkoholu [Whitfield, 2001], un arī hereditārās hemohromatozes gadījumā, kuru visbiežāk izraisa mutācijas *HFE* gēnā – C282Y un H63D [Zeuzem, 2000]. Mutācijas *HFE* gēnā izraisa dzelzs uzkrāšanos un klīniskos simptomus, galvenokārt ceturtajā vai piektajā mūža dekādē un ātrāk vīriešiem [Zeuzem, 2000], tās ir pētītas arī saistībā ar HCV. Dzelzs uzkrāšanos organismā raksturo gan dzelzs līmenis serumā, gan arī ferritīna un tranferīna piesātinājums. Ir pierādīts, ka paaugstināts ferritīns norāda uz sliktāku prognozi antivirālai terapijai

un var tikt vērtēts kā atsevišķs riska faktors [Lange, 2012]. CVH gadījumā ferritīns vairāk tiek uzskatīts kā akūtās fāzes proteīns, kas norāda uz iekaisuma procesu aknās, nevis uz dzelzs vielmaiņu [Knapp, 2011], tāpēc, iespējams, arī genoma plašas asociācijas pētījumos CVH pacientiem nav atrasta asociācija starp ferritīna līmeni un gēna *HFE* mutācijām [Franchini, 2008].

Biežākās iedzimtās aknu slimības ietekmē aknu stāvokli, kā arī tām ir nozīme hroniska aknu bojājuma attīstībā. Kā biežākās iedzimtās aknu slimības tiek minētas hereditārā hemohromatoze (OMIM#235200), Vilsona slimība (OMIM#277900), Žilbēra sindroms (OMIM#143500) un alfa1–antitripsīna nepietiekamība (OMIM#613490). Šīm slimībām ir arī raksturīgs augsts sastopamības biežums Ziemeļeiropā un arī Latvijā [Kucinskas, 2012; Lace, 2008].

Vilsona slimība ir saistīta ar izmainītu vara metabolismu, izraisot tā palielinātu uzkrāšanos aknu audos, izraisot to iekaisumu [Harris, 2000]. Visbiežākā mutācija ir H1069Q, kas ir atrodama ~50% pacientu, un tās nesēju biežums Latvijā ir 1:80, kas ir nedaudz augstāks, kā vidēji tiek atzīmēts Eiropā – 1:90 [Krumina, 2008; Lace, 2008]. Minētā mutācija, lai gan tās biežums ir zemāks kā 5:100, tika iekļauta pētījumā, jo vara uzkrāšanās izmaina oksidatīvo stresu aknu šūnās, kā arī ietekmē imūno atbildi [Wang, 2011], kas varētu būt nozīmīgi hroniskas CVH gadījumā.

Alfa 1–antitripsīna nepietiekamību izraisa mutācijas *SERPINA1* gēnā, tā ir saistīta ar hroniska aknu bojājuma attīstību, kā arī tā ir salīdzinoši bieži sastopama Latvijas populācijā [Lace, 2008]. Alfa 1–antitripsīna nepietiekamības saistība ar hronisku CVH infekciju ir maz aprakstīta, tāpēc arī tika iekļauta pētījumā.

Žilbēra sindroms jeb labdabīga hiperbilirubinēmija ir sastopama ~10% eiropiešu izcelsmes indivīdiem un to izraisa mutācija *UGT1A1* gēnā [Bosma, 1995]. Minētais sindroms tika iekļauts analīzē, jo, iespējams, bilirubīns varētu mazināt aknu šūnu iekaisumu CVH pacientiem, kas ir nozīmīgs tā patogēnēzē [Bosma, 1995].

## **2.7. Antioksidantu sistēmas, to ģenētika cilvēka organismā**

Lai novērstu brīvo skābekļa radikāļu veidoto šūnas bojājumu, šūnās darbojas vairāki mehānismi [Kohen, 2002]:

- 1) brīvo skābekļa radikāļu veidošanās nomākšana;
- 2) reparācijas mehānismi;
- 3) fiziski aizsardzības mehānismi, piemēram, šūnu un organoīdu membrānas;



#### 4) antioksidanti:

- a. enzīmi – superoksīdismutāze, katalāze, peroksidāze u.c.,
- b. mazmolekulāri antioksidanti – glutations, urīnskābe, bilirubīns, histidilhistidīns, lipoilskābe u.c.

Mazmolekulāro antioksidantu metabolismā ir iesaistīti vairāki enzīmi. Tālāk tiks sīkāk apskatīti enzīmi un to kodējošie gēni, kuru polimorfismi tika pētīti akūta toksiska hepatīta gadījumā un ir iesaistīti mazmolekulāro antioksidantu metabolismā, kā arī alkohola metabolismā iesaistīto substrātu metabolismā.

### 2.7.1. Glutaciona S–transferāzes

Glutaciona S–transferāzes (GSTs) ir citosolā esoši enzīmi, kuriem ir daudz izoenzīmu un kuri katalizē reakcijas starp glutationu un lipofīlām molekulām ar elektrofilīem centriem, kas ir svarīgas toksisku vielu, ksenobiotiķu un brīvo radikāļu radītā oksidatīvā stresa neitralizēšanā [Cotton, 2000]. Izšķir galvenokārt četras GSTs klases: mi (GSTM), teta (GSTT), pi (GSTP) un alfa (GSTA) klases. Nozīmīgākie no katras klases kodējošajiem gēniem ir *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTA1* un *GSTP1*. GSTs kodējošo gēnu dažādām alēlēm ir atšķirīga ietekme uz ksenobiotiķu, tai skaitā arī etanola metabolismu, bet katra atsevišķa enzīma lomas izvērtēšana ir apgrūtināta, jo izoenzīmi ir daudz un tie var kompensēt viens otru, kā arī to aktivitāti ietekmē ārvides faktori.

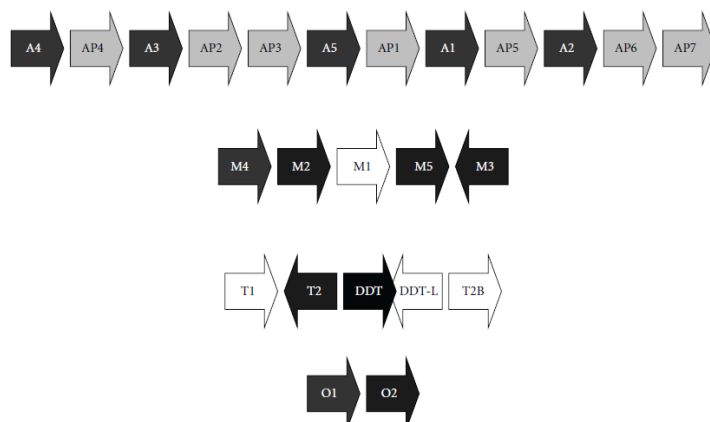
Līdzīgi kā ADH kodējošie gēni, arī GST kodējošie gēni ir izvietoti klasteros, bet šajos klasteros atrodas arī pseidogēni, kas nosaka to, ka nevienlīdzīgas rekombinācijas dēļ ir izveidojies biežs polimorfisms – gēnu delēcijas (skatīt 2.4. attēlu).

GSTs tiek daudz pētītas saistībā ar dažādiem audzējiem, jo ir iesaistītas ksenobiotiķu metabolismā (piemēram, tabakā esošo benzopirēnu) [Pool–Zobel, 2005], mutagēnu aktivācijā [Josephy, 2010], un arī DNS reparācijā [Hayes, 2005].

Visvairāk pētītas ir *GSTT1* un *GSTM1* pilnīgas gēnu delēcijas, jo to atļauj ļoti vienkārša metodika, un delēciju homozigotiskā gadījumā (nulle genotips) indivīdiem enzīmi netiek nemaz sintezēti [Josephy, 2010].

GSTT1, GSTA1, GSTM1 enzīmiem ir GSH peroksidāzes aktivitāte, un tā aizsargā šūnu no fosfolipīdu hidroperoksīdu uzkrāšanās [Bolt, 2006; Hurst, 1998]. Bet

GSTs izoenzīmiem ir gan atšķirīga ekspresija audos, gan substrātu specifiskums, tāpēc tie būtu jāapskata katrs atsevišķi.



2.4. att. GST kodējošo gēnu klasteri [Josephy, 2010].

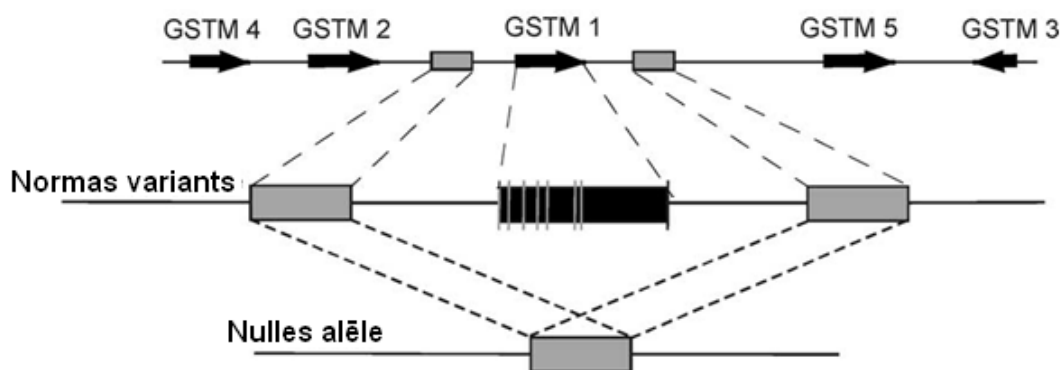
GST kodējošie gēni ir atzīmēti ar baltu burtu krāsu uz melna fona, pseidogēni – ar melnu burtu krāsu uz pelēka fona, uz balta fona atzīmēti ir gēni, kuru delēcijas ir bieži sastopamas. GSTA gēnu klasteris atrodas 6p12, GSTM – 1p13, GSTT – 22q11.2, GSTO – 10q24.3.

GST teta klases enzīmi ir ļoti atšķirīgi no pārējiem GST enzīmiem ar savu struktūru, katalītisko aktivitāti un gēna secību [Sheehan, 2001]. GSTT enzīma uzbūves īpatnība, atšķirībā no citiem GST enzīmiem, ir mazais un salīdzinoši „grūti sasniedzamais“ aktīvais centrs, kas nosaka to, ka šie enzīmi ir saistīti ar mazu molekulu metabolismu, kā piemēram, dihlormetānu [Josephy, 2010]. Līdzīgi saistīts ar mazu molekulu metabolismu ir arī CYP2E1 enzīms. Atšķirībā no citām GSTs GSTT var arī aktivēt molekulas, piemēram, dihaloalkānus un etilēndibromīdu, kas veido izteiktus mutagēnus. GSTT1 ir iesaistīts benzēna epoksīda inaktivēšanā, kas veidojas benzēna metabolismā [Bolt, 2006]. Benzēns veidojas, gan cilvēkam smēķējot, gan arī dažādos dzērienos, ēdienos, kuros ir gan nātrija benzoāts, gan askorbīnskābe (tā veidošanos palielina dzērienu uzglabāšana augstās temperatūrās utt.) [Van Poucke, 2008]. Arī mono–metil halīdu, metilhlorīda (veido gan okeānos esošās baktērijas, gan arī tiek izmantots rūpniecībā kā šķīdinātājs, gan pārtikas rūpniecībā, veidojot bezkofeīna kafijas, tējas u.c.) un metilbromīda (veido gan okeānos esošās baktērijas, gan izmantots kā pesticīds lauksaimniecībā) reducēšanā ekskluzīvi nozīme ir GSTT1, un to metabolismu ietekmē *GSTT1* gēna delēcija [Nolan, 1985].

Visbiežāk sastopamā ģenētiskā variācija, kas tiek arī pētīta, ir *GSTT1* nulles genotips, tā ir gēna pilnīga delēcija (biežums Eiropas populācijās ir ~20%, bet Āzijas

populācijās ~50% [Bolt, 2006]). GSTT1 nulles genotipam pierādīta nozīme atšķirīgai indivīdu benzēna metabolizēšanai [Qu, 2005]. Saistībā ar etanola metabolismu ir arī veikti vairāki pētījumi, bet, veicot to metaanalīzi, netika atrasta ticama asociācija ar alkohola izraisītu aknu patoloģiju [Marcos, 2011].

Visvairāk pētītais no šīs klases ir GSTM1 enzīms, kas, galvenokārt, iesaistās vairāku genotoksisku epoksīdu, piemēram, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu metabolismā, it īpaši, kuri veidojas citohroma P450 ietekmē [Bolt, 2006]. Policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži veidojas, nepareizi degot kokam, oglēm, kā arī var veidoties ēdiena un dzēriena apstrādes procesā. Veicot policiklisko aromātisko ogļūdeņražu mērījumus alkoholiskos dzērienos, visvairāk tie tika konstatēti ilgi glabātos/ izturētos dzērienos [Garcia-Falcon, 2005]. *GSTM1* gēnam ir raksturīga visa gēna delēcija, kas veidojas homologas rekombinācijas dēļ (skatīt 2.5. attēlu)



2.5.att. *GSTM1* gēna delēcijas veidošanās mehānisms (adaptēts no Parl et al. [Parl, 2005]).

*GSTM2* gēns lokalizēts GST gēnu klasterī 1p13.3, un gan 3' gan 5' galā no gēna atrodas atkārtotas secības 4,2kb lielumā (atzīmētas pelēkā krāsā). Noteikot homologai rekombinācijai notiek ~16kb liela reģiona delēcija, kuras lielums var variēt, jo ir vairākas homologas secības šajā ģenētiskajā reģionā

Lai gan ir zināmas daudz dažādas *GSTM1* gēna alēles, tomēr nozīmīga ietekme uz enzīma aktivitāti ir nulles genotipam [Hayes, 2005]. Visbiežāk izmantotā metode ļauj identificēt nulles genotipu – delēciju homozigotiskā stāvoklī, bet netiek izšķirta delēcijas alēle heterozigotiskā stāvoklī [Parl, 2005], tāpēc arī tālāk tiek runāts par nulles genotipu. *GSTM1* nulles genotipa biežums Eiropas un Āzijas populācijās ir līdzīgs – ~50% [Bolt, 2006]. *GSTM1* nulles genotips ir analizēts saistībā ar daudzu audzēju attīstību, kuru attīstībā ir svarīga alkohola lietošana, smēķēšana.

*GSTM1* nulles genotips ir riska faktors cilvēkiem, kuri pastiprināti lieto alkoholu, lai attīstītos alkohola izraisīta aknu slimība – OR 1,43, CI95% 1,14 – 1,78 [Marcos, 2011], bet tā kā *GSTM1* nulles genotipam ir aprakstītas biežuma atšķirības starp dažādām populācijām, tad ir nepieciešams noskaidrot tā biežumu Latvijā un

saistību ar akūtu toksisku alkohola izraisītu hepatītu. Saistībā ar CVH, ir pētīts un konstatēts, ka *GTSMI* nulles genotips var veicināt tā pāriešanu hroniskā formā, kas saistīta ar dažādu komplikāciju attīstību [Martinez, 2007].

Aknās no visām sintezētajām GST visvairāk ir tieši GSTA, tie veido 65–80% [Bredschneider, 2002]. Alfa klases GST ir augsta glutaciona peroksidāzes aktivitāte [Whalen, 1998]. Lai gan GSTA kodē pieci gēni, tomēr *GSTAI* gēns veido 50% no GSTA ekspresijas aknās [Mulder, 1999]. *GSTAI* promotera rajonā ir identificēti pieci polimorfismi –631, –567, –69 un –52 pozīcijā, un visi polimorfismi atrodas ciešā nelīdzsvarotā saistībā, tāpēc šī rajona alēļu identificēšanai tiek izmantots viens no polimorfismiem –C69T (rs3957356) [Coles, 2001; Ping, 2006]. Polimorfisma ietekme uz gēna ekspresiju cilvēka aknās ir maz pētīta, un iegūtie dati liecina, ka polimorfisma ietekmē gēna ekspresija ir četras reizes samazināta [Coles, 2001]. Gēna ekspresija ir samazināta tikai attiecībā uz vienu no galvenajiem GSTA1 substrātiem, bet uz pārējiem diviem aktivitāte ir nemainīga (pētīti tika tikai 12 cilvēku aknu paraugi) [Ping, 2006]. Līdzīgi kā citu enzīmu ekspresiju *GSTAI* gēna aktivitāti ietekmē arī ārvides faktori [Bredschneider, 2002].

C69T polimorfismam ir vērojamas atšķirības starp dažādām populācijām – Āzijā analizētās alēles biežums ir 13–16%, Eiropā – 26 %, afroamerikāņu populācijā – 38% un spāņu populācijā 39% [Ping, 2006].

Cilvēkam GSTP pirmo reizi tika noteikta placentā 1989. gadā. Pašlaik ir zināms, ka GSTP ir izteikta audu specifiska ekspresija – augstā līmenī tā tiek ekspresēta placentā, un zemā – aknu audos (tikai biliārā epitēlijā, iekļaujot žultspūsli) [Howie, 1989]. GSTP ekspresija palielinās gan alkohola izraisītas aknu slimības gadījumā, iespējams, lai vairāk žultī tiktu izvadīti organismam kaitīgie toksīni [Harrison, 1990], kā arī dažādu audzēju gadījumos.

*GTSP1* gēnā ir aprakstīts polimorfisms piektajā eksonā (Ile105Val, A333G, rs1695), kas ietekmē enzīma funkcionālo aktivitāti, jo dotā aminoskābe atrodas GSTP enzīma elektrofilajā piesaistīšanas saitā, un tad katrai no alēlēm veidojas atšķirīga afinitāte pret noteiktiem substrātiem [Ali–Osman, 1997; Hu, 1997]. Saistībā ar alkohola izraisītu aknu slimību ir vairāki pētījumi, un 2011. gadā veiktajā meta–analīzē tika atrasts, ka retākās alēles homozigotisks genotips statistiski ticami saistās ar alkohola izraisītu aknu slimību alkoholiķiem (OR = 2,04, p = 0,03, CI95% 1,09–3,80) [Marcos, 2011]. Saistībā ar CVH, tiek aprakstīts, ka ir izmainīta

gēna *GSTP1* metilēšana HCV izraisītas hepatocelulārās karcinomas gadījumā [Marcos, 2011]. Saistībā ar biežāko polimorfismu, iespējams, Val alēle ietekmē hereditārās hemohromatozes klīniskās izpausmes [Stickel, 2005].

### 2.7.2. Metilēntetrahidrofolāta reduktāze (MTHFR)

Pacientiem ar alkohola izraisītu aknu slimību bieži vien atrod arī hiperhomocisteinēmiju, kas attīstījusies folāta, B<sub>6</sub> un B<sub>12</sub> vitamīnu deficīta dēļ, kas ietekmē metilgrupas pārneši [Stickel, 2012]. Hiperhomocisteinēmija var būt saistīta ar alkohola izraisītu aknu bojājumu [Ji, 2003]. Homocisteīna vielmaiņā viens no enzīmiem ir metilēntetrahidrofolāt reduktāze (MTHFR).

MTHFR ir viens no nozīmīgākajiem enzīmiem, kas ir iesaistīts folātu metabolismā, DNS sintēzē un DNS metilēšanā. Viens no gēna *MTHFR* funkcionāliem polimorfismiem ir C677T (rs1801133), kas homozigotiskā stāvoklī samazina enzīma aktivitāti par 30%, bet heterozigotiskā stāvoklī par 65% [Frosst, 1995]. Ja ir nepietiekama folāta uzņemšana (alkohola lietošanas dēļ [Seitz, 2007], saistībā ar uzturu [Kim, 2007]), tad paaugstinās homocisteīna līmenis, kas var izraisīt iekaisumu un cita veida bojājumu. Polimorfisms C677T ir plaši pētīts saistībā ar audzējiem, kuru attīstībā viens no riska faktoriem ir alkohola lietošana, piemēram, kakla, kolorektālais audzējs [Druesne–Pecollo, 2009]. Hiperhomocisteinēmija tiek saistīta arī ar terapijas efektivitāti CVH gadījumā [Borgia, 2009]. Bet, līdzīgi kā ar alkohola izraisītu aknu slimību, arī CVH gadījumā saistība ar *MTHFR* polimorfismiem parasti netiek apstiprināta, jo homocisteīna līmeni vairāk ietekmē uzturs, ja folātu uzņemšana ir pietiekamā līmenī.

### 2.7.3. N–acetil transferāzes

N–acetiltransferāze 2 (NAT2) ir enzīms, kas katalizē aromātisko un heterociklisko amīnu N–acetilēšanu [Blum, 1990]. Polimorfismi *NAT2* gēnā nosaka lēnu un ātru acetilēšanu [Sim, 2008] – C481T (rs1799929) ir klusējošs polimorfisms, kas viens pats nosaka normālu acetilēšanu, bet ietilpst lēnas acetilēšanas haplotipā NAT2\*5 [Agundez, 2008; Leff, 1999], G590A (rs1799930) ir NAT2\*6 veidojošā haplotipā) un G857A (rs1799931) ir NAT2\*7 veidojošā haplotipā) nosaka lēnu

acetilēšanu [Garcia-Closas, 2011]. Lai gan tieši alkohola metabolismā NAT2 nav iesaistīts, tomēr, tā kā tas ir iesaistīts dažādu piedevu (piemēram, etilkarbamāta, tetra-beta karotīnu vai pārtikas piedevu) metabolismā [Hein, 2002; Rehm, 2010], tad tas varētu būt saistīts ar alkohola izraisītu aknu bojājumu. Dati par acetilēšanas saistību ar alkohola izraisītu aknu slimību ir pretrunīgi, gan norādot, ka lēnā acetilēšana ir biežāk sastopama ilgstošiem alkohola lietotājiem, kuriem nav attīstījusies ciroze [Rodrigo, 1999], gan to, ka lēna acetilēšana varētu būt saistīta ar hepatocelulārās karcinomas attīstību alkohola lietotājiem [Agundez, 2002].

#### 2.7.4. Bilirubīns

Bilirubīnam piemīt antioksidanta loma, kas plaši ir pētīta saistība ar kardiovaskulārām slimībām [Stocker, 1987]. Saistībā ar paaugstinātu bilirubīna līmeni ir veikti arī genoma plašas asociācijas pētījumi (*Genome wide association studies*), un tomēr visnozīmīgākā asociācija ir ar gēnu *UGT1A1* [Datta, 2012], kurā esoša mutācija izraisa Žilbēra sindromu jeb labdabīgu hiperbilirubinēmiju [Bosma, 1995]. Visbiežākā mutācija ir (TA) atkārtojumu skaita izmaiņa *UGT1A1* gēna promotera reģionā. Bilirubīnam ir daļējs citoprotektīvs efekts pret alkohola izraisītu bojājumu, jo tas daļēji samazina lipīdu peroksidāciju [Yao, 2009]. Lai gan bilirubīna līmenis paaugstinās pie hroniskas alkohola lietošanas, kā sekas aknu bojājumam, tomēr vienlaicīgi etanols veicina gēna *UGT1A1* ekspresiju, kas nodrošina bilirubīna konjugēšanu un izvadīšanu no organisma [Kardon, 2000]. Saistībā ar CVH, bilirubīnam var būt ietekme gan oksidatīvā bojājuma mazināšanā, gan terapijā, lietojot proteāžu inhibitorus [Marques, 2010].

*UGT1A1* polimorfisms tiek aprakstīts arī saistībā ar hronisku CVH, bet dati ir pretrunīgi [Costa, 2011; Urbanek, 2011].

### **3. MATERIĀLS UN METODEDES**

#### **3.1. Materiāls**

##### **3.1.1. Ētiskie aspekti**

No visiem pētījumā iesaistītajiem indivīdiem tika iegūta informēta personas piekrišana, saskaņā ar RSU ētikas komitejas un LR Centrālās Ētikas komitejas atļaujām (skatīt pielikumā 1).

##### **3.1.2. Akūta alkohola toksiska hepatīta pacienti**

Pētījumā tika iekļauti 60 akūta toksiska hepatīta pacienti, kas ar šādu diagnozi tikuši hospitalizēti Latvijas Infektoloģijas centrā (pašlaik SIA RAKUS stacionārā Latvijas Infektoloģijas centrs) laika posmā no 2006.–2010. gadam.

Pacientu iekļaušanas kritēriji:

- alkohola lietošana anamnēzē;
- aknu bojājums, ko apstiprina bioķīmiskie rādītāji (aknu funkcionālie rādītāji ASAT, ALAT, GGT, bilirubīns, hialuronskābe, sārmainā fosfatāze, holesterīns, protrombīns, eritrocītu, leikocītu skaits);

Pacientu izslēgšanas kritēriji:

- cita iemesla (ne alkohola lietošanas) izraisīts toksisks aknu bojājums;
- atteikšanās no dalības pētījumā.

Akūta toksiska alkohola izraisīta hepatīta diagnoze tika uzstādīta, balstoties uz anamnētiskiem (alkohola lietošana) un klīniskiem un bioķīmisko izmeklējumu datiem. Pacientu grupā bija 35 (58%) vīrieši un 25 (42%) sievietes ar vidējo vecumu  $46,50 \pm 10,03$  gadi. 19 no pacientiem mira no toksiskā bojājuma izraisītajām sekām (9 vīrieši un 10 sievietes). Pacientiem slimības kulminācijas periodā tika noteikti šādi bioķīmiskie rādītāji – kopējais un tiešais bilirubīns, sārmainā fosfatāze, holesterīns, protrombīns, hialuronskābe, leikocītu un eritrocītu skaits, limfocītu un segmentkodolaino leikocītu procentuālais daudzums, retikulocītu daudzums, EGR, ALAT, ASAT, GGT, citohroma C un citokeratīna–18 līmenis.

No visiem pētījumā iekļautajiem 12 pacienti bija pēc masīvas saindēšanās gadījuma Preiļu rajonā, kur tika identificēta vienas izcelsmes nelegālā alkohola iegūšanas vieta (divi no pacientiem mira), un, iespējams, toksisko hepatītu izraisīja

nelegālajam alkoholam esošs poliheksametilenguanidīna hidrohlorīda piemaisījums, kas Latvijā netika laboratoriski pierādīts.

### **3.1.3. Kontroles grupa akūta alkohola toksiska hepatīta pacientiem**

Kontroles grupa tika veidota atbilstoši pacientu grupas dzimumu sadalījumam – 71 vīrietis (58%) un 51 sieviete (42%) vecumā no 21–25 gadiem (vidējais vecums  $22,3 \pm 3,1$  gads). Kontroles grupas indivīdiem nebija pieejamas bioķīmiskās analīzes, tāpēc tā tika izmantota, lai noteiktu analizēto ģenētisko marķieru biežumu populācijā. Kontroles grupas indivīdi sevi atzīmēja kā veselus indivīdus, netika atzīmēti dati par hroniskām saslimšanām un alkohola lietošanu.

### **3.1.4. Hroniska CVH pacienti**

Pacientu iekļaušanas kritēriji:

- vismaz 6 mēnešus ir bijusi pozitīva HCV–RNS, un anti HCV, kas noteikta SIA RAKUS stacionārā Latvijas Infektoloģijas centrā;
- ir pieejami bioķīmiskie un morfoloģiskie dati pirms terapijas vai diagnozes uzstādīšanas brīdī;
- ja pacients ir saņēmis antivirālo terapiju SIA RAKUS stacionārā Latvijas Infektoloģijas centrā, ir pieejami dati par terapijas gaitu un iznākumu;

Pacientu izslēgšanas kritēriji:

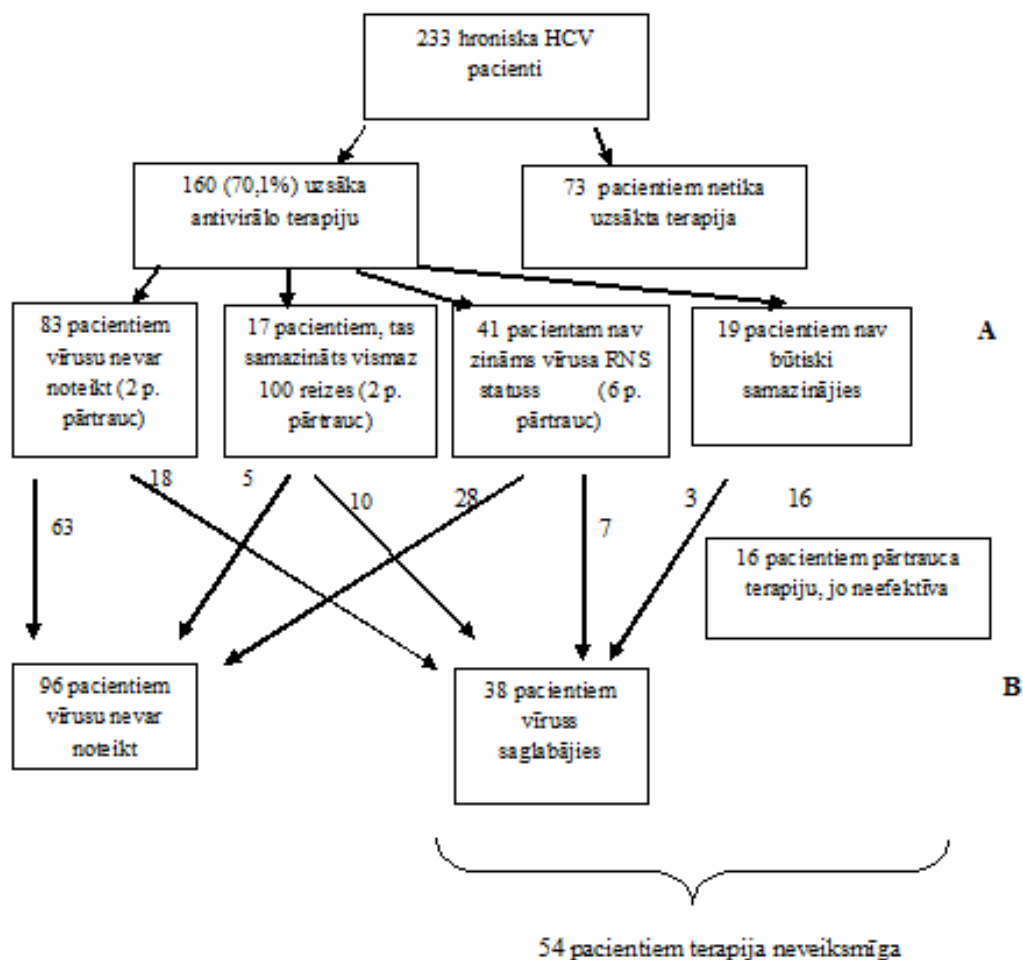
- netiek dota piekrišana dalībai pētījumā.

Kopā pētījumā tika iekļauti 233 pacienti, kuriem ir konstatēts HCV–RNS, 125 (53,6%) vīrieši un 108 sievietes (46,4%). Pacientiem diagnoze tika apstiprināta, nosakot HCV–RNS SIA RAKUS stacionārā Latvijas Infektoloģijas centrā. Diagnoze pacientiem tika uzstādīta laikā no 1992.–2009. Antivirālā terapija tika uzsākta 160 pacientiem laikā no 2001.–2013. gadam.

No visiem pacientiem 160 (70,1%) uzsāka kombinēto antivirālo terapiju – septiņi no pacientiem saņēma realdironu kopā ar ribavirīnu, un pārējie pegilēto interferonu ar ribavirīnu. Pacientu raksturojums ir attēlots 3.1. attēlā. Pacientus raksturojošie bioķīmiskie rādītāji tika iegūti no ambulatorajām kartēm: pirms terapijas tika ņemts vērā vīrusa genotips, vīrusa slodze – noteikts HCV–RNS līmenis (netika



noteikta pacientiem ar vīrusa genotipu 3, jo pacientiem ar šo HCV genotipu ir ļoti laba atbildes reakcija uz antivirālo terapiju), ALAT, ASAT, GGT, dzelzs, ferritīna, hialuronskābes, citokeratīna, citohroma C, leikocītu un eritrocītu skaits, neitrofilu procentuālā daļa, hemoglobīns, morfoloģiskie izmeklējumi, nosakot Knodēļa histoloģiskās aktivitātes indeksu (HAI), izvērtējot periportālo, intralobulāro un portālo infiltrāciju, kā arī fibrozes izteiktību (skatīt tabulā 3.1.).



### 3.1.att. Hroniska CVH pacientu raksturojums

A – trešais mēnesis pēc antivirālās terapijas uzsākšanas, B – antivirālās terapijas iznākums (noteikts 6 mēnešus pēc terapijas beigām)

Pacientiem, kuriem tika uzsākta terapija, trešajā mēnesī pēc terapijas uzsākšanas un sešus mēnešus pēc terapijas beigšanas tika noteikts HCV–RNS kvalitatīvi vai kvantitatīvi (vīrusa slodze netika noteikta pacientiem ar vīrusa genotipu

3), ALAT līmenis, leikocītu skaits, neitrofilu procentuālā daļa, hemoglobīna līmenis un eritrocītu skaits.

3.1.tabula

**Aknu morfoloģiskās izpētes shēma [Knodell, 1981]**

<b>Periportālā un tiltveida nekroze</b>		<b>Intralobulāra deģenerācija un fokāla nekroze</b>		<b>Portāla infiltrācija</b>		<b>Fibroze</b>	
Nav konstatēta	0	Nav konstatēta	0	Nav konstatēta	0	Nav konstatēta	0
Minimāla	1	Viegla: skar mazāk kā 1/3 daiviņu vai mezglu	1	Viegla	1	Fibrozēti, paplašināti portālie lauki	1
Mērena: mazāk nekā 50% perimetra	3	Mērena: skar 1/3–2/3 daiviņu vai mezglu	3	Mērenas intensitātes	3	Tiltveida fibroze	3
Izteikta: vairāk nekā 50% perimetra	4	Izteikta: skar vairāk kā 2/3 daiviņu vai mezglu	4	Izteikta	4	Ciroze	4
Mērena periportāla un tiltveida	5						
Izteikta periportāla un tiltveida	6						
Multilobulāra	10						
<b>Maksimālais HAI = 22</b>							

**3.1.5. CVH pacientu kontroles grupa**

Kontroles grupu veidoja 307 indivīdi, kas sevi atzīmēja kā veselus, vecumā no 21–25 gadiem (vidējais vecums  $23,3 \pm 2,1$  gads), 228 sievietes (74%) un 79 vīrieši (26%). Kontroles grupas indivīdiem nebija pieejamas bioķīmiskās analīzes, kā arī nebija noteiktas anti-HCV un HCV-RNS, tāpēc tā tika izmantota, lai noteiktu analizēto ģenētisko marķieru biežumu populācijā.

**3.2. Metodes**

**3.2.1. Ģenētiskā materiāla izdalīšana**

DNS tika izdalīta pēc adaptētas hloroforma/fenola izdalīšanas metodes [Sambrook, 2006].

### 3.2.2. Ģenētisko marķieru atlase un analīze akūta toksiska hepatīta pacientiem

Akūta toksiska hepatīta pacientu analīzei tika izvēlēti funkcionāli polimorfismi, kas raksturīgi Eiropas populācijas iedzīvotājiem gan etanola metabolismā tieši iesaistītajos gēnos (*ALDH2*), gan arī gēnos, kas ietekmē oksidatīvo stresu šūnā (*GST*, *NAT2*, *UGT1A1*, *MTHFR*). Noteicošais faktors polimorfisma izvēlē bija pierādīts efekts uz gēnu ekspresiju un enzīma aktivitātes izmaiņām vai samazinājumu. Izvēlētos marķierus, to funkcionālo aktivitāti un analīzei izmantotās metodes skatīt 3.2. tabulā.

3.2. tabula

**Akūta toksiska alkohola izraisīta hepatīta pacientu analīzei izvēlētie ģenētiskie marķieri un metodes**

Gēns	Alēle <sup>1</sup>	Rs# (dbSNP)	Alēles funkcionālā aktivitāte salīdzinot ar normas variantu	Metode
<i>ALDH2</i>	ALDH2*2 (GLU504LYS)	rs671	Nulles aktivitāte [ <i>Crabb</i> , 1989]	PCR–RFLP, izmantojot restrikcijas endonukleāzi – <i>AcuI</i> [ <i>Wang</i> , 2002]
<i>UGT1A1</i>	(TA) <sub>7</sub>	rs8175347	Samazināta aktivitāte [ <i>Bosma</i> , 1995]	Fluorescenta PCR, fragmentu analīze, izmantojot ABI Prism 310 ģenētisko analizatoru [ <i>Lin</i> , 2006]
<i>GSTA1</i>	C69T	rs3957356	Samazināta aktivitāte [ <i>Coles</i> , 2001]	PCR–RFLP, izmantojot restrikcijas endonukleāzi – <i>EamI</i> [ <i>Ping</i> , 2006]
<i>GSTP1</i>	A333G	rs1695	Samazināta aktivitāte [ <i>Johansson</i> , 1998]	PCR–RFLP izmantojot restrikcijas endonukleāzi – <i>Alw26I</i> [ <i>Harries</i> , 1997]
<i>GSTT1</i>	Nulles genotips	Gēna delēcija	Nav aktīva enzīma [ <i>Pemble</i> , 1994]	Multiplex PCR [ <i>Kondo</i> , 2009]
<i>GSTM1</i>	Nulles genotips	Gēna delēcija	Nav aktīva enzīma [ <i>Seidegard</i> , 1988]	Multiplex PCR [ <i>Kondo</i> , 2009]
<i>MTHFR</i>	C677T	rs1801133	Samazināta aktivitāte [ <i>Frosst</i> , 1995]	PCR–RFLP, izmantojot restrikcijas endonukleāzi – <i>HinfI</i> [ <i>Safarinejad</i> , 2012]

				Tabulas 3.2. nobeigums
Gēns	Alēle <sup>1</sup>	Rs# (dbSNP)	Alēles funkcionālā aktivitāte salīdzinot ar normas variantu	Metode
<i>NAT2</i>	C481T ( <i>NAT2</i> *5 <sup>a</sup> )	rs1799929 <sup>b</sup>	Normāla aktivitāte [Agundez, 2008; Leff, 1999]	PCR–RFLP, izmantojot restrikcijas endonukleāzi – <i>TaqI</i> [Gelatti, 2005]
	A590G ( <i>NAT2</i> *6 <sup>a</sup> )	rs1799930	Samazināta aktivitāte [Garcia–Closas, 2011]	PCR–RFLP, izmantojot restrikcijas endonukleāzi – <i>KpnI</i> [Gelatti, 2005]
	G857A ( <i>NAT2</i> *7 <sup>a</sup> )	rs1799931	Samazināta aktivitāte [Garcia–Closas, 2011]	PCR–RFLP, izmantojot restrikcijas endonukleāzi – <i>BamHI</i> [Gelatti, 2005]

<sup>a</sup> nosaukums, kas tiek lietots saskaņā ar Cilvēka Genoma organizācijas (*Human Genome Organisation – HUGO*) nomenklatūru ([www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/)), un references gēnu secība no NCBI datubāzes ([www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq)).

<sup>b</sup> SNP ir *NAT2*\*5 haplotipa sastāvā, bet nav galvenais to veidojošais SNP

### 3.2.3. Ģenētisko marķieru atlase un analīzes metodes hroniska CVH pacientiem

Hroniska CVH pacientiem tika analizēti molekulārie marķieri, kas nosaka monogēno aknu slimību attīstību (gēnos *SERPINA1* (alfa 1–antitripsīna nepietiekamība), *UGT1A1* (Žilbēra sindroms), *HFE* (hereditārā hemohromatoze), *ATP7B* (Vilsona slimība), kā arī gēnos, kas varētu ietekmēt iekaisuma procesus aknu šūnā un kuri nav iepriekš pētīti Latvijas populācijā (*GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipi, marķieri *GSTA1*, *GSTP1*, *CCR5* gēnos). Izvēlētos marķierus, to funkcionālo aktivitāti un analīzei izmantotās metodes skatīt 3.3. tabulā.

3.3.tabula

#### Hroniska CVH pacientu analīzei izvēlētie ģenētiskie marķieri

Gēns	Alēle <sup>1</sup>	Rs# (dbSNP)	Alēles funkcionālā aktivitāte salīdzinot ar normas variantu	Metode
<i>UGT1A1</i>	(TA) <sup>7</sup>	rs8175347	Samazināta aktivitāte [Bosma, 1995]	Fluorescenta PCR, fragmentu analīze [Lin, 2006]
<i>GSTT1</i>	Nulles genotips	Gēna delēcija	Nav aktīva enzīma [Pemble, 1994]	Multiplex PCR [Kondo, 2009]

Tabulas 3.3. nobeigums					
Gēns	Alēle <sup>1</sup>	Rs# (dbSNP)	Alēles funkcionālā aktivitāte salīdzinot ar normas variantu	Metode	
<i>GSTM1</i>	Nulles genotips	Gēna delēcija	Nav aktīva enzīma [Seidegard, 1988]	Multiplex PCR	[Kondo, 2009]
<i>CCR5</i>	32bp delēcija	rs333	Samazināta aktivitāte [Samson, 1996]	PCR	[Samson, 1996]
<i>ATP7B</i>	H1069Q	rs76151636	Samazināta aktivitāte [Thomas, 1995]	Bi Pasa PCR	[Krumina, 2008]
<i>SERP1-NA 1</i>	PIZ	rs28929474	Samazināta aktivitāte [Sambrook, 2006]	Bi Pasa PCR	[Rieger, 1999]
	PIS	rs17580	Samazināta aktivitāte [Curiel, 1989]	Bi Pasa PCR	[Rieger, 1999]
HFE	C282Y	rs1800562	Samazināta aktivitāte [Feder, 1998]	PCR-RFLP, izmantojot restriktāzi – <i>RsaI</i>	[Mura, 1997]
	H63D	rs1799945	Samazināta aktivitāte [Thomas, 1995]	PCR-RFLP, izmantojot restriktāzi – <i>MboI</i>	[Wang, 2011]

<sup>1</sup>Alēles tradicionālais nosaukums

### 3.2.4. Ģenētisko marķieru molekulārai analīzei izmantotās metodes

PCR reakcijas veikšanai tika izmantoti izvēlēti sintētiskie oligonukleotīdi (to secības visām analizētajām mutācijām skatīt 3.4. tabulā), lai nodrošinātu optimālu PCR reakciju un tika pavairots polimorfisma atpazīšana saits.

3.4.tabula

#### Izmantoto sintētisko oligonukleotīdu secības

Gēns	Mutācija/–s		Sintētiskie oligonukleotīdu secības	t°
Metode – PCR, gela elektroforēze				
<i>CCR5</i>	Del32	F	5'CCTGGCTGTCGTCATGCTG 3'	61°
		R	5'AGCCATGTGCACAACTCT 3'	
Metode – PCR, RFLP				
<i>MTHFR</i>	C677T	F	5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA3'	61°
		R	5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 3'	
<i>ALDH2</i>	ALDH2*2	F	5'TCAAATTACAGGGTCAACTGCTA 3'	62°
		R	5'GCCCCAACAGACCCCAATC 3'	

Tabulas 3.4. nobeigums

Gēns	Mutācija/-s		Sintētiskie oligonukleotīdu secības	t°
<i>NAT2</i>		F	5'GGAACAAATTGGACTTGG 3'	61°
		R	5'TCTAGCATGAATCACTCTGC 3'	
<i>GSTP1</i>	Ile105Val	F	5'ACCCCAGGGCTCTATGGGAA 3'	63°
		R	5'TGAGGGCACAAGAAGCCCCT 3'	
<i>GSTAI</i>	C69T	F	5'GCATCAGCTTGCCCTTCA 3'	61°
		R	5'AAACGCTGTCACCGTCCTG 3'	
<i>HFE</i>	H63D	F	5'ACATGGTTAAGGCCTGTTGC 3'	56°
		R	5'GCCACATCTGGCTTGAAATT 3'	
	C282Y	F	5'TGGCAAGGGTAAACAGATCC 3'	56°
		R	5'CTCAGGCACTCCTCTCAACC 3'	
Metode – Bi-pasa un multiplex PCR, gela elektroforēze				
<i>ATP7B</i>	H1069Q	W14R	5'GGG CCC TCT AAG TGG TTT TC 3'	60°
		W14F	5' CCC CTC CAT CTG TAT TGT GG 3'	
		H1069N	5' GAC TGC CAC GCC CAA GGG G 3'	
		H1069M	5' GGA GGC CAG CAG TGA ACA A 3'	
<i>SERPINA 1</i>	PIZ un PIS	M2F	5'GGCTGACACTCACGATGAAA 3'	61°
		M2F2	5'GTGTCCCCGAAGTTGACAGT 3'	
		M2R2	5'GGTGGGATTCACCACTTTTC 3'	
		M1F	5'TCAACGATTACGTGGAGAAGG 3'	
		M1R	5'ATCAGGCAGGAAGAAGATGG 3'	
		A1ATZR	5'AACTCTTCTTTAATGTCATCGAGG 3'	
<i>GSTT1</i> un <i>GSTM1</i>	Nulles genotipi	GSTT1F	5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'	61°
		GSTT1R	5'TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	
		GSTM1F	5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3'	
		GSTM1R	5'GTTGGGCTCAAATATACGGTGG 3'	
		DHFRF	GCATGTCTTTGGGATGTGGA	
		DHFRR	GGAATGGAGAACCAGGTCTT	
Metode – fluorescentā PCR un fragmentu analīze				
<i>UGT1A1</i>	(TA) <sub>7</sub>	GSR	5' CAACAGTATCTTCCCAGC 3'	61°
		GSF	FAM 5' CACGTGACACAGTCAAAC 3'	

PCR reakcijas veikšanai tika sagatavots maisījums, kopējā tilpumā 20 mkl: 2 mkl 10xPCR buferis (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- MgCl<sub>2</sub>, 2mkl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5mkl 10mM dNTP mix, 0,5 mkl 10 pmol sintētiskie oligonukleotīdi, 0,1 mkl Taq polimerāze (rekombinanta 5U/mkl). Visi reakcijas reaģenti no ražotāja ThermoScientific (Waltham, ASV), sintētiskie oligonukleotīdi no ražotāja Metabion (Martinsried, Vācija). Klāt pievienots 1 mkl (koncentrācijā 30ng/mkl) DNS parauga. Sagatavoto maisījumu ievieto automātiskajā termociklerā.

Lai veiktu restrikcijas fragmentu garumu analīzi (RFLP), tika gatavots maisījums kopējā tilpumā 6 mkl: 0,75mkl ddH<sub>2</sub>O, 1mkl restrikcijas endonukleāzei piemērots buferis, 0,25 mkl restriktāze, 4 mkl PCR produkts. Visas restriktāzes un tām piemērotie buferi no ražotāja *Thermo Scientific (Waltham, ASV)*. Sagatavoto maisījumu inkubē no 2 – 24 h atbilstoši restriktāzes piemērotākai temperatūrai, kas nodrošina tās optimālo darbību.

Pēc restrikcijas paraugi tika pārbaudīti 2% agarozes gelā vai 6–8% poliakrilamīda gela elektroforēzē, atkarībā no fragmentu garumu atšķirībām.

Iegūtais rezultāts tika vizualizēts ar etīdija bromīdu un tika dokumentēts, izmantojot fotodokumentēšanas iekārtu *OmniProGel*, ražotājs *UVITEC* (Kembridža, Lielbritānija).

Lai veiktu gēna *UGT1A1* alēles (TA)<sub>7</sub> noteikšanu, tika izmantota fluorescentā PCR un fragmentu garuma analīze, izmantojot ABI Prism 310 ģenētisko analizatoru (*Thermo Scientific/Applied Biosystems, Waltham, ASV*). PCR reakcija tika sagatavota pēc tāda paša principa, kas tika iepriekš aprakstīts. Lai identificētu alēles, paraugi (2 mkl PCR reakcijas) tika denaturēti, izmantojot 12 mkl Hi-Di formamīdu (*Applied Biosystems, ASV*) 94°C temperatūrā 5 min, lai noteiktu alēles garumu, tika izmantots garuma standarts Liz500 (*Applied Biosystems, Waltham, ASV*). Lai fragmentus izšķirtu, tika izmantots polimērs POP4 (*Applied Biosystems, Waltham, ASV*) atbilstoši ražotāja protokolam. Lai apstrādātu rezultātus, tika izmantota programma Gene Mapper v.2.0. (*Applied Biosystems, Waltham, ASV*).

### **3.3. Datu statistiskā apstrāde**

#### **3.3.1. Genotipēšanas datu kvalitātes kontrole**

Genotipēšanas datu kvalitātes kontrole tika veikta, izmantojot programmu PLINK [*Purcell, 2007*]: analīzei tika izmantoti ģenētiskie marķieri, kas atbilda šādiem kritērijiem:

- 1) noteikti vismaz 98% indivīdiem no atbilstošās pacientu un kontroles grupās;
- 2) retāk sastopamās alēles biežums (*minor allele frequency –MAF*) > 5%;
- 3) genotipu sadalījuma atbilstība Hārdija Veinberga likumam ( $p \leq 0,05$ ) – tas netika piemērots vienīgi *GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipiem, jo genotipēšanai izvēlētā metode ļauj noteikt tikai homozigotiskus genotipus.

Tomēr iedzimtu aknu slimību gadījumos analīze hroniska CVH pacientiem tika veikta arī gadījumos, ja to biežums bija mazāks kā 0,05 – mutācijām PIZ, PIS, H169Q, C282Y, jo tās izraisa monogēnās aknu slimības un ir būtiskas hronisku slimību, tai skaitā, hroniska CVH patoģenēzē.

### 3.3.2. Asociācijas analīze

Datu apstrādei tika izmantota PLINK datu statistiskās apstrādes programma [Purcell, 2007]. Lai izvērtētu alēļu asociāciju ar klīnisko fenotipu, tika izmantots hī kvadrāta ( $\chi^2$ ) tests, par ticamu asociāciju uzskatot, ja  $p < 0,05$ , nosakot arī izredžu attiecību (OR – *odds ratio*) un 95% ticamības intervālu (CI 95%). Iegūtajiem datiem netika piemērota Bonferoni korekcija, jo katrā eksperimentā tika noteikta viena polimorfisma alēle, izņemot *SERPINA1* gēna mutācijas PIZ un PIS, kā arī *GSTM1* un *GSTT1* gēnu nulles genotipus. Tā kā atsevišķi ģenētiskie marķieri atradās vienā hromosomā, tad tika veikta arī haplotipu analīze, haplotipu biežumu salīdzinājumam izmantojot Hī kvadrāta testu, par ticamu uzskatot, ja  $p < 0,05$ .

Atsevišķi tika izvērtēta gan alēļu, gan genotipu asociācija, pārbaudot vai nav asociācija ar dominanto (statistiski ticami atšķiras pacienti ar vismaz vienu mutāciju/polimorfismu no pacientiem bez tās) vai recesīvo iedzimšanas modeli (statistiski ticami atšķiras pacienti ar divām mutācijām/ polimorfismiem no pārējiem pacientiem) [Purcell, 2007].

Lai izvērtētu alēļu ietekmi uz bioķīmiskajiem rādītājiem, tika izmantota lineārā regresija, veicot analīzi pēc additīvā modeļa [Purcell, 2007]. Lai to izvērtētu, tika ņemts vērā BETA – regresijas koeficients, un statistiski ticama saistība tika pieņemta, ja  $p < 0,05$ . Lai novērtētu dažādu faktoru ietekmi uz iegūto asociāciju, tika veikta iegūto datu (BETA koeficienta un  $p$  vērtības) korekcija pēc dažādiem neģenētiskiem rādītājiem, kā dzimums, vecums, akūta toksiska hepatīta gadījumā pēc pacientu mirstības (akūta toksiska alkohola hepatīta pacientiem), hroniska C vīrushepatīta pacientiem pēc SVR sasniegšanas.



### 3.3.3. Bioķīmisko un klīnisko datu apstrāde

Bioķīmisko un klīnisko datu statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot datorprogrammas SPSS v.15.0. Pacientu parametru raksturošanai izmantotas vispārpieņemtās aprakstošās statistikas metodes, tika izvērtēti vidējās vērtības (*mean*) un standartnovirze. Rādītāju atšķirības nozīme ir izvērtēta ar 5% statistiskās kļūdas varbūtību, tādējādi, ja testu rezultātos *p*-vērtība bija mazāka vai vienāda ar 0,05, atšķirības starp pētījuma grupām tika atzītas par statistiski nozīmīgām.

Lai veiktu pacientu parametru datu salīdzinājumu starp grupām, vispirms tika noteikta datu atbilstība normālajam sadalījumam, izmantojot Kolmogorova–Smirnova testu. Parametriskiem datiem kvantitatīvo atšķirību analīzei starp divām grupām tika izmantots Stjudenta *t*-tests. Neparametriskajiem datiem tika izmantots Manna–Vitnija tests (*Mann–Whitney test*) un Wilkoksona tests (*Wilcoxon test*). Savukārt rādītāji, kuriem tika izvērtēta izmaiņa laikā (pacientiem, kuri saņēma terapiju, terapiju uzsākot, pēc trīs mēnešiem terapijas un 1 mēnesi pēc terapijas tika noteikts ASAT, leikocīti, neitrofili, eritrocītu skaits un hemoglobīna līmenis) tos salīdzinot, izmantojot Kruskola–Valisa testu.

## 4. REZULTĀTI

### 4.1. Akūta toksiska hepatīta pacientu raksturojums

Pētījumā tika iekļauts 61 pacients (35 vīrieši (58%) un 25 sievietes(42%)) ar akūta toksiska hepatīta diagnozi, kuri bija stacionēti SIA RAKUS stacionārā Latvijas Infektoloģijas centrs. 19 pacienti (deviņi vīrieši un desmit sievietes) stacionārā nomira no izraisītā aknu bojājuma. Pacientu hospitalizēšanas laiks bija no 2 nedēļām līdz 3 mēnešiem. Kontroles grupā bija 122 indivīdi (71 (58%) vīrieši un 51 (42%) sievietes) vecumā no 21–25 gadiem (vidējais vecums  $22,3 \pm 3,1$  gadi). Salīdzinot bioķīmiskos rādītājus, kas tika noteikti slimības kulminācijas periodā, starp sievietēm un vīriešiem, statistiski ticamas atšķirības tika atrastas holesterīna, protrombīna līmeņa un eritrocītu skaita līmeņos (statistiski ticami augstāki rādītāji bija vīriešiem,  $p < 0,05$ ) (rezultātus skatīt 4.1. tabulā).

4.1. tabula

#### Bioķīmisko rādītāju salīdzinājums akūto toksisko pacientu grupā starp dzimumiem

Rādītājs	Pacientiem kopā		Vīrieši		Sievietes		P vērtība
	Vid.	SD	Vid.	SD	Vid.	SD	
Bilirubīns ( $\mu\text{mol/l}$ )	432,12	199,51	446,41	211,81	407,44	179,436	0,515
Tiešais bilirubīns ( $\mu\text{mol/l}$ )	315,35	183,89	336,68	201,99	278,61	145,69	0,291
Sārmainā fosfatāze(U/l)	673,84	776,59	761	827,32	521,31	676,62	0,331
Holesterīns (mmol/l)	6,29	5,86	7,84	6,34	3,75	3,96	0,021
Protrombīns %	61,82	34,78	73,07	35,47	43,28	24,84	0,004
Hialuronskābe (ng/ml)	566,28	459,63	581,5	424,31	554,1	508,56	0,904
Leikocīti ( $\ast 10^9/l$ )	4,62	12,71	3,98	13,68	5,57	11,35	0,655
Limfocīti (%)	18,67	11,28	19,44	12,32	17,37	9,52	0,641
Segment–kodolainie leikocīti (%)	63,53	13,04	62,44	15,22	65,38	8,3	0,483
Eritrocīti ( $\ast 10^{12}/l$ )	3,05	0,88	3,35	0,81	2,54	0,75	0,001
Hemoglobīns (g/l)	120,09	110,18	125,12	127,30	112,43	79,62	0,686
Retikulocīti (‰)	24,77	13,56	21,85	13,09	28,78	13,49	0,090

Rādītājs	Tabulas 3.2. nobeigums						P vērtība
	Pacientiem kopā		Vīrieši		Sievietes		
	Vid.	SD	Vid.	SD	Vid.	SD	
EGR (mm/h)	57,48	32,77	57,93	31,45	56,76	35,75	0,910
ALAT (U/l)	81,58	142,99	75,58	53,34	91,37	225,29	0,709
ASAT (U/l)	138,08	121,67	121,58	71,26	165	174,92	0,224
GGT (U/l)	497,96	662,83	644,48	773,95	265,24	337,01	0,064
Citohroms C (ng/l)	0,88	1,96	1,13	2,27	0,60	1,55	0,399
Citokeratīns-18 (U/l)	1125,9	499,79	1088,82	504,17	1172,2	503,30	0,584

Vid. – vidējā vērtība (*mean*)

Pacientu vidējais vecums bija  $46,5 \pm 10,0$  gadi. Salīdzinot vecumu starp letālajiem un neletālajiem gadījumiem, netika atrasta statistiski ticama atšķirība (attiecīgi  $43,9 \pm 10,9$  un  $47,6 \pm 9,5$  gadi,  $p = 0,183$ , CI 95% 9,27–1,81).

4.2. tabula

#### Akūtu toksisku hepatītu pacientu salīdzinājums

Rādītājs	Neletāls iznākums		Letāls iznākums		p vērtība
	Vid.	SD	Vid.	SD	
Bilirubīns ( $\mu\text{mol/l}$ )	418,89	201,51	468,69	184,54	0,446
Tiešais bilirubīns ( $\mu\text{mol/l}$ )	295,25	192,92	371,00	148,83	0,206
Sārmainā fosfatāze (U/l)	700,16	800,24	611,08	744,33	0,733
Holesterīns (mmol/l)	7,11	6,23	4,06	4,16	0,124
Protrombīns %	68,27	34,29	45,95	31,83	0,050
Hialuronskābe	435,08	388,34	828,67	512,41	0,086
Leikocīti ( $\cdot 10^9/l$ )	3,39	8,673	7,86	19,96	0,250
Limfocīti	21,80	11,65	11,46	6,08	0,002
Eritrocīti ( $\cdot 10^{12}/l$ )	3,03	0,82	3,04	1,04	0,978
Hemoglobīns (g/l)	103,74	69,25	161,53	172,77	0,085
Retikulocīti (%)	25,20	13,69	23,92	13,72	0,769
Segment-kodolainie leikocīti (%)	62,77	11,57	65,31	15,34	0,564
EGR (mm/h)	60,16	32,82	51,08	33,06	0,408
ALAT (U/l)	71,65	51,96	109,85	272,44	0,413
ASAT (U/l)	132,27	85,76	154,61	194,87	0,574
GGT (U/l)	570,32	749,72	325,38	351,15	0,268
Citohroms C (ng/l)	21,80	11,65	11,46	6,08	0,04
Citokeratīns-18 (U/l)	1089,33	493,39	1192,19	520,62	0,515

Vid. – vidējā vērtība (*mean*)

Pacientu bioķīmisko rādītāju starp abām grupām salīdzinājums attēlots 4.2. tabulā – statistiski ticami atšķirās tikai protrombīna, limfocītu un citohroma C līmenis, kas bija augstāki izdzīvojušajiem pacientiem ( $p \leq 0,05$ )).

#### 4.2. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā, salīdzinot ar kontroles grupu

No analizētajiem ģenētiskajiem marķieriem tika izslēgts rs1799931, jo  $MAF < 5\%$  ( $MAF_{\text{pacientiem}} = 0,0092$  un  $MAF_{\text{kontroles grupai}} = 0,0098$ ). Hārdija Veinberga likumam neatbilda tikai divi marķieri – *GSTT1* un *GSTMI* gēnu nulles genotipi. Tālākajā analīzē netika iekļauts arī gēna *ALDH2* marķieris, jo tas bija monomorfs visiem analizētajiem paraugiem.

Analizējot ģenētisko marķieru asociāciju ar akūtu toksisku hepatītu, statistiski ticama atšķirība tika atrasta ar *GSTT1* nulles genotipu ( $MAF_{\text{pacientiem}} = 0,2$  un  $MAF_{\text{kontroles grupai}} = 0,1031$ ,  $p = 0,0042$ , OR 2,174, CI 95% 1,265–3,736). Rezultātus skatīt 4.3. tabulā.

4.3. tabula

#### Gadījuma kontroles asociācijas analīze akūtu toksisku hepatītu pacientu grupā

Rs# (dbSNP)	Gēns	Retākā alēle	MAF pacien- tiem	MAF kontroles grupai	$\chi^2$	P vērt.	OR	CI 95%
rs1801133	<i>MTHFR</i>	T	0.362	0.352	0.031	0.861	1.046	0.636– 1.719
–	<i>GSTMI</i>	Nulles genotips	0.367	0.435	1.811	0.178	0.752	0.496– 1.14
–	<i>GSTT1</i>	Nulles genotips	0.200	0.103	8.186	0.004	2.174	1.265– 3.736
rs4124874	<i>UGT1A1</i>	(TA) <sub>7</sub>	0.392	0.358	0.407	0.523	1.156	0.740– 1.805
rs3957356	<i>GSTAI</i>	T	0.433	0.348	2.706	0.099	1.432	0.933 2.199
rs1799929	<i>NAT2</i>	C	0.474	0.451	0.159	0.689	1.098	0.695– 1.734
rs1799930	<i>NAT2</i>	A	0.276	0.290	0.072	0.788	0.933	0.561– 1.552
rs1695	<i>GSTP1</i>	G	0.310	0.324	0.062	0.803	0.939	0.577– 1.531

Analizējot genotipu asociāciju ar akūtu toksisku hepatītu, *GSTA1* gēna polimorfisms rs3957356 pēc recesīvā modeļa uzrādīja saistību ar akūtu toksisku hepatītu (TT genotipa biežums pacientiem 0,304, kontroles grupai 0,137,  $\chi^2 = 4,329$ ,  $p = 0,037$ ), citi rezultāti nebija statistiski ticami ( $p > 0,05$ ).

Tika pārbaudītas arī alēļu kombināciju atšķirības starp kontroles grupu un pacientu grupu – netika atrastas statistiski ticamas kombinācijas, analizējot visus marķierus, kā arī atsevišķi *NAT2* gēna marķierus (rezultātus skatīt pielikumā). Atsevišķi analizējot GST kodējošo gēnu marķierus, statistiski ticamas atšķirības tika atrastas kombinācijās starp *GSTT1* un *GSTM1* nulles/ nenulles genotipiem (statistiski biežāk abi nenulles genotipi bija sastopami pacientu grupā ( $p = 0,004$ )). Analizējot GSTs četrus marķierus kopā, statistiski ticami biežāk kontroles grupā bija marķieru kombinācija, kas nosaka *GSTT1* nulles aktivitāti, *GSTM1*, *GSTA1* un *GSTP1* normālu aktivitāti. Rezultāti attēloti 4.4. tabulā.

4.4. tabula

**Alēļu kombināciju analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā salīdzinājumā ar kontroles grupu**

Analizēto gēnu (marķieru) secība kombinācijā	Alēļu kombinācija	MAF kontroles grupa	MAF pacientu grupā	$\chi^2$	P vērtība
<i>GSTT1/ GSTM1</i>	T0M1	0,1333	0,0627	6,565	0,0104
	T1M1	0,2333	0,3722	8,094	0,0044
<i>GSTT1/ GSTM1/ GSTA1/ GSTP1</i>	T0M1TA	0,0568	0,0161	5,23	0,0222
	T1M1CA	0,0891	0,1673	4,183	0,0408

**4.3. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā, salīdzinot letālu un neletālu iznākumu**

Pārbaudot, vai nav asociācijas starp smagāku toksiskā hepatīta izpausmi, tika salīdzināti alēļu biežumi 2 grupās – pacientiem ar letālo iznākumu un pacientiem, kuri atlaba. Statistiski ticama asociācija tika atrasta ar marķieri – rs1799930 (MAF mirušajiem pacientiem = 0,395 un MAFA atlabušajiem pacientiem = 0,218,  $p = 0,045$ , OR 2,340, CI 95% 1,006–5,441). Visu ģenētisko marķieru analīzes rezultāti attēloti 4.5. tabulā.

**Ģenētisko marķieru analīze mirušajiem un izdzīvojušajiem pacientiem**

Rs# (dbSNP)	Gēns	Retākā alēle (MAF)	MAF mirušajiem pacientiem (n = 19)	MAF izdzīvojušajiem pacientiem (n = 41)	$\lambda^2$	P vērtība	OR	CI 95%
rs1801133	<i>MTHFR</i>	T	0,472	0,312	2,742	0,098	1,968	0,878– 4,413
–	<i>GSTM1</i>	Nulles genotips	0,421	0,341	0,708	0,400	1,403	0,637– 3,088
–	<i>GSTT1</i>	Nulles genotips	0,263	0,171	1,386	0,239	1,735	0,689– 4,367
rs4124874	<i>UGT1A1</i>	(TA) <sub>7</sub>	0,368	0,402	0,126	0,723	0,866	0,392– 1,915
rs3957356	<i>GSTA1</i>	T	0,394	0,451	0,337	0,561	0,793	0,363– 1,735
rs1799929	<i>NAT2</i>	C	0,447	0,487	0,162	0,687	0,852	0,391– 1,856
rs1799930	<i>NAT2</i>	G	0,395	0,218	3,998	0,045	2,340	1,006– 5,441
rs1695	<i>GSTP1</i>	G	0,289	0,321	0,115	0,734	0,863	0,370– 2,015

Veicot analizēto marķieru kombināciju analīzi, salīdzinot abas pacientu grupas, netika atrastas statistiski ticamas kombinācijas, izņemot ar *NAT2* marķieriem C481T/ A590G haplotips TA, kas ir biežāks mirušajiem pacientiem (biežums 0,3947) kā kontroles populācijā (biežums 0,2179) ( $p = 0,045$ ). Šie rezultāti attēloti pielikumā.

**4.4. Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem akūta toksiska hepatīta pacientiem**

Izmantojot lineāro regresiju pēc aditīvā modeļa, tika pārbaudīta ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem. Statistiski ticama asociācija tika atrasta starp *GSTM1* un *GSTT1* gēnu nulles genotipiem un *NAT2* gēna marķieriem (statistiski ticamos rezultātus skatīt 4.6. tabulā, visus rezultātus skatīt pielikumā). *GSTM1* nulles genotips bija saistīts ar kopējā bilirubīna līmeni (BETA = 67,23,  $p = 0,014$ ) indivīdiem ar nulles genotipu vidējais bilirubīna līmenis ir  $362,62 \pm 205,44$ , bet ar nenulles genotipu –  $497,09 \pm 182,53$  ( $p = 0,014$ ); ar tiešo bilirubīnu

(BETA = 53,89, p = 0,023) – indivīdiem ar nulles genotipu vidējais tiešā bilirubīna līmenis ir  $287,32 \pm 173,28$ , bet ar nenulles genotipu –  $397,55 \pm 169,13$  (p = 0,20). Izmantojot kovariātus, vislielākā ietekme bija pacienta vecumam. *GSTT1* nulles genotips bija saistīts ar protrombīna līmeni (BETA = -11,05, p = 0,037, indivīdiem ar nulles genotipu vidējais protrombīna līmenis ir  $40,87 \pm 23,56$ , bet ar nenulles genotipu –  $62,93 \pm 33,67$  (p = 0,037) un hialuronskābi (BETA = 170,4, p = 0,014, indivīdiem ar nulles genotipu vidējais hialuronskābes līmenis ir  $899,58 \pm 443,15$ , bet ar nenulles genotipu –  $512,81 \pm 444,34$  (p = 0,009)).

4.6. tabula

**Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem akūta toksiska hepatīta pacientiem<sup>1</sup>**

Bioķīmiskais rādītājs	Rs# (dbSNP)	Gēns	BETA	P vērtība (neko-riģēta)	P koriģēta pēc vecuma	P koriģēta pēc dzimuma	P koriģēta klīniskā iznākuma
Bilirubīns	–	<i>GSTM1</i>	67,2	0,014	0,016	0,014	0,026
	rs1799930	<i>NAT2</i>	86,2	0,045	0,045	0,055	0,115
Tiešais bilirubīns	–	<i>GSTM1</i>	53,9	0,023	0,010	0,024	0,039
GGT	rs1799929	<i>NAT2</i>	-261,3	0,018	0,018	0,037	0,019
	rs1799930	<i>NAT2</i>	325,8	0,011	0,012	0,016	0,004
Sārmainā fosfatāze	rs1799929	<i>NAT2</i>	-270,5	0,032	0,025	0,052	0,032
	rs1799930	<i>NAT2</i>	374,8	0,011	0,013	0,015	0,020
Holesterīns	rs1799929	<i>NAT2</i>	-2,25	0,018	0,010	0,036	0,018
Protrombīns		<i>GSTT1</i>	-11,05	0,037	0,056	0,098	0,055
Hialuronskābe		<i>GSTT1</i>	170,4	0,014	0,034	0,037	0,020

<sup>1</sup>analizējot pēc aditīvā modeļa un koriģējot datus pēc pacientu vecuma, dzimuma un klīniskā iznākuma

*NAT2* gēna alēles rs1799929 un rs1799930 parādīja pretēju asociāciju – rs1799929 bija negatīva asociācija ar GGT (BETA = -261,3, p = 0,018), sārmaino fosfatāzi (BETA = -270,5, p = 0,032) un holesterīnu (BETA = -2,254, p = 0,018) – bioķīmiskie vidējie rādītāji atbilstoši genotipam attēloti 4.7. tabulā.

4.7. tabula

**NAT2 gēna polimorfisma C481T (rs1799929) genotipu asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem akūta toksiska hepatīta pacientiem**

Genotips	Holesterīns		GGT		SF	
	Vidējais	SD	Vidējais	SD	Vidējais	SD
CC	8,98	7,67	693,41	810,81	934,24	1173,69
CT	4,69	3,99	506,04	546,96	420,81	240,72
TT	3,69	3,41	160,92	165,33	415,86	312,63
P vērtība <sup>a</sup>	0,017		0,055		0,039	

<sup>a</sup> Salīdzinot vidējos bioķīmiskos rādītājus starp genotipiem

rs1799930 alēlei bija pozitīva asociācija ar bilirubīnu (BETA = 86,17, p = 0,045), gamma glutamiltransferāzi (BETA = 325,8, p = 0,011) un sārmaino fosfatāzi (BETA = 374,8, p = 0,011) – bioķīmiskos rādītājus atbilstoši NAT2 genotipiem skatīt tabulā 4.8. Saistību ar GGT ietekmēja tas, vai pacients stacionārā mira vai izdzīvoja (p<sub>koriģēts pēc terapijas iznākuma</sub> = 0,004) – rezultāti attēloti 4.8. tabulā.

4.8. tabula

**NAT2 gēna polimorfisma A590G (rs1799930) genotipu asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem akūta toksiska hepatīta pacientiem**

Genotips	Bilirubīns		GGT		SF	
	Vidējais	SD	Vidējais	SD	Vidējais	SD
AA	385,37	197,66	350,66	452,76	446,47	284,40
AG	428,87	190,01	506,65	511,51	541,30	617,37
GG	636,93	193,62	1303,75	1381,96	1700,25	1967,16
p vērtība <sup>a</sup>	0,064		0,015		0,002	

<sup>a</sup> Salīdzinot vidējos bioķīmiskos rādītājus starp genotipiem



#### 4.5. CVH pacientu raksturojums

Kopā pētījumā tika iekļauti 233 pacienti, kuriem bija diagnosticēts CVH – 125 (53,6%) vīrieši un 108 sievietes (46,4%). Bioķīmiskie dati bija pieejami, pacientiem uzsākot terapiju vai arī diagnosticējot slimību.

Pacientu bioķīmiskais raksturojums un salīdzinājums starp dzimumiem parādīts tabulā 4.9. Vīriešiem statistiski ticami augstāki bija ALAT, GGT un dzelzs līmenis kā arī leikocītu skaits ( $p < 0,05$ ), salīdzinot ar sievietēm. Eritrocītu skaits un hemoglobīna līmenis bija augstāks vīriešiem, kas būtu skaidrojams arī ar atšķirīgām normām starp dzimumiem.

4.9. tabula

**Pacientu raksturojums CVH diagnozes uzstādīšanas brīdī, salīdzinājums starp dzimumiem**

Rādītājs	Pacientiem kopā		Vīriešiem		Sievietēm		p vērtība
	Vid.	SD	Vid.	SD	Vid.	SD	
CVH atklāšanas vecums	38,73	12,88	37,62	13,52	40,03	38,73	0,156
Terapijas uzsākšanas vecums	39,63	12,04	38,29	12,32	41,27	11,57	0,113
HCV slodze	2,6 E+6	5,3 E+7	2,7 E+6	5,2 E+7	2,4 E+6	5,5 E+7	0,725
ALAT (U/l)	102,85	86,13	116,88	92,83	86,72	74,95	0,008
ASAT (U/l)	65,49	61,86	71,68	73,01	58,56	45,67	0,123
GGT (U/l)	70,49	80,64	86,33	96,23	54,49	57,18	0,005
Fe ( $\mu\text{mol/L}$ )	24,26	9,82	26,43	9,21	19,92	9,75	0,006
Ferritīns (ng/ml)	430,03	757,83	460,59	476,44	367,53	1150,3	0,640
Hialuronskābe (ng/ml)	52,76	95,31	46,29	52,76	59,05	123,51	0,427
Citokeratīns-18 U/l	340,94	342,23	352,26	399,25	330,03	278,74	0,685
Citohroms (ng/l)	0,39	1,08	0,39	0,69	0,39	1,36	0,984
Leikocītu skaits ( $\cdot 10^9/l$ )	5,89	1,63	6,11	1,66	5,65	1,56	0,036
Neitrofīli (%)	54,47	9,56	55,13	9,27	53,71	9,88	0,263
Eritrocītu skaits ( $\cdot 10^{12}/l$ )	4,72	0,49	4,91	0,48	4,5	0,40	0,000
Hb (g/l)	14,63	1,57	15,34	1,36	13,82	1,38	0,000
HAI	6,70	3,02	6,81	2,98	6,58	3,08	0,565

Vid. – vidējā vērtība (*mean*)

182 pacientiem tika noteikts vīrusa genotips – 71,4% bija genotips 1, 5,5% genotips 2 un 23,1 % bija genotips 3, 51 pacientam (21,9%) vīrusa genotips netika noteikts vai ambulatorajā kartē nebija atzīmēts. Salīdzinot savā starpā bioķīmiskos rādītājus pacientiem ar 1. genotipu pret pārējiem genotipiem – statistiski ticami atšķīrās tikai ALAT līmenis – 1. genotipam  $95,79 \pm 68,48$ , 2. un 3. genotipam  $119 \pm 159,42$ ,  $p = 0,018$ , citi rezultāti nav parādīti. Salīdzinot bioķīmiskos rādītājus starp pirmo un pārējiem genotipiem, statistiski ticami atšķīrās ALAT (1. genotipam  $95,79 \pm 68,48$  U/l, 2. un 3. genotipam  $135,51 \pm 120,86$  U/l,  $p = 0,06$ ), citokeratīns–18 (1. genotipam  $315,03 \pm 318,53$  U/l, 2. un 3. genotipam  $465,27 \pm 472,76$  U/l,  $p = 0,045$ ).

Savukārt, tā kā 3. vīrusa genotipam tiek aprakstīta izteiktāka steatozes attīstība, salīdzinot ar citiem genotipiem, tika salīdzināti bioķīmiskie dati diagnozes brīdī starp 3. un 1./2. vīrusa genotipiem. Statistiski ticamas atšķirības tika atrastas starp šādiem rādītājiem: ALAT (1./2. genotipam ALAT līmenis  $97,48 \pm 77,8$  U/l, 3. genotipam  $139,43 \pm 11,84$  U/l,  $p = 0,006$ ), ASAT (1./2. genotipam ASAT līmenis  $61,18 \pm 53,08$  U/l, 3. genotipam  $81,34 \pm 75,62$  U/l,  $p = 0,009$ ).

12 pacientiem morfoloģiski tika konstatēta aknu ciroze. Salīdzinot bioķīmiskos rādītājos pacientu grupās ar un bez cirozes, statistiski ticami atšķīrās ALAT, ASAT, GGT, citokeratīna–18 un hialuronskābes līmenis pirms terapijas uzsākšanas. Statistiski ticami rezultāti attēloti tabulā 4.10.

4.10. tabula

**Bioķīmisko rādītāju raksturojums pacientiem bez vai ar aknu cirozi**

Bioķīmiskie rādītāji	Pacienti ar cirozi (n = 12)	Pacienti bez cirozes (n = 214 <sup>a</sup> )	p vērtība <sup>b</sup>
ALAT (U/l)	$144,21 \pm 66,10$	$101,82 \pm 87,68$	0,006
ASAT (U/l)	$111,55 \pm 39,09$	$63,91 \pm 63,05$	0,000
GGT (U/l)	$128,08 \pm 101,00$	$66,40 \pm 78,86$	0,003
Citokeratīns–18 (U/l)	$622,75 \pm 362,58$	$333,49 \pm 243,55$	0,014
Hialuronskābe (ng/ml)	$210,55 \pm 136,47$	$44,04 \pm 87,74$	0,000

<sup>a</sup> Aknu biopsija netika veikta 13 hroniska CVH pacientiem, <sup>b</sup> p vērtība aprēķināta izmantojot Manna–Vitnija tests, kas ir piemērots neparametriskajiem datiem

Salīdzinot cirozes sastopamības biežumu starp vīrusu genotipiem, statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,05$ ) netika atrastas, ne salīdzinot katru vīrusu genotipus

atsevišķi, ne salīdzinot atsevišķi trešo vīrusa genotipu pret pārējiem diviem iespējamajiem genotipiem.

#### 4.6. CVH pacientu atbildes reakcija uz antivirālo terapiju

Antivirālo terapijas rezultāts tika izvērtēts 160 pacientiem (tika izslēgti pacienti, kuri personīgu iemeslu dēļ pārtrauca terapiju) – SVR tika sasniegta 46 (57,5%) vīriešu un 50 (71%) sieviešu (OR = 1,488, p = 0,077, CI 95% 0,949–2,332).

Salīdzinot savā starpā pacientus, kuriem antivirālā terapija bija veiksmīga (sasniegta SVR), ar tiem, kuriem tā bija neveiksmīga (neatbildētāji un tiem, kuriem pēc terapijas tika konstatēts HCV RNS), statistiski ticami zemāki bija GGT un hialuronskābes līmenis, fibrozes rādītāji un HAI kopējais indekss un augstāks leukocītu skaits un (p < 0,05) (rezultāti attēloti 4.11. tabulā).

4.11. tabula

#### Pacientu salīdzinājums ar efektīvu un neefektīvu antivirālo terapiju

Rādītājs	Terapija efektīva		Terapija neefektīva		p vērtība
	Vid.	SD	Vid.	SD	
Vecums	37,75	11,94	38,98	11,94	0,545
HCV slodze	2,6E+6	5,5E+7	3,4E+6	6,2E+7	0,489
ALAT (U/l)	112,71	97,09	110,47	81,98	0,888
ASAT (U/l)	63,23	60,69	74,28	59,22	0,304
GGT (U/l)	52,02	50,77	118,67	117,51	0,000
Dzelzs (µmol/L)	22,35	8,93	25,59	10,58	0,238
Ferriīns (ng/ml)	495,23	1099,06	518,15	552,03	0,938
Hialuronskābe (ng/ml)	36,76	42,09	71,52	94,74	0,021
Citokeratīns-18 (U/l)	387,23	424,39	355,85	356,60	0,714
Citohroms (ng/l)	0,22	0,45	0,65	1,89	0,106
Leikocītu skaits (*10 <sup>9</sup> /l)	5,98	1,66	5,32	1,19	0,012
Neitrofīli (%)	53,68	10,27	53,46	9,29	0,989
Eritrocītu skaits (*10 <sup>12</sup> /l)	4,63	0,49	4,77	0,49	0,114
Hemoglobīns (g/l)	14,41	1,50	14,76	1,49	0,184
Fibroze	1,2	0,97	1,78	1,34	0,003
HAI	6,63	2,7	7,73	2,99	0,027

Vid. – vidējā vērtība (*mean*)

Antivirālo terapiju saņēma 87,5% no pacientiem ar genotipu 1, 90% ar genotipu 2 un 85,7% ar genotipu 3. Salīdzinot terapijas efektivitāti starp genotipiem, tika atrasta statistiski ticama atšķirība ( $p = 0,001$ ), salīdzinot 1. pret 2. un 3. genotipu  $p = 0,003$ , salīdzinājumu skatīt 4.12. tabulā.

4.12. tabula

**Terapijas efektivitāte dažādiem vīrusu genotipiem**

Vīrusa genotips	Terapija efektīva	Terapija neefektīva		Kopā
		Terapija pārtraukta, jo neefektīva	Vīruss atjaunojas pēc terapijas	
1	59 (57,3%)	16 (15,5%)	28 (27,2%)	44 (42,7%)
2	5 (62,5%)	0	3 (27,5%)	3 (27,5%)
3	30 (88,2%)	0	4 (11,8%)	4 (11,8%)
Genotips 2 vai 3	35 (83,3%)	0	7 (16,7%)	7(16,7%)
Netika noteikts	2	0	3	

Viens no terapijas efektivitātes riska faktoriem ir izteikta aknu audu fibroze, un tās izteiktākā forma ir aknu ciroze. Savā starpā tika salīdzināta terapijas efektivitāte pacientiem ar un bez aknu cirozes. Starp pacientiem, kas saņēma terapiju, 143 pacientiem tika veikta aknu biopsija un 9 pacientiem tika konstatēta aknu ciroze. SVR tika sasniegta 89 (66,42%) pacientiem bez cirozes un 3 (33,33%) pacientiem ar cirozi ( $p = 0,045$ ).

**4.7. Bioķīmisko rādītāju izmaiņas, saņemot antivirālo terapiju**

Pacientiem, kuri saņēma antivirālo terapiju, pirms terapijas, trešajā terapijas mēnesī un sešus mēnešus pēc terapijas beigām tika noteikti ALAT, hemoglobīna līmenis un leukocītu, eritrocītu skaits un neitrofilu procentuālais sastāvs. Statistiski ticami atšķīrās visi rādītāji ( $p < 0,001$ ), gan kopēji visiem pacientiem, kas saņēma terapiju, gan salīdzinot atsevišķi pacientus, kuri sasniedz SVR un kuriem palika persistējošs vīruss, to vidējās vērtības attēlotas tabulā 4.13.

## Bioķīmisko rādītāju izmaiņas antivirālās terapijas laikā

	Pirms terapijas	Terapijas trešajā mēnesī	Vienu mēnesi pēc terapijas
ALAT (U/l)	115,42 ± 96,82	40,72 ± 33,52	41,58 ± 48,42
SVR sasniegta	115,79 ± 100,05	33,46 ± 23,25	20,75 ± 10,59
Persistējošs vīruss	114,28 ± 92,58	59,58 ± 46,43	93,86 ± 64,45
Leikocītu skaits (*10 <sup>9</sup> /l)	5,83 ± 1,59	2,72 ± 0,98	5,31 ± 1,39
SVR sasniegta	5,99 ± 1,68	2,67 ± 0,89	5,38 ± 1,41
Persistējošs vīruss	5,38 ± 1,29	2,87 ± 1,18	5,18 ± 1,35
Neitrofili %	54,31 ± 9,97	45,21 ± 10,65	54,61 ± 9,59
SVR sasniegta	53,88 ± 10,48	45,22 ± 11,44	45,87 ± 7,64
Persistējošs vīruss	55,34 ± 8,65	45,87 ± 7,64	55,00 ± 9,83
Eritrocītu skaits (*10 <sup>12</sup> /l)	4,66 ± 0,49	4,3,86 ± 0,62	4,53 ± 0,54
SVR sasniegta	4,61 ± 0,488	3,77 ± 0,57	4,45 ± 0,53
Persistējošs vīruss	4,76 ± 0,52	4,09 ± 0,72	4,75 ± 0,52
Hemoglobīns (g/l)	14,5 ± 1,51	11,95 ± 1,68	13,98 ± 1,64
SVR sasniegta	14,38 ± 1,49	11,66 ± 1,45	14,85 ± 1,53
Persistējošs vīruss	14,85 ± 1,54	12,74 ± 2,03	14,74 ± 1,47

## 4.8. Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu un kontroles grupā

Salīdzinot analizēto marķieru biežumus kontroles un hroniska CVH grupās, statistiski ticami atšķīrās *GSTM1* nulles genotips (OR = 1,487, p = 0,0052), *GSTT1* nulles genotips (OR = 1,621, p = 0,0226) un *CCR5* del32 alēle (OR = 1,675, p = 0,0026) (rezultāti attēloti 4.14. tabulā). MAF < 0,05 bija mutācijai C282Y (rs1800562) *HFE* gēnā, H1069Q (rs76151636) *ATP7B* gēna un abiem marķieriem *SERPINA1* gēnā, tā kā minētie marķieri izraisa retas autosomāli recesīvas slimības, tad tie tika atstāti turpmākajā analīzē, lai gan MAF < 0,05, un tālākā analīzē par statistiski ticamu uzskatot asociāciju, ja p < 0,05 un CI 95% neiekļāva viens.

**Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu un kontroles grupā**

Rs# (dbSNP)	Gēns	Retāk ā alēle	MAF CVH grupā	MAF kontroles grupā	$\lambda^2$	P vērtī ba	OR	CI 95%
–	<i>GSTM1</i>	M1	0,536	0,438	7,78	0,005	1,487	1,125–1,966
–	<i>GSTT1</i>	T0	0,156	0,103	5,2	0,023	1,621	1,067–2,46
rs8175347	<i>UGT1A1</i>	(TA) <sub>7</sub>	0,359	0,354	0,02	0,879	1,024	0,757–1,384
rs333	<i>CCR5</i>	D	0,245	0,162	9,08	0,003	1,675	1,195–2,348
rs1800562	<i>HFE</i>	Y	0,047	0,034	0,70	0,401	1,315	0,663–2,607
rs1799945	<i>HFE</i>	D	0,128	0,120	0,15	0,702	1,077	0,728–1,593
rs76151636	<i>ATP7B</i>	Q	0,016	0,007	1,70	0,192	2,228	0,648–7,661
rs28929474	<i>SERPINA</i>	PIZ	0,015	0,024	0,48	0,489	0,666	0,209–2,123
rs17580	<i>SERPINA</i>	PIS	0,016	0	3,39	0,065	NA	NA

Veicot genotipu asociācijas analīzi, pārbaudot visus iespējamus iedzimšanas modeļus (dominanto, recesīvo, alēlisko) stiprāka statistiskā asociācija bija *CCR5* gēna del32 alēlei – statistiski ticamākais bija recesīvais modelis (del32/del32 biežums CVH populācijā 13,5%, kontroles populācijā – 3,9%,  $p = 0,00038$ ).

#### 4.9. Ģenētisko marķieru analīze pacientiem, salīdzinot to ar terapijas efektivitāti

Ģenētisko marķieru analīze tika veikta 160 pacientiem, kuriem tika uzsākta terapija (10 pacienti terapiju pārtrauca nemedicīnisku iemeslu dēļ). 96 pacientiem terapija bija veiksmīga, tika sasniegta SVR, bet 56 pacientiem terapija nebija veiksmīga (19 pacienti bija totāli neatbildētāji un 16 no viņiem terapija tika pārtraukta).

Savstarpēji salīdzinot pacientus ar sasniegtu SVR un neefektīvu terapiju (rezultāti attēloti tabulā 4.15), statistiski ticami atšķīrās tikai *CCR5* gēna 32bp delēcija, kas bija biežāka pacientiem ar neefektīvu terapiju ( $MAF_{\text{neefektīvu terapiju}} = 0,3723$ ,  $MAF_{\text{SVR}} = 0,1625$ ,  $p = 0,0002$ ,  $OR = 3,057$ ,  $CI95\% = 1,69–5,13$ ), atsevišķi salīdzinot vīriešiem –  $MAF_{\text{neefektīvu terapiju}} = 0,3167$ ,  $MAF_{\text{SVR}} = 0,1$ ,  $p = 0,0013$ ,  $OR = 4,171$ ,  $CI95\% = 1,678–10,37$  un sievietēm –

$MAF_{\text{neefektīvu terapiju}} = 0,4706$ ,  $MAF_{\text{SVR}} = 0,225$ ,  $p = 0,0087$ ,  $OR = 3,062$ ,  
 $CI\ 95\% = 1,304-7,19$ .

4.15. tabula

**Alēļu asociācija ar SVR sasniegšanu**

Rs# (dbSNP)	Gēns	Alēle	MAF ar neefek- tīvu terapiju	MAF pacientu grupā	$\lambda^2$	p	OR	CI 95%
–	<i>GSTM1</i>	M0	0,436	0,473	0,296	0,586	0,859	0,496– 1,487
–	<i>GSTT1</i>	T0	0,128	0,131	0,005	0,943	0,971	0,430– 2,189
rs8175347	<i>UGT1A1</i>	(TA) <sub>7</sub>	0,396	0,354	0,449	0,503	1,192	0,713– 1,995
rs333	<i>CCR5</i>	D	0,372	0,162	14,29	0,000	3,057	1,69– 5,53
rs1800562	<i>HFE</i>	Y	0,041	0,073	1,135	0,287	0,540	0,171– 1,704
rs1799945	<i>HFE</i>	D	0,1	0,115	0,156	0,693	0,852	0,384– 1,888
rs76151636	<i>ATP7B</i>	Q	0,029	0,022	0,139	0,709	1,333	0,292– 6,078
rs28929474	<i>SERP1- NAI</i>	PIZ	0,009	0,028	1,034	0,309	0,343	0,039– 2,974
rs17580	<i>SERP1- NAI</i>	PIS	0,019	0,011	0,323	0,57	1,76	0,244– 12,69

Salīdzinot totālos neatbildētājus – 19 pacientus (pēc trīs terapijas mēnešiem vīrusa slodze nav samazinājusies vismaz 100 reizes) – statistiski ticama kā riska alēle bija *CCR5* gēna del32 alēle ( $MAF_{\text{neatbildētāji}} = 0,447$ ,  $MAF_{\text{atbildētāji}} = 0,204$ ,  $OR = 3,165$ ,  $p = 0,0012$ ) pārējie rezultāti ir attēloti tabulā 4.16.

Salīdzinot atsevišķi alēļu asociāciju tikai starp vīriešiem ( $n = 80$ ), asociācija ar *CCR5* gēnu bija izteiktāka ( $OR = 4,492$ ,  $p = 0,00098$ ,  $CI\ 95\% 1,754-11,5$ ), kā arī statistiski ticami biežāk bija H1069Q alēlei ( $MAF_{\text{neatbildētāji}} = 0,091$ ,  $MAF_{\text{atbildētāji}} = 0,016$ ,  $OR = 6,2$ ,  $p = 0,045$ ,  $CI\ 95\% 1,029-46,55$ ). Veicot alēļu asociāciju sievietēm ( $n = 70$ ), statistiski ticami kā riska alēlei bija *SERPINA1* gēna PIS alēlei ( $MAF_{\text{neatbildētāji}} = 0,0833$ ,  $MAF_{\text{atbildētāji}} = 0,0083$ ,  $OR = 10,82$ ,  $p = 0,042$ ,

CI 95% 0,632–185,1), kas visticamāk ir saistīts ar alēles reto sastopamību (pārējie rezultāti katram dzimumam atsevišķi attēloti pielikumā)

4.16. tabula

**Alēļu asociācija starp totāliem neatbildētājiem uz antivirālo terapiju**

Rs# (dbSNP)	Gēns	Alēle	MAF pacientiem ar nulles atbildi (n = 19)	MAF pacientiem ar atbildi uz antivirālo terapiju	$\lambda^2$	p vērtība	OR	CI 95%
–	<i>GSTMI</i>	M0	0,273	0,481	3,466	0,062	0,405	0,152– 1,076
–	<i>GSTT1</i>	T0	0,091	0,135	0,335	0,563	0,646	0,142– 2,902
rs8175347	<i>UGT1A1</i>	7	0,333	0,375	0,232	0,629	0,833	0,397– 1,75
rs333	<i>CCR5</i>	D	0,447	0,204	10,51	0,001	3,165	1,540– 6,502
rs1800562	<i>HFE</i>	Y	0,067	0,061	0,015	0,903	1,1	0,239– 5,063
rs1799945	<i>HFE</i>	D	0,118	0,109	0,023	0,878	1,091	0,357– 3,335
rs76151636	<i>ATP7B</i>	Q	0,059	0,020	1,846	0,174	3,038	0,566– 16,31
rs28929474	<i>SERPINA1</i>	PIZ	0	0,025	0,905	0,341	0	–
rs17580	<i>SERPINA1</i>	PIS	0,056	0,008	4,997	0,025	7,118	0,971– 52,2

Agrīna atbilde tiek definēta kā vīrusa izžušana trešajā terapijas mēnesī. Lai noskaidrotu, vai kādi no analizētajiem ģenētiskajiem marķieriem to ietekmē, savā starpā tika salīdzināti, pacienti, kuriem tā tika sasniegta, pret pacientiem, kuriem gan bija daļēja atbilde, gan nulles atbilde uz terapiju (35 pacientiem netika noteikta vīrusa slodze terapijas trešajā mēnesī). Statistiski ticami atšķīrās *GSTMI* nulles genotips –  $MAF_{\text{neatbildētāji}} = 0,3182$ ,  $MAF_{\text{agrīna virāla atbilde}} = 0,4853$ ,  $OR = 0,4949$ ,  $p = 0,052$ ,  $CI\ 95\% 0,2414–1,015$ . Salīdzinot šī genotipa biežumu vīriešiem, asociācija ar agrīnu virālu atbildi bija izteiktāka –  $OR = 0,4011$ ,  $p = 0,042$ ,  $CI\ 95\% 0,164–0,9809$ , sievietēm statistiski ticama asociācija netika atrasta ( $p > 0,05$ ).



#### 4.10. Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem un klīniskajiem rādītājiem pirms antivirālās terapijas

Veicot lineārās regresijas analīzi, asociācijai ar bioķīmiskajiem un morfoloģiskajiem datiem diagnozes uzstādīšanas brīdī, iegūtie dati tika koriģēti pēc dzimuma un vecuma, gan arī pēc dzimuma, vecuma un vīrusa genotipa kopā. Asociācija ar hemoglobīna līmeni tika koriģēta arī tikai pēc dzimuma, jo hemoglobīna līmenis statistiski ticami atšķiras starp dzimumiem.

Statistiski ticami rezultāti tika iegūti asociācijai starp PIZ alēli, kas saistītas ar paaugstinātu citohroma un hialuronskābes līmeni, PIS alēli, kas saistīta ar paaugstinātu hialuronskābes un samazinātu hemoglobīna līmeni (statistiski ticamā asociācija pazuda, kad vērtības tika koriģētas pēc dzimuma, dzimuma un vecuma vai dzimuma, vecuma un genotipa), *GSTMI* nulles genotips ar paaugstinātu citokeratīna līmeni, samazinātu HAI indeksu, un samazinātu hemoglobīna līmeni (statistiski ticamā asociācija pazuda, kad vērtības tika koriģētas pēc dzimuma, dzimuma un vecuma vai dzimuma, vecuma un genotipa) un *UGT1A1* gēna (TA)<sub>7</sub> alēli, kas bija saistīta ar paaugstinātu citokeratīna līmeni (rezultāti attēloti 4.17. tabulā).

4.17. tabula

#### Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem un morfoloģiskajiem rādītājiem (pēc aditīvā modeļa)

Rādītājs	SNP	Alēle	BETA	p vērtība
Citohroms C	rs28929474	PIZ	1,657	3,969E-005
			1,663 <sup>1</sup>	4,319E-005 <sup>1</sup>
			2,191 <sup>2</sup>	3,726E-006 <sup>2</sup>
Citokeratīns-18	-	M1	86,41	0,0153
			85,67 <sup>1</sup>	0,0205 <sup>1</sup>
			83,24 <sup>2</sup>	0,04925 <sup>2</sup>
	rs8175347	(TA) <sub>7</sub>	99,92	0,0498
			99,09 <sup>1</sup>	0,0527 <sup>1</sup>
			113,3 <sup>2</sup>	0,0719 <sup>2</sup>
			460,1	0,0005
rs17580	PIS	474,8 <sup>1</sup>	0,0004 <sup>1</sup>	
		629,1 <sup>2</sup>	0,0002 <sup>2</sup>	
		166,4	0,0001	
Hialuronskābe	rs28929474	PIZ	176,5 <sup>1</sup>	2,073E-005 <sup>1</sup>

Nobeigums 4.17. tabulai				
Rādītājs	SNP	Alēle	BETA	p vērtība
			28,72 <sup>2</sup>	0,4536 <sup>2</sup>
	rs17580	PIS	103,8	0,0101
			108,5 <sup>1</sup>	0,0051 <sup>1</sup>
			-26,02 <sup>2</sup>	0,4946 <sup>2</sup>
Hb pirms	–	M1	-0,345	0,0266
			-0,0906 <sup>3</sup>	0,527 <sup>3</sup>
			-0,0902 <sup>1</sup>	0,5301 <sup>1</sup>
			-0,1548 <sup>2</sup>	0,3073 <sup>2</sup>
	rs17580	PIS	-1,183	0,0521
			-1,03 <sup>3</sup>	0,0572 <sup>3</sup>
			-1,013 <sup>1</sup>	0,0628 <sup>1</sup>
			-0,2733 <sup>2</sup>	0,6529 <sup>2</sup>
Fibroze	rs28929474	PIZ	0,819	0,0753
			0,882 <sup>1</sup>	0,042 <sup>1</sup>
HAI	–	M1	-0,7737	0,0083
			-0,7358 <sup>1</sup>	0,0109 <sup>1</sup>
			-0,7173 <sup>2</sup>	0,0187 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>BETA un p vērtība koriģēts pēc vecuma un dzimuma,

<sup>2</sup>BETA un p vērtības koriģētas pēc vecuma, dzimuma un vīrusa genotipa,

<sup>3</sup>BETA un p vērtība koriģēts pēc dzimuma

## 5. DISKUSIJA

Endo– un ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto gēnu funkcionālo polimorfismu analīze tiek veikta daudzu slimību gadījumā, tai skaitā, aknu bojājuma, kardiovaskulāro slimību, diabēta u.c., jo audu bojājumu izraisa, ne tikai tiešs ķīmisks/infekciozs bojājums, bet arī izmainīta organisma atbilde uz šo bojājumu. Pētījuma ietvaros tika pētīti divi biežākie aknu bojājuma izraisītāji – alkohols un HCV [EASL, 2011; EASL, 2012; Mathurin, 2012], un to ierosinātās slimības – akūts toksisks alkohola hepatīts un hronisks CVH. Abas slimības ir plaši pētītas, bet aizvien tiek meklēti jauni bioķīmiskie un ģenētiskie marķieri, kas dotu iespēju precīzāk prognozēt slimības gaitu un CVH gadījumā arī antivirālās terapijas efektivitāti.

### 5.1. Aknu bojājuma smagumu nosakošie klīniskie un bioķīmiskie rādītāji akūta toksiska alkohola hepatīta pacientiem

Eiropā tiek izmantotas dažādas aknu bojājuma smagumu nosakošas skalas (*Maddrey, MELD, GAHS, ABIC* skalas), kas izmanto dažādus bioķīmiskus rādītājus, bet nav izveidota vienota klasifikācija, jo katrai no tām ir savas priekšrocības un trūkumi [EASL, 2012]. Latvijā netiek izmantota viena konkrēta skala alkohola izraisīta aknu bojājuma noteikšanai. Arī Latvijā ir reģistrēti divi patenti, kas ieteiktu izmantot endogēno endotoksīnu serdes IgA antivielas (LV14471B) un citohroma C (LV13855B) līmeņa analīzi serumā. Abi rādītāji pētījumā iekļautajiem pacientiem netika noteikti, tāpēc izvērtēt to nozīmību nebija iespējams.

Viens no bioķīmiskajiem rādītājiem, kas ir iekļauts aknu bojājuma novērtējuma skalās [EASL, 2012], ir protrombīns, jo tas parāda aknu sintēzes funkciju. Ja protrombīns ir samazināts, tad tas var liecināt par aknu bojājumu – nespēju nodrošināt aknu sintēzes funkciju [Lisman, 2010]. Mūsu pētījumā protrombīna līmenis statistiski ticami atšķīrās starp letālajiem un neletālajiem gadījumiem, apstiprinot to, ka tas ir nozīmīgs aknu bojājuma rādītājs. Tā kā tas atšķīrās arī starp dzimumiem ( $p = 0,004$ ), tad arī mūsu pētījumā iekļautajām sievietēm, iespējams, bija attīstījies smagāks aknu bojājums, līdzīgi, kā tas iepriekš ir aprakstīts [Stewart, 2001], jo netiek aprakstītas protrombīna līmeņa atšķirības starp dzimumiem. Sievietēm smagāka aknu bojājuma attīstība ir saistāma ar to, ka sievietes

organismā, salīdzinot ar vīrieša organismu, ir vairāk tauku un mazāk ūdens, tāpēc, lietojot vienu un to pašu daudzumu alkohola asinīs, veidojas augstāka alkohola koncentrācija, kā arī kuņģī esošā ADH ir ar zemāku aktivitāti, un līdz ar to alkohols tiek mazāk noārdīts, salīdzinot ar vīriešiem [Lieber, 2000]. Tomēr ir jāņem vērā, ka ne visiem pētījumā iekļautajiem pacientiem bija zināms no anamnēzes, cik ilgi un daudz ir lietots alkohols, un citi alkohola metabolismu ietekmējoši neģenētiski faktori.

Salīdzinot citus bioķīmiskos rādītājus starp dzimumiem, statistiski ticami atšķīrās holesterīna līmenis un eritrocītu skaits. Ir zināms, ka alkohols izmaina lipīdu metabolismu organismā, sievietēm vairāk samazinot ne–augsta blīvuma holesterīna līmeni [Wakabayashi, 2009], mūsu pētījumā statistiski ticamas atšķirības bija kopējā holesterīna līmenī (sievietēm statistiski ticami zemāks,  $p = 0,021$ ), kas ir līdzīgs jau aprakstītajai dzimumu atšķirīgajai alkohola ietekmei uz lipīdu līmeni [Wakabayashi, 2009]. Statistiski ticami neatšķīrās tādi bioķīmiskie rādītāji, kas specifiskāk raksturo aknu bojājumu kā GGT, ALAT, ASAT un sārmainā fosfatāze.

Pacientiem, kuri nomira no aknu izraisīta bojājuma, statistiski ticami neatšķīrās aknu bojājuma/iekaisuma marķieri, bet atšķīrās rādītāji, kas raksturo aknu sintēzes funkciju – protrombīns (statistiski ticami augstāks pacientiem, kuri izdzīvoja  $p = 0,05$ ) un limfocītu skaits, kas raksturo iekaisuma procesu (augstāks pacientiem, kuri izdzīvoja,  $p = 0,04$ ). Marcos *et al.* pētījumā pierādīts, ka limfocītu samazināts skaits liecina par samazinātu imunitāti/organisma aizsargspējām – statistiski ticamas atšķirības tika atrastas salīdzinot pacientus ar alkohola izraisītu cirozi un alkoholiķiem bez aknu slimības (OR = 1,40, CI 95% 1,11–1,77), bet netika atrastas, salīdzinot pacientus ar kontroles grupu (OR = 1,09, CI 95% 0,87–1,37) [Marcos, 2011]. Limfopēnija tiek aprakstīta saistībā ar aknu mazspējas attīstību alkohola izraisītas aknu cirozes gadījumā, bet  $CD4^+/CD8^+$  attiecība ir paaugstināta un saistīta ar fibrozes attīstību alkohola lietošanas gadījumā, un iespējams var tikt izmantota kā neinvazīvs fibrozes marķieris [Marcos, 2011].

Sārmainā fosfatāze, līdzīgi kā GGT, tiek aprakstīta kā specifiskāka alkohola izraisīta hepatīta rādītājs [Perrillo, 1978], bet mūsu pacientu grupā nebija iespējams izvērtēt tās salīdzinājumu ar kontroles grupu, bet salīdzinājumā ar references intervālu (0–117U/l) vidējās vērtības pacientu grupā bija palielinātas (673 U/l), bet nevienā no pašlaik plaši izmantotajām skalām sārmainā fosfatāze netiek iekļauta kā rādītājs, lai noteiktu alkohola izraisīta hepatīta smagumu [Mathurin, 2012]. Pacientu grupā,

izvērtējot un salīdzinot dažādas apakšgrupas (sievietes/vīrieši, letālie/neletālie gadījumi), netika atrastas statistiski ticamas atšķirības tās līmeņos.

## 5.2. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientiem

Pētījumā tika iekļauti 10 ģenētiskie marķieri, kas tika noteikti akūta toksiska hepatīta pacientiem, divi no tiem tika izslēgti no tālākās analīzes, jo *ALDH2* gēna marķieris bija monomorfs, kā jau iepriekš tas ir aprakstīts eiropiešu izcelsmes populācijās [Wang, 2002], un *NAT2* gēna alēle G857A (rs1799931), jo tās biežums bija mazāks kā 0,05. Tā kā *NAT2* polimorfismi ir plaši izmantoti populāciju pētījumos, tad tika noteikts alēles biežums Latvijas populācijā – G857A alēles biežums ir 0,0098. Salīdzinājumam tika izmantoti [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/) dati, vislielākā analizētā populācija (n = 226) ir HAPMAP projekta ietvaros, kur eiropiešiem šīs alēles biežums ir atrasts 0,009, kas sakrīt ar mūsu iegūtajiem datiem.

Analizējot pārējos ģenētiskos marķierus akūta toksiska alkohola hepatīta pacientu grupā, statistiski ticami rezultāti tika konstatēti, analizējot *GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipus, kā arī *NAT2* gēnā esošos marķierus.

### 5.2.1. GSTs kodējošo gēnu nozīme akūta toksiska hepatīta attīstībā

GSTs kodējošie gēni ir iesaistīti oksidatīvā stresa samazināšanā. Saistībā ar alkohola metabolismu vai ar tā lietošanu izraisītām slimībām visvairāk ir pētīti *GSTM1* un *GSTT1* nulles genotipi. Mūsu pētījumā tika atklāts, ka akūta toksiska hepatīta pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, ir biežāks *GSTT1* nulles genotips (OR = 2,174, p = 0,004), kā arī *GSTT1* un *GSTM1* nenulles genotipu kombinācija ir sastopama biežāk akūta toksiska hepatīta grupā, salīdzinot ar kontroles grupu (p = 0,004). Saistībā ar alkohola lietošanu Marcos *et al.* ir veikuši meta-analīzi, apkopojot informāciju no 15 dažādiem pētījumiem, kuros tika noteikta *GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipu un *GSTP1* gēna Ile105Val alēles biežums alkoholiķiem ar un bez cirozes, kā arī kontroles grupai. Statistiski ticama asociācija tika atrasta tikai ar *GSTM1* nulles genotipu un tikai, salīdzinot alkoholiķu grupas savā starpā – ar/bez alkohola izraisītu aknu slimību (OR = 1,43, CI 95% 1,14–1,78); un pacientiem ar alkohola izraisītu cirozi un alkoholiķiem bez aknu slimības (OR = 1,40,

CI 95% 1,11–1,77), bet ne ar kontroles grupu (OR = 1,09, CI 95% 0,87–1,37) [Marcos, 2011]. Rezultātu nesakritība ar *GSTMI* nulles genotipu mūsu pētījumā varētu būt saistīta gan ar izvēlētajās pacientu grupas lielumu, gan arī ar to, ka mūsu izvēlētajai pacientu grupai ne vienmēr bija zināma alkohola lietošanas anamnēze, un tie tika analizēti kā akūta toksiska hepatīta pacienti, nevis hroniski alkohola lietotāji, pretēji *Marcos et al.* aprakstītajos pētījumos, kuros bija iekļauti hroniski alkohola lietotāji ar/bez alkohola izraisītu aknu slimību/cirozi [Marcos, 2011]. *GSTMI* nulles genotips mūsu pacientu grupā saistās ar paaugstinātu bilirubīna līmeni (kopējo bilirubīna un tiešo bilirubīnu). *GSTMI* nulles genotips tiek saistīts ar hiperbilirubinēmiju jaundzimušo vecumā, kas tiek skaidrots ar *GSTM1* un *GSTA1* līdzību bilirubīna piesaistē un līdz ar to arī konjugēšanā [Muslu, 2008]. Vēlākā vecumā *GSTMI* saistība ar bilirubīnu tiek aprakstīta saistībā ar hepatotoksisku medikamentu lietošanu.

*Marcos et al.*, veiktajā meta-analīzes pētījumā netika atrasta asociācija ar *GSTT1* nulles genotipu un alkohola izraisītu aknu bojājumu [Marcos, 2011]. Skaidrojums, kāpēc mūsu pētījumā tika atrasta saistība ar *GSTT1* nulles genotipu un akūtu toksisku hepatītu, salīdzinot ar kontroles grupu, varētu būt vairāk saistīts ar nelegālā alkoholā esošo piemaisījumu atindēšanu, jo kā viens no specifiskiem substrātiem tiek minēts benzēns [Qu, 2005], kas var veidoties dažādos dzērienos, kuros ir nātrijs benzoāts un askorbīnskābe, kā arī ar izvēlētajās populācijas lielumu. *GSTT1* nulles genotips mūsu pētījuma grupā bija saistīts arī ar samazinātu protrombīna līmeni, iespējams, ka *GSTT1* nulles genotips ietekmē aknu bojājumu, jo protrombīns tiek lietots kā aknu bojājuma marķieris aknu mazspējas gadījumā [Robert, 1996]. Saistība starp *GSTT1* nulles genotipu un aknu bojājumu tiek aprakstīta saistībā ar medikamentu izraisītu idiosinkrātisku bojājumu [Lucena, 2008], bet saistība ar protrombīna līmeni netika apskatīta.

*GSTT1* nulles genotips saistīts arī ar paaugstinātu hialuronskābes līmeni, kas tiek atzīmēta kā labs marķieris fibrozes attīstībai CVH gadījumā [Avila, 2010]. Pētījuma grupai nebija pieejama informācija par fibrozi aknās, jo pacienti tika hospitalizēti ar akūtu toksisku hepatītu, kad biopsijas veikšana visbiežāk nav iespējama augstā riska dēļ, tāpēc nebija iespējams izvērtēt *GSTT1* nulles genotipa ietekmi uz fibrozes attīstību aknās alkohola lietošanas gadījumā.

### 5.2.2. *NAT2* gēna polimorfismu nozīme akūta toksiska hepatīta attīstībā

*NAT2* gēna polimorfismi nosaka lēnu vai ātru ksenobiotiķu acetilēšanu [Sim, 2008]. Mūsu pētījumā tika analizēti trīs polimorfismi, no kuriem viens tika izslēgts, jo retākās alēles biežums populācijā ir < 5%. Salīdzinot alēļu biežumus starp pacientiem un kontroles grupu, netika atrastas statistiski ticamas atšķirības, bet, salīdzinot savā starpā mirušos un izdzīvojušos pacientus, mirušajiem pacientiem bija biežāka A590G polimorfisma G alēle (OR = 2,34, p = 0,045), kas nosaka lēnu acetilēšanu, bet, analizējot haplotipus, biežāk bija haplotips, kas nosaka normālu acetilēšanu (p = 0,045), kaut gan C481T alēle ir iesaistīta haplotipos, kas nosaka lēno acetilēšanu. Iepriekš aprakstīts, ka lēna acetilēšana biežāk sastopama alkohola lietotājiem, kuriem nav attīstījies smags aknu bojājums – ciroze [Rodrigo, 1999], kas sakristu ar mūsu pētījuma grupā veikto haplotipu analīzi, bet ir pretrunā ar atsevišķu alēļu asociāciju, kas iegūta mūsu pētījumā. Lai noteiktu lēnas acetilēšanas iespējamo asociāciju ar aknu bojājumu, tika veikta lineārās regresijas analīze: pacientiem ar lēnu acetilēšanu (A590G polimorfismu saistīta) mūsu pētījuma grupā ir statistiski ticama saistība ar paaugstinātiem aknu bojājuma rādītājiem – GGT un sārmaino fosfatāzi (p < 0,05), salīdzinot ar normālu acetilēšanu, līdz ar to arī ar izteiktāku aknu bojājumu, kas paskaidro arī lēnās acetilēšanas nosakošās alēles biežāko sastopamību mirušajiem pacientiem mūsu pētījumā.

C481T alēle ir iekļauta haplotipā, kas nosaka lēnu acetilēšanu, bet par atsevišķu šī polimorfisma aktivitāti ir pretrunīgi viedokļi [Agundez, 2008]. Mūsu pētījuma grupā veiktā analīze pierāda, ka alēlēm C481T un A590G ir pretēja aktivitāte, gan veicot lineārās regresijas analīzi, gan arī salīdzinot vidējos bioķīmiskos rādītājus starp genotipiem. Statistiski ticami atšķīrās GGT un sārmainās fosfatāzes līmeņi starp indivīdiem ar dažādiem genotipiem. Abi rādītāji bija augstāki pacientiem ar lēnu acetilēšanu, kas apstiprinātu smagāka aknu bojājuma attīstību pacientiem ar lēnu acetilēšanu.

### 5.2.3. *UGT1A1* gēna polimorfismu nozīme akūta toksiska hepatīta attīstībā

Skaidrojums, kāpēc mūsu pētījumā netika atrasta saistība starp *UGT1A1* gēna polimorfismu, kas arī pēc plaša genoma asociācijas pētījumiem ir galvenais ģenētiskais marķieris saistīts ar bilirubīna līmeni [Lieber, 2000], varētu būt mazā

pētāmā pacientu grupa, kā arī tas, ka etanols izmaina gēna *UGT1A1* transkripcijas aktivitāti [Kardon, 2000], kas varētu kompensēt mutācijas (TA)<sub>7</sub> izraisīto samazināto gēna ekspresiju, kas izraisa labdabīgu hiperbilirubinēmiju [Muslu, 2008].

### 5.3. Hronisks C vīrus hepatīts

Pēc Pasaules veselības organizācijas datiem visā pasaulē pieaug saslimstība ar hronisku CVH, arī Latvijā pēdējos gados pieaug diagnosticēto pacientu skaits. Hronisks CVH parasti tiek atklāts regulārajās medicīniskajās pārbaudes, kā arī, veicot infekciju pārbaudi, kļūstot par donoru, jo sākotnējā periodā infekcija norit bez klīniskajiem simptomiem [EASL, 2011; Tolmane, 2011]. Latvijā no visiem gadā atklātajiem pacientiem CVH pacientiem antivirālo terapiju 2011. gadā saņēma 51,2 % pacienti un ~ 4% no pārtrauca ārstēšanos (SIA RAKUS stacionāra Latvijas Infektoloģijas centra dati). Promocijas darbā iekļautajā populācijā lielāks pacientu skaits saņēma terapiju (70,1%) un lielāks arī bija terapiju pārtraukušo personīgu iemesku dēļ skaits (6,25%). Latvijā terapijas pārtraukšana parasti notiek tāpēc, ka pacienti nonāk apcietinājumā vai emigrē, jo, salīdzinot ar citām valstīm, ir augstāka pacientu līdžestība, kas tiek saistīta ar to, ka atšķirībā no Eiropas Savienības valstīm pacientiem ir 25% līdžmaksājums terapijai, bet ar to arī saistīts, ka daļa no pacientiem nesaņem nepieciešamo antivirālo terapiju [Tolmane, 2012b]. Arī vīrusu genotipu sastopamības biežums ir līdzīgs kā Eiropā [EASL, 2011] – pētījuma grupā biežākais ir genotips 1 (71,4%). Tāpēc varētu secināt, ka izvēlēta pacientu grupa reprezentē hroniska CVH pacientus Latvijā.

#### 5.3.1. Hronisku CVH pacientu bioķīmiskais raksturojums un tā salīdzinājums starp dzimumiem

Hroniska CVH diagnoze tiek uzstādīta, nosakot anti-HCV, kā arī HCV-RNS, kura tiek konstatēta vismaz 6 mēnešus, bet, lai noteiktu aknu bojājumu, tiek veiktas arī bioķīmiskās analīzes un aknu biopsija [EASL, 2011]. Lai gan ir pētītas vairākas neinvazīvas metodes aknu bojājuma noteikšanai (*Fibrotest*, *HCV Fibrosure*, *ActiTest* [Poynard, 2004]), kas ir svarīgas, lai veiktu izvēli par terapijas nepieciešamību, tomēr arī Latvijā joprojām „zelta standarts” ir aknu biopsija [ESAL, 2011; Santantonio,



2008]. Pētījumā iekļautajiem pacientiem bija noteikts GGT, ALAT, kā arī bija zināms pacientu dzimums.

Lai HCV infekcija kļūtu hroniska, viens no riska faktoriem ir vīrieša dzimums [EASL, 2011; Massard, 2006]. Sliktāka prognoze ir saistīta ar to, ka sievietēm estrogēns nomāc zvaigžņveida aknu šūnu dalīšanos un fibroģenēzi, kā arī ietekmē transformējošā augšanas faktora un citu mediatoru sintēzi, kas ietekmē fibrozes attīstību aknu šūnās. Pateicoties tam, vīriešiem desmit reizes ātrāk kā sievietēm notiek cirozes attīstība hroniska CVH gadījumā [Massard, 2006]. Lai noteiktu, vai vīriešiem ir sliktāki bioķīmiskie rādītāji diagnozes uzstādīšanas brīdī, tie tika salīdzināti starp dzimumiem. Statistiski ticamas atšķirības tika atrastas ALAT, GGT, dzelzs līmenī, eritrocītu skaitā un hemoglobīna līmenī. Tas, ka vīriešiem statistiski ticami augstāki ir ALAT un GGT līmeņi, varētu liecināt par izteiktāku aknu bojājumu vīriešiem, kas sakrīt ar iepriekš aprakstīto [EASL, 2011], bet, salīdzinot HAI indeksu, kas morfoloģiski raksturo iekaisumu aknu šūnās, statistiski ticamas atšķirības netika atrastas ( $p = 0,565$ ). Dzelzs līmeņa atšķirības ir skaidrojamas ar to, ka sievietēm mēnešreizu laikā tiek zaudēts dzelzs, tāpēc arī tā līmenis ir zemāks [Zeuzem, 2000], kaut gan abiem dzimumiem vidējās vērtības dzelzs līmenim iekļāvās normas robežās ( $6,6\text{--}28,3 \mu\text{mol/l}$ ). Eritrocītu un hemoglobīna līmenim ir zināmas dzimumu atšķirības, tāpēc arī tiek lietoti dažādi references intervāli abiem dzimumiem. Iepriekš aprakstītās pilnas asinsainas izmaiņas hroniska CVH gadījumā atzīmē samazinātu neitrofilu un trombocītu skaitu [Streiff, 2002], šādas izmaiņas netika izvērtētas pētāmajā grupā, jo tika analizēti tikai neitrofilu absolūtie skaitļi un nebija pieejami pilnas asins ainas dati kontroles populācijai, bet CVH pacientiem leukocītu skaits un neitrofilu % iekļāvās references intervālā.

Starp dažādiem vīrusa genotipiem būtiskākās atšķirības tiek minētas starp 1./2. un 3. genotipu, kuram raksturīgāka izteiktāka aknu fibroze tieši uz steatozes fona [Manns, 2006]. Trešajam vīrusa genotipam statistiski ticami augstāki rādītāji bija – ALAT ( $p = 0,006$ ) un ASAT ( $p = 0,009$ ) līmenī, kas raksturo šūnu citolīzi, un citokeratīna-18 līmenis ( $p = 0,005$ ), kas raksturo šūnu apoptozi. CVH patogēnēzē ir svarīga loma šūnu apoptozei, jo HCV ierosina gan aknu šūnu (veicinot smagāka aknu bojājuma attīstību), gan leukocītu (vairāk saistīts terapijas efektivitāti – vīrusa persistēšanu) apoptozi [Parfieniuk–Kowarda, 2013], tāpēc tās raksturojošie rādītāji, piemēram, citohroms C un citokeratīns-18 tiek pētīti saistībā ar CVH. Citohroms C

vairāk raksturo nespecifisku audu šūnu nāvi, bet citokeratīns-18 specifiski norāda uz aknu šūnu, nevis mezenhimālo šūnu apoptozi. Aknu šūnu apoptozes vai nekrozes rezultātā palielinās arī ALAT, ASAT (nespecifiski šūnu bojāejas – apoptozes vai nekrozes rādītāji) un GGT (specifiskāks aknu šūnu enzīms, kuras līmenis var palielināties gan alkohola lietošanas gadījumā [Perrillo, 1978], gan aknu šūnu bojāejas gadījumā). Tāpēc, salīdzinot iegūtos datus, var noteikt, ka pacientiem ar trešo vīrusa genotipu ir izteiktāka aknu šūnu apoptoze, kas veido smagāku aknu bojājumu, kas sakrīt ar iepriekš aprakstīto [Poynard, 2003a]. Arī pie morfoloģiski visizteiktākā aknu bojājuma, cirozes, mūsu pētāmajā grupā statistiski ticami bija paaugstināti ALAT, ASAT, GGT, citokeratīna-18 un hialuronskābes līmenis ( $p < 0,05$ ). Hialuronskābe tiek sintezēta visos audos, aknās to sintezē Ito šūnas, tās līmenis ir normas robežās, ja nav aknu šūnu bojājuma, bet tā paaugstināšanās saistās ar fibrozes izteiktību aknu audos, un tiek aprakstīts, ka neatkarīgi no izraisītāja, hialuronskābe palielinās līdz ar fibrozes izteiktības pakāpi aknu audos [McHutchison, 2000].

Izvērtējot iegūto atradi, var secināt, ka papildus tradicionāli lietotajiem aknu bojājuma rādītājiem (ALAT, ASAT, GGT) arī Latvijā diagnostiski nozīmīgi būtu noteikt hialuronskābes un citokeratīna-18 līmeni, kas specifiskāk raksturotu aknu šūnu bojāeju un iekaisuma procesu.

### **5.3.2. Bioķīmisko rādītāju salīdzinājums starp pacientu grupām, kas saņēma terapiju**

Pētījuma grupā tika salīdzināti bioķīmiskie dati pirms terapijas uzsākšanas, pacientiem ar sasniegtu SVR un persistējošu vīrusu pēc terapijas beigām. Statistiski ticami atšķīrās aknu bojājuma rādītājs – GGT līmenis ( $p < 0,001$ ), fibrozi raksturojošs rādītājs – hialuronskābe ( $p = 0,021$ ), iekaisumu raksturojošs rādītājs – leukocītu skaits ( $p = 0,021$ ) un no morfoloģiskajiem izmeklējumiem – atsevišķi fibrozes novērtējums ( $p = 0,003$ ) un arī kopējais HAI ( $p = 0,027$ ). No rādītājiem tikai leukocītu skaits bija augstāks pacientiem ar sasniegtu SVR, bet pārējie rādītāji bija augstāki pacientiem ar persistējošu vīrusu arī pēc antivirālās terapijas. Augstāks leukocītu skaits nodrošina labāku imunitātes nodrošināšanu, kas nodrošina SVR sasniegšanu, kā arī raksturo HCV mazāk izraisītu bojājumu, jo vīruss ierosina gan aknu šūnu, gan leukocītu

apoptozi [Parfieniuk–Kowarda, 2013]. Pētījumā iegūtā informācija sakrīt ar iepriekš aprakstīto, ka antivirālās terapijas efektivitāte ir atkarīga no aknu audu fibrozes un iekaisuma attīstības [EASL, 2011].

Kā neefektīvas terapijas riska faktors tiek minēts vīriešu dzimums un lielāks vecums [EASL, 2011; Manns, 2006], arī mūsu pētījuma grupā tika iegūta gandrīz statistiski ticami saistība ar vīrieša dzimumu (OR = 1,49, p = 0,077), bet, salīdzinot slimības diagnosticēšanas vecumu, netika atrasta statistiski ticama saistība – SVR sasniegušajiem pacientiem vidējais vecums  $37,75 \pm 11,94$  gadi, ar persistējošu vīrusu  $38,98 \pm 11,94$  gadi (p = 0,545). Iespējamais izskaidrojums varētu būt, ka pacienti bija vienā vecuma grupā, kā arī iekļautajiem pacientiem bija līdzīgs dzimumu sadalījums, kā arī salīdzinoši mazā pētījuma grupa.

Pēc literatūras datiem SVR tiek sasniegta 40–50% pacientu ar 1.genotipu un ~80% ar 2. un 3. genotipu [EASL, 2011]. Mūsu pētījuma grupā efektīva terapija bija 57,3% pacientu ar 1. genotipu – 15,5% bija totāli neatbildētāji, tāpēc terapija tika pārtraukta, un 27,2% pacientiem notika vīrusa recidīvs, tas atjaunojās pēc terapijas beigām. Pētāmajā grupā pacientiem ar citiem vīrusu genotipiem netika konstatēts neviens totāls neatbildētājs un 16,7% notika vīrusa atjaunošanās, iegūtie dati sakrīt ar literatūras datiem [Bosma, 1995], un augstu SVR izdodas sasniegt, tikai pievienojot proteāžu inhibitorus ir iespējams sasniegt pat 95% SVR pacientiem ar 1. genotipu [Chae, 2013], kā arī citus specifiskākus medikamentus.

### **5.3.3. Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu grupā un to ietekme uz slimības gaitu**

HCV infekcijas gadījumā tiek meklēti ne tikai bioķīmiskie marķieri, kas ļautu precīzāk prognozēt gan antivirālās terapijas izvēli, gan tās prognozi, bet arī ģenētiskie faktori. Tā kā pacienta imunitātei ir loma infekcijas persistēšanā, tad tiek pētīti arī HLA gēnu ietekme uz CVH attīstību [EASL, 2011], Latvijā ir veikts pētījums, nosakot HLA klases riska alēles hemofilijas pacientiem, kuri inficēti ar CVH, atrodot, ka HLA alēlei DRB1\*07, biežāk atrodama pacientiem, kuriem šī infekcija pāriet hroniskā formā [Simanis, 2008], kā arī hroniska CVH pacientiem [Jērums, 2012], tāpēc šie marķieri netika iekļauti promocijas darbā.

Savukārt ar terapijas efektivitāti pasaulē pēdējos gados visvairāk pētīts ir *IL28B* polimorfisms, kas precīzāk ļauj prognozēt atbildi uz kombinēto antivirālo terapiju (pegilētais interferons un ribavirīns), ja pacients ir inficēts ar HCV 1.genotipu [Esteban, 2008; Tanaka, 2009; Wiegand, 2008]. Latvijā ir veikts pētījums, kurā arī apstiprināts, ka *IL28B* polimorfismam ir loma terapijas efektivitātē pacietiem ar vīrusa 1. genotipu [Tolmane, 2012b], bet tā kā pašlaik Latvijā vēl nav reģistrēti jaunākie medikamenti CVH ārstēšanai, tad droši vien minētā polimorfisma noteikšanai Latvijā, līdzīgi kā citu valstu vadlīnijās [Bosma, 1995], varētu būt ieteikuma raksturs.

Promocijas darbā tika pētīti dzelzs (gēns *HFE*), vara (gēns *ATP7B*) un bilirubīna (gēns *UGT1A1*) vielmaiņā iesaistītie gēnu polimorfismi, kā arī *del32* polimorfisms (gēnā *CCR5*), kas izmaina leikocītu *CCR5* receptora sintēzi un *GSTM1* un *GSTT1* nulles genotipi, kas saistīti ar oksidatīvo stresu šūnā, kas var ietekmēt CVH klīnisko gaitu. Tālāk aprakstīti atsevišķi katrs no analizētajiem polimorfismiem.

#### 5.3.3.1. *GSTM1* nulles genotipa ietekme uz CVH

Veicot gadījuma–kontroles analīzi pētījuma grupā, *GSTM1* nenulles genotips bija biežāk sastopams CVH pacientu grupā (OR = 1,487, p = 0,0052). Kontroles grupa bija gan jaunāka, gan arī tajā nebija atbilstoša dzimumu sadalījums, bet tā kā minētie marķieri ir autosomās, tad iegūtais rezultāts tika izmantots, lai noteiktu ģenētisko marķieru sastopamību vispārējā populācijā. Par *GSTM1* nulles genotipu saistībā ar CVH attīstību ir tikai atsevišķi pētījumi, kaut gan ir pierādīta oksidatīvā stresa loma HCV izraisītā aknu bojājuma attīstībā [Koike, 2006], gan arī HCV izmaina glutationa peroksidāzes aktivitāti organismā [Martinez, 2007], arī *GSTM1* un *GSTT1* piemīt tās aktivitāte [Hurst, 1998]. Iepriekš publicētā pētījumā, kurā tika analizēti 135 hroniska CVH pacienti, tika atklāts, ka CVH pacientiem biežāks ir tieši nulles genotips, nevis kā mūsu gadījumā nenulles genotips [Martinez, 2007]. Atšķirības būtu skaidrojamas ar nulles genotipa sastopamību dažādās populācijām [Josephy, 2010].

Analizējot *GSTM1* nulles genotipa ietekmi uz antivirālās terapijas efektivitāti, netika atrastas statistiski ticamas atšķirības starp pacientiem, kuriem tika sasniegta SVR un kuriem nē. Analizējot agrīnu vir;alu atbildi uz antivirālo terapiju, *GSTM1*

nulles genotips bija retāk sastopams pacientiem ar persistējošu vīrusu pēc antivirālās terapijas (OR = 0,4949, p = 0,052). Skaidrojums varētu būt, ka *GSTM1* nulles genotips ir saistīts ar lielāku oksidatīvo stresu hepatocītos HCV ietekmē, kas rada lielāku aknu bojājumu un, savukārt, aknu bojājums ir viens no riska faktoriem sliktākai atbildes reakcijai uz antivirālo terapiju [EASL, 2011].

Pamatojumu, ka mūsu pacientu grupā *GSTM1* nulles genotips ir saistīts ar aknu šūnu bojājumu, pierāda arī tas, ka *GSTM1* nenulles genotips ir saistīts ar HAI (BETA = -0,7737, p = 0,0083), un citokeratīna-18 līmeni, kas raksturo hepatocītu apoptozi (BETA = 86,41, p = 0,0153) – kas nozīmētu, ka nulles genotips aizsargā no hepatocītu apoptozes, bet veicina cita veida bojājumu aknu šūnā, piemēram, nekrozes un iekaisuma attīstību (jo pozitīvi korelē ar HAI). Lai izskaidrotu un pārbaudītu šos rezultātus, tie būtu jāpārbauda lielākā populācijā, jo pašlaik to ir iespējams tikai salīdzināt ar vienu pētījumu, kurā netika atrasta saistība ar bioķīmiskiem un morfoloģiskiem CVH pacientu datiem [Martinez, 2007]. Savukārt, veiktā meta-analīzes pētījumā, kurā tika analizēta hepatocelulārās karcinomas saistība (viens no kuras biežākajiem iemesliem ir hronisks CVH) ar *GSTM1* nulles genotipu, tika iekļauti 3 pētījumi par eiropiešu izcelsmes populācijām (pacientu skaits 443, kontroles grupā – 408 indivīdi) tika iegūts, ka *GSTM1* nulles genotips ir mazāk sastopams hepatocelulārās karcinomas pacientu grupā (OR = 0,79, p = 0,042, CI 95% 0,50–1,24). Vienā pētījumā tika atklāta *GSTM1* nulles genotipa tieša saistība ar CVH izraisītas hepatocelulārās karcinomas patoģenēzi, bet Indijas populācijā atklāts, ka *GSTM1* nulles genotips ir aizsargājošs pret hepatocelulārās karcinomas attīstību [Kiran, 2008]. Šos rezultātus varētu pielīdzināt mūsu pētījumā iegūtajam, ka *GSTM1* genotips ir saistāms ar aknu bojājumu CVH gadījumā, bet ir nepieciešami plašāki pētījumi, lai labāk raksturotu to nozīmi.

### 5.3.3.2. *GSTT1* nulles genotipa ietekme uz CVH

Līdzīgi kā *GSTM1*, arī *GSTT1* ir iesaistīts šūnas oksidatīva stresa regulēšanā un tam piemīt glutaciona peroksidāzes aktivitāte [Hurst, 1998]. Veicot gadījuma – kontroles analīzi, *GSTT1* nulles genotips bija biežāk sastopams hroniska CVH gadījumā (OR = 1,621, p = 0,0226), līdzīgi kā tas aprakstīts arī Spānijas populācijā [Martinez, 2007], bet, analizējot saistību ar atbildes reakciju uz antivirālo terapiju,

statistiski ticami rezultāti netika iegūti ( $p > 0,05$ ). Netika arī atrasta saistība ar bioķīmiskajiem vai morfoloģiskajiem datiem CVH pacientu grupā. Viens no skaidrojumiem, ko piedāvāja *Martinez S. et al.* [*Martinez, 2007*], ka saistību ar bioķīmiskiem rādītājiem CVH pacientu grupā neizdodas atrast, ir tas, ka GSTT1 un GSTM1 ir loma agrīnā infekcijas attīstībā, bet, analizējot hroniska CVH pacientus ar kontroles grupu šī ietekme nav atrodama bioķīmiskā līmenī [*Martinez, 2007*]. Lai apstiprinātu šo, ir nepieciešams palielināt pētāmo grupu, jo ir tikai atsevišķi pētījumi, kas apskata šo jautājumu.

### 5.3.3.3. *UGT1A1* gēna (TA)<sub>7</sub> alēles ietekme uz CVH

*UGT1A1* gēna (TA)<sub>7</sub> alēle izraisa labdabīgu hiperbilirubinēmiju jeb Žilbēra sindromu [*Muslu, 2008*], un tā kā bilirubīnam piemīt antioksidantu īpašības [*Stocker, 1987*], tas varētu ietekmēt iekaisuma attīstību aknu šūnās CVH pacientiem. *UGT1A1* mutācija tiek pētīta arī saistībā ar dažādu medikamentozu terapiju izraisītiem blakusefektiem [*Marques, 2010*].

Veiktajā gadījumā (hroniska CVH pacienti) – kontroles analīzē netika atrasti statistiski ticami rezultāti – iemesls varētu būt jaunākā un pēc dzimuma sadalījuma neatbilstoša kontroles grupa. Salīdzinot dažādas pacientu grupas pēc atbildes reakcijas uz antivirālo terapiju sava starpā, netika atrasta statistiski ticama asociācija ar *UGT1A1* (TA)<sub>7</sub> alēli ( $p > 0,05$ ). Līdzīgi negatīvi rezultāti ir aprakstīti arī iepriekš veiktajos pētījumos [*Costa, 2011; Urbanek, 2011*]. Negatīvā atrade varētu būt saistīta ar to, ka HCV infekcijas gadījumā ~10% pacientu veidojas autoantivielas pret *UGT1A1* veidoto enzīmu [*Bachrich, 2001*], kas varētu arī mazināt polimorfisma lomu saistībā ar paaugstinātu bilirubīna līmeni, un, iespējams, samazināto aknu šūnu iekaisumu.

Literatūrā ir aprakstīti divi gadījuma apraksti, kad pacientiem ar *UGT1A1* polimorfismu homozigotiskā formā (Žilbēra sindromu) pēc kombinētās antivirālās terapijas uzsākšanas dramatiski paaugstinājās kopējā bilirubīna līmenis, kas tika saistīts, gan ar interferona radīto stresu šūnai, gan ar ribavirīna izraisīto eritrocītu hemolīzi, kas paaugstina bilirubīna līmeni [*Deterding, 2009*]. Pētījumā iesaistajiem pacientiem netika noteikts bilirubīna līmenis, tāpēc nebija iespējams noteikt tā

saistību ar *UGT1A1* gēna polimorfismu, bet pie blaknēm netika atzīmēta arī izteikta dzelte, kas norādītu uz paaugstinātu bilirubīna līmeni.

Savukārt, analizējot saistību ar bioķīmiskajiem rādītājiem, *UGT1A1* polimorfisms statistiski ticami saistījās ar paaugstinātu citokeratīna-18 līmeni (BETA = 99,92,  $p = 0,0498$ , statistikā ticamība izzūd, ja dati tiek koriģēti pēc pacientu vecuma/dzimuma vai vecuma/dzimuma/vīrusa genotipa), norādot, ka polimorfisms, iespējams, varētu būt saistīts ar procesiem, kas ietekmē paaugstinātu hepatocītu apoptozi.

Lai noskaidrotu, vai *UGT1A1* gēna polimorfisms ir nozīmīgs CVH patoģenēzē, būtu nepieciešams noskaidrot, kurš no faktoriem ir nozīmīgāks – bilirubīna kā antioksidanta loma iekaisuma mazināšanā, vai HCV ietekmē veidotās antivielas pret glikuroniltransferāzi A1, kas, iespējams, pastiprina hepatocītu apoptozi.

#### 5.3.3.4. *CCR5* gēna del32 alēles ietekme uz CVH

Gēna *CCR5* mutācija del32 pirmo reizi tika aprakstīta saistībā ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV), jo gēns kodē vienu no limfocītu receptoriem, caur kuru HIV var inficēt limfocītus, tāpēc to dēvē par "HIV rezistences izraisošu mutāciju" [Curiel, 1989]. Turpmākos pētījumos tika atklāts, ka šī mutācija, lai gan aizsargā no HIV infekcijas, bet veicina HCV infekcijas attīstību [Woitas, 2002]. Ir bijuši arī pētījumi, kuros šāda asociācija netika atrasta [Tommasi, 2006]. Mūsu pētījuma grupā, veicot gadījuma – kontroles asociācijas analīzi, del32 alēle bija biežāka hroniska CVH pacientiem (OR = 1,675,  $p = 0,0026$ ), un visticamākais bija recesīvais iedzimšanas modelis, norādot, ka del32/del32 ir riska genotips HCV infekcijai.

Skaidrojums atrastajai asociācijai varētu būt, ka *CCR5* ir iesaistīts imūnās atbildes nodrošināšanā, kas ir svarīga, lai regulētu gan infekcijas saglabāšanas/persistēšanu, gan antivirālās terapijas efektivitāti. *CCR5* gēns kodē hemokīnu receptoru, un hemokīni ir hemostatiskie citokīni, kas nosaka šūnu virzību uz iekaisuma vietu, un *CCR5* ir viens no hemokīniem, kas ir nozīmīgs HCV klīniskajā attīstībā [Zeremski, 2011]. *CCR5* hemokīnu sintēze pastiprinās HCV inficētajās šūnās, un pierādīts, ka tie veicina fibrozes attīstību aknu šūnās HCV ietekmē [Zeremski, 2007], bet, veicot lineārās regresijas analīzi, lai noteiktu saistību ar

bioķīmiskajiem un morfoloģiskajiem rādītājiem mūsu pacientu grupā, tā netika atrasta ( $p > 0,05$ ).

Salīdzinot pacientus ar sasniegtu SVR, del32 bija biežāka pacientiem ar neefektīvu terapiju (OR = 3,057,  $p = 0,0002$ ), un biežāka pacientiem ar nulles atbildes reakciju uz antivirālo terapiju (OR = 3,165,  $p = 0,0012$ ), kas bija izteiktāka vīriešiem (OR = 4,492,  $p = 0,00098$ ). Iegūtie rezultāti ir pretēji iepriekš aprakstītajiem [Glas, 2003], bet iepriekš aprakstītās negatīvās asociācijas ar terapijas iznākumu bija mazākās pacientu grupās ( $n = 78$  [Ahlenstiel, 2003],  $n = 59$  [Glas, 2003]), vienā no pētījumiem bija aprakstīts, ka del32 mutācijai ir ietekme monoterapijā ar ribavirīnu [Ahlenstiel, 2003].

Lai gan pierādīta hemokīnu loma HCV infekcijas gadījumā, tomēr ir salīdzinoši maz publicētu pētījumu par biežāko mutāciju *CCR5* gēnā, kas ietekmē šī proteīna sintēzi un CVH klīnisko gaitu un arī atbildes reakciju uz antivirālo terapiju, tāpēc būtu nepieciešams pētījumu turpināt lielākā pacientu grupā.

#### **5.3.3.5. *HFE* gēna C282Y un H63D alēļu ietekme uz CVH**

Mutācijas *HFE* gēnā izraisa hereditāro hemohromatozi – iedzimtu vielmaiņas slimību, kas saistās ar dzelzs uzkrāšanos parenhimatozajos orgānos, tai skaitā aknās. Simptomi, kas visbiežāk iekļauj glikozes tolerances traucējumus, aknu bojājumu, ādas krāsas izmaiņas, kardiomiopātiju, vīriešiem sākas 40–60 gadu vecumā, sievietēm biežāk pēc 60 gadu vecuma [Zeuzem, 2000].

Analizējot minētās mutācijas CVH pacientiem, bija zināms, ka C282Y mutācijas biežums ir  $< 5\%$ , bet tā kā tā izraisa hereditāro hemohromatozi, tā tika iekļauta arī turpmākās analizēs. Tomēr ar nevienu no rādītājiem netika atrasta statistiski ticama asociācija. Iemesls varētu būt tas, ka klīniski nozīmīga dzelzs uzkrāšanās hemohromatozes gadījumā notiek lielākā vecumā, salīdzinot ar pētījumā iekļautajiem CVH pacientiem (vidējais vecums –  $38,73 \pm 12,88$  gadi), iespējams, tāpēc arī netika atrasta asociācija ar dzelzs un ferritīna līmeni CVH pacientiem. Lai gan dzelzs loma CVH patoģenēzē ir pierādīta [Chen, 2012; Jia, 2012; Knapp, 2011], tomēr dati par gēna *HFE* mutāciju saistību ar CVH ir pretrunīgi. Li S *et al.* veiktajā meta-analizē tikai H63D mutācijai ir atrasta saistība ar SVR [Li, 2012], kuras biežums Latvijā ir 12%, bet Lietuvā pat  $\sim 16\%$  [Coelho–Borges, 2012], salīdzinot



C282Y mutācijas biežums Latvijā ir 3,5 %. Saistība ar H63D mutāciju tiek pamatota ar to, ka tā atrodas ciešā saistībā ar citiem lokusiem 6.hromosomā, tai skaitā HLA klases alēlēm [Lebray, 2004], un tām ir nozīme CVH attīstībā [Kuniholm, 2013; Simanis, 2008]. Gēna *HFE* un HLA klases nozīmību varētu ietekmēt arī tas, ka 3a genotipa HCV ietekmē cilvēka organismā palielinās *HFE* un HLA antigēnu ekspresija uz šūnu virsmas [Cardoso, 2004].

Noskaidrot saistību ar *HFE* gēna alēlēm būtu nozīmīgi, jo, ja iemesls ir paaugstināta dzelzs uzkrāšanās, tad, lai uzlabotu antivirālās terapijas efektivitāti, būtu iespējams izmantot hemohromatozes terapiju – flebotomiju, kas tiek pētīta arī neatkarīgi no *HFE* gēna mutācijām [Mitsuyoshi, 2013], kas tiktu ierobežota terapijas laikā, jo ribavirīns izraisa eritrocītu skaita samazināšanos [EASL, 2011].

#### 5.3.3.6. *ATP7B* gēna H1069Q alēles ietekme uz CVH

*ATP7B* gēns ir iesaistīts vara vielmaiņā un mutācijas tajā izraisa autosomāli recesīvu vielmaiņas slimību – Vilsona slimību [Mura, 1997]. Pētījumā tika iekļauta H1069Q mutācijas analīze. Lai gan tās biežums ir mazāks kā 0,05, tomēr tā tika iekļauta analīzē, jo tā izraisa vielmaiņas slimību un tās nesēju biežums Latvijā ir 1:80, kas ir nedaudz augstāks, kā vidēji tiek atzīmēts Eiropā – 1:90 [Lace, 2008].

Veicot asociācijas pētījumu, statistiski ticama asociācija tika atklāta tikai ar SVR nesasniegšanu vīriešiem (OR = 6,2, p = 0,045). Vilsona slimības gadījumā netiek aprakstītas vara uzkrāšanās atšķirības starp dzimumiem [Mura, 1997], bet sievietēm ir labāka atbilde uz HCV antivirālo terapiju saistībā ar estrogēna sintēzi [EASL, 2011; Bosma, 1995]. Iegūtais mūsu rezultāts būtu skaidrojams ar to, ka mutācija izraisa pastiprinātu vara uzkrāšanos aknu audos un arī izteiktāku aknu iekaisumu [Marikovsky, 2002], un tas ir viens no riska faktiem antivirālās terapijas efektivitātei [EASL, 2011], bet mūsu pētāmajā populācijā H1069Q mutācijai nebija saistīta ar kādu no iekaisuma vai fibrozes rādītājiem.

Saistībā ar CVH klīnisko gaitu ir publikācijas, kas izsaka pieņēmumu, ka Vilsona slimība un tās izraisošās mutācijas izraisa zināmu aizsardzību pret HCV infekciju, pētījumā bija iekļauti 60 molekulāri apstiprināti Vilsona slimības pacienti un 94 indivīdi, kuri ir vienas mutācijas nesēji gēnā *ATP7B* [Liggi, 2012]. Arī vara nozīme hroniskas CVH gaitā tiek pētīta [Ko, 2005], jo varš organismā iesaistās

imunitātes regulēšanā, kaut gan precīzs mehānisms vēl joprojām nav zināms [Lucena, 2008]. Un ir zināms, ka CVH pacientiem tiek atrasts paaugstināts vara līmenis, bet tas vairāk tiek saistīts nevis ar vara uzkrāšanos, bet ar tā atbrīvošanos hepatocītu apoptozes laikā [Guo, 2013], bet tā paaugstināšanās ir izteiktāka tieši akūtas infekcijas laikā [Rashed, 2011].

Arī literatūrā parādās pretrunīgi dati par vara un Vilsona slimības saistību ar CVH, kuru būtu nepieciešams pētīt lielākā populācijā, iekļaujot arī vara līmeņa noteikšanu CVH pacientiem. Jo arī vara līmeņa samazināšanai ir pieejami efektīvi medikamenti, piemēram, D–penicilamīns.

### 5.3.3.7. *SERPINA1* gēna PIZ un PIS alēles ietekme uz CVH

*SERPINA1* gēna mutācijas PIZ un PIS izraisa iedzimtu vielmaiņas slimību – alfa 1–antitripsīna nepietiekamību, kas tradicionāli tiek raksturota ar neskaidru hepatītu bērnībā un emfizēmas attīstību pieaugušo vecumā [Chappell, 2008], bet turpmākos pētījumos ir pierādīts, ka tā var izraisīt aknu bojājumu pieaugušo vecumā, bet mutācijas nesējiem aknu bojājums attīstās ~66 gadu vecumā [Topic, 2012]. Abu mutāciju biežums CVH pacientiem un ietekme uz klīniskajiem simptomiem tika analizēta, neskatoties uz to, ka mutāciju biežums ir < 0,05. PIZ mutācija tika iekļauta pētījumā, jo iepriekš veiktajos mutāciju biežuma pētījumos, ir pierādīts, ka tā ir bieži sastopama Latvijas populācijā [Lace, 2008].

Veicot asociācijas analīzi, statistiski ticama saistība tika atrasta starp PIS mutāciju un nulles atbildi uz antivirālo atbildi (OR = 7,118, p = 0,0254, CI 95% 0,9705–52,2), kas bija ticamāka sievietēm (OR = 10,82, p = 0,042, CI 95% 0,632–185,1). Analizējot saistību ar bioķīmiskajiem rādītājiem, tika atrasta statistiski ticama asociācija ar rādītājiem, kas raksturo šūnu apoptozi (ar citohromu C) un fibrozi (ar hialuronskābi un morfoloģiskiem izmeklējumiem). Iegūtie rādītāji būtu jāvērtē piesardzīgi, jo abu mutāciju biežums ir < 0,05 un atrastā asociācija varētu būt ticama tikai dēļ mazā pacientu skaita (ko norāda arī plašais 95% ticamības intervāls), tomēr tie izskaidro viens otru, jo lielāks iekaisums un aknu fibroze ir saistāma ar sliktāku atbildi uz antivirālo terapiju [EASL, 2011; Bosma, 1995]. Asociācija ar alfa1–antitripsīna nepietiekamību un CVH klīnisko gaitu ir maz pētīta ir iegūti pretrunīgi rezultāti [Gharib, 2011; Settin, 2006].

*SERPINA1* gēna mutācijām varētu būt nozīme CVH patoģenēzē, jo ir pierādīta izmainīta alfa-1 antitripsīna sintēze HCV infekcijas gadījumā – tā ir samazināta, un tā nav saistīta ar biežākajām mutācijām – PIZ un PIS [Elzouki, 1997], tāpēc to būtu nepieciešams pētīt lielākā populācijā un arī iekļaujot antitripsīna līmeņa noteikšanu.

## SECINĀJUMI

- 1) Smagāku alkohola izraisītu aknu bojājumu raksturo protrombīna un citohroma C līmenis asinīs
- 2) Polimorfismi *NAT2* gēnā, *GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipi ietekmē akūta alkohola toksiska hepatīta gaitu, nosakot smagāku slimības norisi, savukārt, funkcionālie polimorfismi *ALDH2*, *UGT1A1*, *GSTA1*, *GSTP1* un *MTHFR* gēnos neietekmē slimības gaitu
- 3) Hroniska CVH gadījumā terapijas efektivitāti ietekmē pirms terapijas esošā aknu bojājuma pakāpe, jo tas ir mazāks (raksturo hialuronskābe, citokeratīns-18, GGT, leikocītu skaits un morfoloģiskās izmaiņas), jo lielākas izredzes sasniegt SVR
- 4) Ģenētiskajiem marķieriem ir nozīme CVH patoģenēzē un antivirālās terapijas efektivitātē:
  - hroniskas CVH attīstībai riska faktori ir *GSTM1* nenulles genotips, *GSTT1* nulles genotips un *CCR5* gēna del32 alēle
  - Sliktai antivirālās terapijas efektivitātei riska faktors ir *CCR5* gēna del32 alēle
  - Aknu bojājumu HCV gadījumā ietekmē *GSTM1* nulles genotips, *UGT1A1* un *SERPINA1* gēna alēles
  - *HFE*, *ATP7B* gēnu alēlēm netika pierādīta asociācija ar hroniska CVH gaitu.

## PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

### Publikācijas (zinātniskie raksti) par pētījuma tēmu:

1. **Piekuse L.**, Lace B., Kreile M., Sadovska L., Kempa I., Daneberga Z., Mičule I., Sondore V., Keiss J., Krumina A. Impact of the genes UGT1A1, GSTT1, GSTM1, GSTA1, GSTP1 and NAT2 on acute alcohol-toxic hepatitis. // Central European Journal of Biology, 2014, 9(2): 125–130. doi: 10.2478/s11535-013-0249-y .
2. **Piekuse L.**, Kreile M., Zarina A., Shteinberga Z., Sondore V., Keiss J., Lace B., Krumina A. Association of inherited liver disorders with chronic hepatitis C. // World Journal of Hepatology, 2014, 6(2): 92–97. doi: 10.4254/wjh.v6.i2.92.
3. Krumina A., Keiss J., Sondore V., Chernushenko A., Cernevska G., Zarina A., Micule I., **Piekuse L.**, Kreile M., Lace B., Krumina Z., Rozentale B. From clinical and biochemical to molecular genetic diagnosis of Wilson disease in Latvia. // Genetika, 2008, 44(10): 1379–1384.

### Tēzes zinātnisko konferenču materiālos:

1. **Piekuse L.**, Kreile M., Lace B., Keiss J., Sondore V., Krumina A. NAT2 gene polymorphism influence on clinical outcome in acute alcohol induced toxic hepatitis. Proceedings of the Golden Helix Symposium “Genomic Medicine: Translating genes into health” 2012: p23.
2. **Piekuse L.**, Keiss J., Sondore V., Micule I., Kreile M., Lace B., Krumina A. Gilbert syndrome molecular diagnostics and clinical characterization in Latvia. European Journal of Human Genetics, 2011, 19 (2) Suppl. 2: p334.
3. Kreile M., **Piekuse L.**, Krumina A., Keišs J., Sondore V. Hereditārās hemohromatozes mutāciju biežums C hepatīta slimniekiem Latvijā. RSU Zinātniskā conference, Tēžu grāmata 2011, lpp. 197.
4. Zarina A., **Piekuse L.**, Kreile M., Krumina A., Lace B., Keiss J., Sondore V., Cernevska G. Mutation spectrum of Wilson disease in Latvia. IV International congress of molecular medicine, Abstract book, 2011, p 115.
5. Krumina A., **Piekuse L.**, Kreile M., Keiss J.: Sondore V., Chernushenko A. Genetic variants associated with acute toxic hepatitis. The American Society of Human genetics 60<sup>th</sup> Meeting, Washington DC, USA, 2010. (Abstract no 922)

6. **Piekuse L.**, Keišs J., Sondore V., Kreile M., Lāce B., Krūmiņa A. Ksenobiotiķu atindēšanas enzīmu kodējošo gēnu polimorfismu raksturojums pacientiem ar akūtu toksisku hepatītu. RSU Zinātniskā konference, Tēzes, 2010, lpp. 89.
7. **Piekuse L.**, Kreile M., Zariņa A., Lāce B., Sondore V., Krumina A., Keiss J. Inherited liver disorder impact on CVH infection in Latvia. *European Journal of Human Genetics*, vol. 18., Suppl.1., 2010, p.265.
8. **Piekuse L.**, Lāce B., Keiss J., Kreile M., Micule I., Sondore V., Čerņevska G., Krumina A. Gilbert syndrome molecular diagnostics in Latvia 2001–2010. The 10<sup>th</sup> Baltic Congress in laboratory medicine, 2010, Abstract book., p. 34.
9. Zariņa A., Kreile M., **Piekuse L.**, Čerņevska G., Keišs J., Mičule I., Krūmiņa A. Vilsona slimības izraisošās mutācijas H1069Q biežums bērniem vecumā līdz 18 gadiem Latvijas populācijā. RSU Zinātniskā konference, Tēzes, 2010, lpp. 240.
10. Krumina A., **Piekuse L.**, Keiss J., Sondore V., Kreile M., Lāce B. Genetic determinants of susceptibility, viral clearance and persistence during hepatitis C virus infection. – 21<sup>st</sup> IUBMB and 12<sup>th</sup> FAOBMB International Congress of Biochemistry and molecular biology, Shanfhai, China, 2009, Abstract book, p, 162.
11. Krumina A., **Piekuse L.**, Kreile M., Keiss J., Sondore V., Zhilevica A. Genetic variants associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. *Genetics and genomics of infectious diseases*, Singapore, 2009, Abstract book, p16
12. **Piekuse L.**, Keiss J., Čerņušenko A., Lāce B. Clinical and molecular characterization of patients with acute toxic hepatitis. *European Conference of Human Genetics 2009, Abstracts*, p, 231.
13. Čerņušenko A., **Piekuse L.** Žilbēra sindroms Latvijā: Diagnoze un diferenciāldiagnoze. RSU Zinātniskās konferences tēzes, 2008, Rīga, lpp 93.
14. Keišs J., Sondore V., Lāce B., Mičule I., **Piekuse L.**, Kreile M., Zariņa A., Krūmiņa A. Aknu ģenētiskās patoloģijas DNS diagnostikas iespējas. RSU Zinātniskā konference, Tēzes, 2007, lpp. 119.
15. **Piekuse L.**, Kreile M., Lāce B., Keiss J., Sondore V., Krumina A. CC–chemokine receptor CCR5 and hereditary haemochromatosis mutations associations in viral hepatitis C patients in Latvia. *European Journal of Human Genetics*, 2007, Vol.15, suppl.1: p.287.

16. **Piekuse L.**, Mičule I., Lāce B., Keišs J., Sondore V., Krūmiņa A. Žilbēra sindroma diagnostika Latvijā. Zinātniskā konference, Tēzes, 2007, lpp. 127.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. // *J Hepatol*, 2011; 55(2): 245–264.
2. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. // *J Hepatol*, 2012; 57(2): 399–420.
3. Afdhal N. H. The natural history of hepatitis C. // *Semin Liver Dis*, 2004; 24 Suppl 2:3–8.
4. Agundez J. A., Golka K., Martinez C. et al. Unraveling ambiguous NAT2 genotyping data. // *Clin Chem*, 2008; 54(8): 1390–1394.
5. Agundez J. A., Ladero J. M., Olivera M. et al. N-acetyltransferase 2 polymorphism is not related to the risk of advanced alcoholic liver disease. // *Scand J Gastroenterol*, 2002; 37(1): 99–103.
6. Ahlenstiel G., Berg T., Woitas R. P. et al. Effects of the CCR5-Delta32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. // *J Hepatol*, 2003; 39(2): 245–252.
7. Ali-Osman F., Akande O., Antoun G. et al. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. // *J Biol Chem*, 1997; 272(15): 10004–10012.
8. Anand B. S., Currie S., Dieperink E. et al. Alcohol use and treatment of hepatitis C virus: results of a national multicenter study. // *Gastroenterology*, 2006; 130(6): 1607–1616.
9. Antaki N., Craxi A., Kamal S. et al. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. // *Liver Int*, 2010; 30(3): 342–355.
10. Arase Y., Kobayashi M., Suzuki F. et al. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. // *Hepatology*, 2013; 57(3): 964–973.
11. Avila R. E., Carmo R. A., Farah Kde P. et al. Hyaluronic acid in the evaluation of liver fibrosis in patients with hepatitis C on haemodialysis. // *Braz J Infect Dis*, 2010; 14(4): 335–341.
12. Bachrich T., Thalhammer T., Jager W. et al. Characterization of autoantibodies against uridine-diphosphate glucuronosyltransferase in patients with inflammatory liver diseases. // *Hepatology*, 2001; 33(5): 1053–1059.



13. Bedossa P. Liver biopsy. //Gastroenterol Clin Biol, 2008; 32(6 Suppl 1): 4–7.
14. Bleich S., Degner D., Sperling W. et al. Homocysteine as a neurotoxin in chronic alcoholism. // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2004; 28(3): 453–464.
15. Blum M., Grant D. M., McBride W. et al. Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. // DNA Cell Biol, 1990; 9(3): 193–203.
16. Bolt H. M., Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. // Curr Drug Metab, 2006; 7(6): 613–628.
17. Borgia G., Gentile I., Fortunato G. et al. Homocysteine levels and sustained virological response to pegylated-interferon alpha2b plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C: a prospective study. // Liver Int, 2009; 29(2): 248–252.
18. Bosma P. J., Chowdhury J. R., Bakker C. et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. // N Engl J Med, 1995; 333(18): 1171–1175.
19. Bredschneider M., Klein K., Murdter T. E. et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase A1, the major glutathione S-transferase in human liver: consequences for enzyme expression and busulfan conjugation. // Clin Pharmacol Ther, 2002; 71(6): 479–487.
20. Bressler B. L., Guindi M., Tomlinson G., Heathcote J. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. // Hepatology, 2003; 38(3): 639–644.
21. Cardoso E. M., Duarte M. A., Ribeiro E. et al. A study of some hepatic immunological markers, iron load and virus genotype in chronic hepatitis C. // J Hepatol, 2004; 41(2): 319–326.
22. Chae H. B., Park S. M., Youn S. J. Direct-acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis C: open issues and future perspectives. // Scientific World Journal, 2013; 2013: 704912.
23. Chao Y. C., Liou S. R., Chung Y. Y. et al. Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes and alcoholic cirrhosis in Chinese patients. // Hepatology, 1994; 19(2): 360–366.

24. Chappell S., Hadzic N., Stockley R. et al. A polymorphism of the alpha1-antitrypsin gene represents a risk factor for liver disease. // *Hepatology*, 2008; 47(1): 127–132.
25. Chen Y., Xu H. X., Wang L. J. et al. Meta-analysis: IL28B polymorphisms predict sustained viral response in HCV patients treated with pegylated interferon-alpha and ribavirin. // *Aliment Pharmacol Ther*, 2012; 36(2): 91–103.
26. Chou R., Hartung D., Rahman B. et al. Comparative effectiveness of antiviral treatment for hepatitis C virus infection in adults: a systematic review. // *Ann Intern Med*, 2013; 158(2): 114–123.
27. Coelho-Borges S., Cheinquer H., Wolff F. H. et al. Effect of HFE gene polymorphism on sustained virological response in patients with chronic hepatitis C and elevated serum ferritin. // *Arq Gastroenterol*, 2012; 49(1): 9–13.
28. Coles B. F., Morel F., Rauch C. et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. // *Pharmacogenetics*, 2001; 11(8): 663–669.
29. Costa J. M., Telehin D., Munteanu M. et al. HCV-GenoFibrotest: a combination of viral, liver and genomic (IL28b, ITPA, UGT1A1) biomarkers for predicting treatment response in patients with chronic hepatitis C. // *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011; 35(3): 204–213.
30. Cotton S. C., Sharp L., Little J., Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. // *Am J Epidemiol*, 2000; 151(1): 7–32.
31. Crabb D. W., Edenberg H. J., Bosron W. F., Li T. K. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant. // *J Clin Invest*, 1989; 83(1): 314–316.
32. Crabb D.W., Pinairs J., Hasanadka R. et al. . Alcohol and retinoids. // *Alcohol Clin Exp Res*, 2001; 25(5 Suppl ISBRA):207S–217S.
33. Curiel D. T., Chytil A., Courtney M., Crystal R. G. Serum alpha 1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu264-Val) mutation results from intracellular degradation of alpha 1-antitrypsin prior to secretion. // *J Biol Chem*, 1989; 264(18): 10477–10486.

34. Datta S., Chowdhury A., Ghosh M. et al. A genome-wide search for non-UGT1A1 markers associated with unconjugated bilirubin level reveals significant association with a polymorphic marker near a gene of the nucleoporin family. // *Ann Hum Genet*, 2012; 76(1): 33–41.
35. Desai T. K., Jamil L. H., Balasubramaniam M. et al. Phlebotomy improves therapeutic response to interferon in patients with chronic hepatitis C: a meta-analysis of six prospective randomized controlled trials. // *Dig Dis Sci*, 2008; 53(3): 815–822.
36. Deterding K., Grungreiff K., Lankisch T. O. et al. Gilbert's syndrome and antiviral therapy of hepatitis C. // *Ann Hepatol*, 2009; 8(3): 246–250.
37. Drakesmith H., Prentice A. Viral infection and iron metabolism. // *Nat Rev Microbiol*, 2008; 6(7):541–552.
38. Druesne-Pecollo N., Tehard B., Mallet Y. et al. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. // *Lancet Oncol*, 2009; 10(2): 173–180.
39. Edenberg H. J. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. // *Alcohol Res Health*, 2007; 30(1): 5–13.
40. Eglite J. HLA II klases DRB1, DQA1, DQB1 ģenētisko marķieru izpēte ar HIV inficētiem un AIDS pacientiem. Promocijas darbs. Rīga. 2011.
41. Elzouki A. N., Verbaan H., Lindgren S. et al. Serine protease inhibitors in patients with chronic viral hepatitis. // *J Hepatol*, 1997; 27(1): 42–48.
42. Esteban J. I., Sauleda S., Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. // *J Hepatol*, 2008; 48(1): 148–162.
43. *Feder J. N., Penny D. M., Irrinki A. et al.* The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(4): 1472–1477.
44. Franchini M., Targher G., Capra F. et al. The effect of iron depletion on chronic hepatitis C virus infection. // *Hepatol Int*, 2008; 2(3): 335–340.
45. Frosst P., Blom H. J., Milos R. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. // *Nat Genet*, 1995; 10(1): 111–113.

46. Garcia-Closas M., Hein D. W., Silverman D. et al. A single nucleotide polymorphism tags variation in the arylamine N-acetyltransferase 2 phenotype in populations of European background. // *Pharmacogenet Genomics*, 2011; 21(4): 231–236.
47. Garcia-Falcon M. S., Simal-Gandara J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from different woods and their transfer during traditional smoking into chorizo sausages with collagen and tripe casings. // *Food Addit Contam*, 2005; 22(1): 1–8.
48. Gelatti U., Covolo L., Talamini R. et al. N-Acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, cigarette smoking and hepatocellular carcinoma: a case-control study. // *Int J Cancer*, 2005; 115(2): 301–306.
49. Ghany M. G., Nelson D. R., Strader D. B. et al. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. // *Hepatology*, 2011; 54(4): 1433–1444.
50. Gharib A. F., Karam R. A., Pasha H. F. et al. Polymorphisms of hemochromatosis, and alpha-1 antitrypsin genes in Egyptian HCV patients with and without hepatocellular carcinoma. // *Gene*, 2011; 489(2): 98–102.
51. Glas J., Torok H. P., Simperl C. et al. The Delta 32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene neither is correlated with chronic hepatitis C nor does it predict response to therapy with interferon-alpha and ribavirin. // *Clin Immunol*, 2003; 108(1): 46–50.
52. Guo C. H., Chen P. C., Ko W. S. Status of essential trace minerals and oxidative stress in viral hepatitis C patients with nonalcoholic fatty liver disease. // *Int J Med Sci*, 2013; 10(6): 730–737.
53. Handler J. A., Thurman R. G. Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. // *J Biol Chem*, 1990; 265(3): 1510–1515.
54. Harries L. W., Stubbins M. J., Forman D. et al. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. // *Carcinogenesis*, 1997; 18(4): 641–644.

55. Harris E. D. Cellular copper transport and metabolism. // *Annu Rev Nutr*, 2000; 20: 291–310.
56. Harrison D. J., May L., Hayes P. C. et al. Glutathione S–transferases in alcoholic liver disease. // *Gut*, 1990; 31(8): 909–912.
57. Haseba T., Ohno Y. A new view of alcohol metabolism and alcoholism—role of the high–Km Class III alcohol dehydrogenase (ADH3). // *Int J Environ Res Public Health*, 2010; 7(3): 1076–1092.
58. Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases. // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005; 45: 51–88.
59. Hein D. W. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. // *Mutat Res*, 2002; 506–507: 65–77.
60. Howie A. F., Hayes P. C., Bouchier I. A. et al. Glutathione S–transferase in human bile. // *Clin Chim Acta*, 1989; 184(3): 269–278.
61. Vīkna L., Rozentāle B., Ķūse V, u.c. Valsts Zāļu aģentūra: C Vīrushepatīta racionālas farmakoterapijas rekomendācijas zāļu iegādes kompensācijas sistēmas ietvaros. // <http://www.vmnvd.gov.lv/lv/kompensejamie-medikamenti/racionalas-farmakoterapijas-rekomendacijas> (2005).
62. Hu X., O'Donnell R., Srivastava S. K. et al. Active site architecture of polymorphic forms of human glutathione S–transferase P1–1 accounts for their enantioselectivity and disparate activity in the glutathione conjugation of 7beta,8alpha–dihydroxy–9alpha,10alpha–oxy–7,8,9,10–tetrahydrobenzo(a)pyrene. // *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 235(2): 424–428.
63. Hurst R., Bao Y., Jemth P. et al. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. // *Biochem J*, 1998; 332 (Pt 1): 97–100.
64. Ishak K. G., Zimmerman H. J., Ray M. B. Alcoholic liver disease: pathologic, pathogenetic and clinical aspects. // *Alcohol Clin Exp Res*, 1991; 15(1): 45–66.
65. Israel Y., Hurwitz E., Niemela O., Arnon R. Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde–containing epitopes in acetaldehyde–protein adducts. // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83(20): 7923–7927.

66. Jansons J. S. G., Sominskaya I., Pumpens P. Hepatitis C virus molecular epidemiology in Latvia. // *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 2004; 676: 65–70.
67. Jelski W., Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. // *Clin Chim Acta*, 2008; 395(1–2): 1–5.
68. Jēruma A. Hronisks vīrushepatīts C: bioķīmiskie un imūnģenētiskie diagnostiskie marķieri etioloģiskās terapijas efektivitātes prognozēšanai. // Promocijas darbs, Rīga, 2012.
69. Ji C., Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. // *Gastroenterology*, 2003; 124(5): 1488–1499.
70. Jia Z., Ding Y., Tian S. et al. Test of IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients treated with PegIFN and ribavirin depends on HCV genotypes: results from a meta-analysis. // *PLoS One*, 2012; 7(9): e45698.
71. Jimenez-Sousa M. A., Fernandez-Rodriguez A., Guzman-Fulgencio M. et al. Meta-analysis: implications of interleukin-28B polymorphisms in spontaneous and treatment-related clearance for patients with hepatitis C. // *BMC Med*, 2013; 11: 6.
72. Johansson A. S., Stenberg G., Widersten M., Mannervik B. Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. // *J Mol Biol*, 1998; 278(3): 687–698.
73. Josephy P. D. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. // *Hum Genomics Proteomics*, 2010; 2010: 876940.
74. Kardon T., Coffey M. J., Banhegyi G. et al. Transcriptional induction of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase by ethanol in rat liver. // *Alcohol*, 2000; 21(3): 251–257.
75. Katsounas A., Trippler M., Kottlil S. et al. Cytokine/chemokine patterns connect host and viral characteristics with clinics during chronic hepatitis C. // *Eur J Med Res*, 2012; 17: 9.

76. Keiding S., Badsberg J. H., Becker U. et al. The prognosis of patients with alcoholic liver disease. An international randomized, placebo-controlled trial on the effect of malotilate on survival. // *J Hepatol*, 1994; 20(4): 454–460.
77. Kidd V. J., Wallace R. B., Itakura K., Woo S. L. alpha 1-antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. // *Nature*, 1983; 304(5923): 230–234.
78. Kim D. H. The interactive effect of methyl-group diet and polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase on the risk of colorectal cancer. // *Mutat Res*, 2007; 622(1–2): 14–18.
79. Kiran M., Chawla Y. K., Kaur J. Glutathione-S-transferase and microsomal epoxide hydrolase polymorphism and viral-related hepatocellular carcinoma risk in India. // *DNA Cell Biol*, 2008; 27(12): 687–694.
80. Knapp S., Warshaw U., Ho K. M. et al. A polymorphism in IL28B distinguishes exposed, uninfected individuals from spontaneous resolvers of HCV infection. // *Gastroenterology*, 2011; 141(1): 320–325, 325 e321–322.
81. Knodell R. G., Ishak K. G., Black W. C. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. // *Hepatology*, 1981; 1(5): 431–435.
82. Ko W. S., Guo C. H., Yeh M. S. et al. Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. // *World J Gastroenterol*, 2005; 11(30): 4697–4702.
83. Kohen R., Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. // *Toxicol Pathol*, 2002; 30(6): 620–650.
84. Koike K., Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. // *Hepatol Res*, 2006; 34(2): 65–73.
85. Kondo S., Sturgis E.M., Li F. et al. GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and risk of salivary gland carcinoma. // *Int J Clin Exp Med*, 2009; 2(1):68–75.
86. Kucinskas L., Juzenas S., Sventoraityte J. et al. Prevalence of C282Y, H63D, and S65C mutations in hereditary HFE-hemochromatosis gene in Lithuanian population. // *Ann Hematol*, 2012; 91(4): 491–495.

87. Kuniholm M. H., Anastos K., Kovacs A. et al. Relation of HLA class I and II supertypes with spontaneous clearance of hepatitis C virus. // *Genes Immun*, 2013; 14(5): 330–335.
88. Kurbanov F., Tanaka Y., Sugauchi F. et al. Hepatitis C virus molecular epidemiology in Uzbekistan. // *J Med Virol*, 2003; 69(3): 367–375.
89. Lacey B., Sveger T., Krams A. et al. Age of SERPINA1 gene PI Z mutation: Swedish and Latvian population analysis. // *Ann Hum Genet*, 2008; 72(Pt 3): 300–304.
90. Lange C. M., Kutalik Z., Morikawa K. et al. Serum ferritin levels are associated with a distinct phenotype of chronic hepatitis C poorly responding to pegylated interferon–alpha and ribavirin therapy. // *Hepatology*, 2012; 55(4): 1038–1047.
91. Lebray P., Zylberberg H., Hue S. et al. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. // *J Viral Hepat*, 2004; 11(2): 175–182.
92. Lee S. L., Chau G. Y., Yao C. T. et al. Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first–pass metabolism. // *Alcohol Clin Exp Res*, 2006; 30(7): 1132–1142.
93. Leff M. A., Fretland A. J., Doll M. A., Hein D. W. Novel human N–acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype. // *J Biol Chem*, 1999; 274(49): 34519–34522.
94. Li S. H., Zhao H., Ren Y. Y. et al. The H63D mutation of the hemochromatosis gene is associated with sustained virological response in chronic hepatitis C patients treated with interferon–based therapy: a meta–analysis. // *Tohoku J Exp Med*, 2012; 226(4): 293–299.
95. Lieber C. S. Ethnic and gender differences in ethanol metabolism. // *Alcohol Clin Exp Res*, 2000; 24(4): 417–418.
96. Liggi M., Sini M., Sorbello O. et al. HBV and HCV infections in Wilson's disease patients: copper overload could be protective? // *Clin Biochem*, 2012; 45(13–14): 1095–1096.
97. Lin J. P., O'Donnell C. J., Schwaiger J. P. et al. Association between the UGT1A1\*28 allele, bilirubin levels, and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. // *Circulation*, 2006; 114(14): 1476–1481.



98. Lin R. C., Lumeng L., Shahidi S. et al. Protein–acetaldehyde adducts in serum of alcoholic patients. // *Alcohol Clin Exp Res*, 1990; 14(3): 438–443.
99. Lisman T., Porte R.J. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. // *Blood*, 2010; 116(6):878–885.
100. Lucena M.I., Andrade R.J., Martinez C. et al. Glutathione S–transferase m1 and t1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug–induced liver injury. // *Hepatology*, 2008; 48(2):588–596.
101. Lvov D. K., Samokhvalov E. I., Tsuda F. et al. Prevalence of hepatitis C virus and distribution of its genotypes in Northern Eurasia. // *Arch Virol*, 1996; 141(9):1613–1622.
102. Manns M . P., Wedemeyer H., Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. // *Gut*, 2006; 55(9): 1350–1359.
103. Marchand L. L., Wilkinson G. R., Wilkens L. R. Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999; 8(6): 495–500.
104. Marcos M., Pastor I., Chamorro A. J. et al. Meta–analysis: glutathione–S–transferase allelic variants are associated with alcoholic liver disease. // *Aliment Pharmacol Ther*, 2011; 34(10): 1159–1172.
105. Marikovsky M., Nevo N., Vadai E., Harris–Cerruti C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. // *Int J Cancer*, 2002; 97(1): 34–41.
106. Marques S. C., Ikediobi O. N. The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic testing: gene–environment interactions. // *Hum Genomics*, 2010; 4(4): 238–249.
107. Martinez C., Garcia–Martin E., Ladero J. M. et al. GSTT1 and GSTM1 null genotypes may facilitate hepatitis C virus infection becoming chronic. // *J Infect Dis*, 2007; 195(9): 1320–1323.
108. Massard J., Ratziu V., Thabut D. et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. // *J Hepatol*, 2006; 44(1 Suppl): S19–24.
109. Mathurin P., Abdelnour M., Ramond M. J. et al. Early change in bilirubin levels is an important prognostic factor in severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. // *Hepatology*, 2003a; 38(6): 1363–1369.
110. Mathurin P., Lucey M. R. Management of alcoholic hepatitis. // *J Hepatol*, 2012; 56 Suppl 1: S39–45.

111. Mathurin P., Raynard B., Dharancy S. et al. Meta-analysis: evaluation of adjuvant therapy after curative liver resection for hepatocellular carcinoma. // *Aliment Pharmacol Ther*, 2003b; 17(10): 1247–1261.
112. McHutchison J .G., Blatt L. M., de Medina M. et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. // *J Gastroenterol Hepatol*, 2000; 15(8): 945–951.
113. Mitsuyoshi H., Yasui K., Yamaguchi K. et al. Pathogenic Role of Iron Deposition in Reticuloendothelial Cells during the Development of Chronic Hepatitis C. // *Int J Hepatol*, 2013; 2013: 686420.
114. Morgan T. R., Ghany M. G., Kim H. Y. et al. Outcome of sustained virological responders with histologically advanced chronic hepatitis C. // *Hepatology*, 2010; 52(3): 833–844.
115. Mulder T. P., Court D. A., Peters W. H. Variability of glutathione S-transferase alpha in human liver and plasma. // *Clin Chem*, 1999; 45(3): 355–359.
116. Mura C., Nousbaum J. B., Verger P. et al. Phenotype-genotype correlation in haemochromatosis subjects. // *Hum Genet*, 1997; 101(3): 271–276.
117. Muslu N., Dogruer Z. N., Eskandari G. et al. Are glutathione S-transferase gene polymorphisms linked to neonatal jaundice? // *Eur J Pediatr*, 2008; 167(1): 57–61.
118. Nagata N., Hiyoshi M., Shiozawa H. et al. Assessment of a difference in ALDH2 heterozygotes and alcoholic liver injury. // *Alcohol Clin Exp Res*, 2002; 26(8 Suppl): 11S–14S.
119. Nagy L. E. Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury. // *Annu Rev Nutr*, 2004; 24: 55–78.
120. Nakano T., Lau G. M., Sugiyama M., Mizokami M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. // *Liver Int*, 2012; 32(2): 339–345.
121. Niemela O., Parkkila S. Alcoholic macrocytosis—is there a role for acetaldehyde and adducts? // *Addict Biol*, 2004; 9(1): 3–10.
122. Nocente R., Ceccanti M., Bertazzoni G. et al. HCV infection and extrahepatic manifestations. // *Hepatogastroenterology*, 2003; 50(52): 1149–1154.

123. Nolan R. J., Rick D. L., Landry T. D. et al. Pharmacokinetics of inhaled methyl chloride (CH<sub>3</sub>Cl) in male volunteers. // *Fundam Appl Toxicol*, 1985; 5(2): 361–369.
124. O'Connor S., Morzorati S., Christian J., Li T. K. Clamping breath alcohol concentration reduces experimental variance: application to the study of acute tolerance to alcohol and alcohol elimination rate. // *Alcohol Clin Exp Res*, 1998; 22(1): 202–210.
125. Omiecinski C. J., Vanden Heuvel J. P., Perdew G. H., Peters J. M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. // *Toxicol Sci*, 2011; 120 Suppl 1: S49–75.
126. Ostapenko Y. N., Brusin K. M., Zobnin Y. V. et al. Acute cholestatic liver injury caused by polyhexamethyleneguanidine hydrochloride admixed to ethyl alcohol. // *Clin Toxicol (Phila)*, 2011; 49(6): 471–477.
127. Papatheodoridis G. V., Hadziyannis E., Tsochatzis E. et al. Serum apoptotic caspase activity in chronic hepatitis C and nonalcoholic Fatty liver disease. // *J Clin Gastroenterol*, 2010; 44(4): e87–95.
128. Parfieniuk–Kowerda A., Lapinski T. W., Rogalska–Plonska M. et al. Serum cytochrome c and m30–neoepitope of cytokeratin–18 in chronic hepatitis C. // *Liver Int*, 2013.
129. Parl F. F. Glutathione S–transferase genotypes and cancer risk. // *Cancer Lett*, 2005; 221(2): 123–129.
130. Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R. et al. Human glutathione S–transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. // *Biochem J*, 1994; 300 ( Pt 1): 271–276.
131. Perrillo R. P., Griffin R., DeSchryver–Keckskemeti K. et al. Alcoholic liver disease presenting with marked elevation of serum alkaline phosphatase. A combined clinical and pathological study. // *Am J Dig Dis*, 1978; 23(12): 1061–1066.
132. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis—a new look at an old disease. // *N Engl J Med*, 2004; 350(23): 2383–2397.

133. Ping J., Wang H., Huang M., Liu Z. S. Genetic analysis of glutathione S-transferase A1 polymorphism in the Chinese population and the influence of genotype on enzymatic properties. // *Toxicol Sci*, 2006; 89(2): 438–443.
134. Pool-Zobel B., Veeriah S., Bohmer F. D. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens — focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. // *Mutat Res*, 2005; 591(1–2): 74–92.
135. Poynard T., Imbert-Bismut F., Munteanu M. et al. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. // *Comp Hepatol*, 2004; 3(1): 8.
136. Poynard T., Mathurin P., Lai C. L. et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. // *J Hepatol*, 2003a; 38(3): 257–265.
137. Poynard T., Yuen M. F., Ratziu V., Lai C. L. Viral hepatitis C. // *Lancet*, 2003b; 362(9401): 2095–2100.
138. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. // *Am J Hum Genet*, 2007; 81(3): 559–575.
139. Qu Q., Shore R., Li G. et al. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. // *Chem Biol Interact*, 2005; 153–154: 85–95.
140. Rashed M. N. The role of trace elements on hepatitis virus infections: a review. // *J Trace Elem Med Biol*, 2011; 25(3): 181–187.
141. Rehm J., Kanteres F., Lachenmeier D. W. Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences. // *Drug Alcohol Rev*, 2010; 29(4): 426–436.
142. Rieger S., Riemer H., Mannhalter C. Multiplex PCR assay for the detection of genetic variants of alpha1-antitrypsin. // *Clin Chem*, 1999; 45(5): 688–690.
143. Robert A., Chazouilleres O. Prothrombin time in liver failure: time, ratio, activity percentage, or international normalized ratio? // *Hepatology*, 1996; 24(6): 1392–1394.
144. Rodrigo L., Alvarez V., Rodriguez M. et al. N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1, alcohol dehydrogenase, and cytochrome P450IIE1 genotypes

- in alcoholic liver cirrhosis: a case–control study. // *Scand J Gastroenterol*, 1999; 34(3): 303–307.
145. Romero–Gomez M., Del Mar Vilorio M., Andrade R. J. et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. // *Gastroenterology*, 2005; 128(3): 636–641.
146. Safarinejad M. R., Shafiei N., Safarinejad S. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T, A1298C and G1793A polymorphisms: association with risk for clear cell renal cell carcinoma and tumour behaviour in men. // *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2012; 24(4): 269–281.
147. Sambrook J., Russell D. W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. // *CSH Protoc*, 2006; 2006(1).
148. Samson M., Libert F., Doranz B. J. et al. Resistance to HIV–1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR–5 chemokine receptor gene. // *Nature*, 1996; 382(6593): 722–725.
149. Santantonio T., Wiegand J., Gerlach J. T. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. // *J Hepatol*, 2008; 49(4): 625–633.
150. Sartori M., Andorno S., Rigamonti C., Boldorini R. Chronic hepatitis C treated with phlebotomy alone: biochemical and histological outcome. // *Dig Liver Dis*, 2001; 33(2): 157–162.
151. Schinoni M. I., Parana R., Cavalcante D. Apoptosis and progression of hepatic fibrosis in hepatitis C patients. // *Braz J Infect Dis*, 2006; 10(2): 117–121.
152. Seidegard J., Vorachek W. R., Pero R. W., Pearson W. R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans–stilbene oxide are due to a gene deletion. // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85(19): 7293–7297.
153. Seitz H. K., Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol–mediated carcinogenesis. // *Nat Rev Cancer*, 2007; 7(8): 599–612.
154. Settin A., El–Bendary M., Abo–Al–Kassem R., El Baz R. Molecular analysis of A1AT (S and Z) and HFE (C282Y and H63D) gene mutations in Egyptian cases with HCV liver cirrhosis. // *J Gastrointest Liver Dis*, 2006; 15(2): 131–135.
155. Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Dowd C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non–

- mammalian members of an ancient enzyme superfamily. // *Biochem J*, 2001; 360(Pt 1): 1–16.
156. Sim E., Lack N., Wang C.J. et al. Arylamine N–acetyltransferases: structural and functional implications of polymorphisms. // *Toxicology*, 2008; 254(3): 170–183.
157. Simanis R., Lejniece S., Sochnevs A. et al. Natural clearance of hepatitis C virus in hemophilia patients. // *Medicina (Kaunas)*, 2008; 44(1): 15–21.
158. Simmonds P., Bukh J., Combet C. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. // *Hepatology*, 2005; 42(4): 962–973.
159. Stewart S., Jones D., Day C. P. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. // *Trends Mol Med*, 2001; 7(9): 408–413.
160. Stickel F., Hampe J. Genetic determinants of alcoholic liver disease. // *Gut*, 2012; 61(1): 150–159.
161. Stickel F., Österreicher C. H. The role of genetic polymorphisms in alcoholic liver disease. // *Alcohol and Alcoholism*, 2006; 41(3): 209–224.
162. Stickel F., Osterreicher C. H., Datz C. et al. Prediction of progression to cirrhosis by a glutathione S–transferase P1 polymorphism in subjects with hereditary hemochromatosis. // *Arch Intern Med*, 2005; 165(16): 1835–1840.
163. Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A. F. et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. // *Science*, 1987; 235(4792): 1043–1046.
164. Streiff M. B., Mehta S., Thomas D. L. Peripheral blood count abnormalities among patients with hepatitis C in the United States. // *Hepatology*, 2002; 35(4): 947–952.
165. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M. et al. Genome–wide association of IL28B with response to pegylated interferon–alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. // *Nat Genet*, 2009; 41(10): 1105–1109.
166. Thomas D. L., Thio C. L., Martin M. P. et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. // *Nature*, 2009; 461(7265): 798–801.

167. Thomas G. R., Forbes J. R., Roberts E. A. et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. // *Nat Genet*, 1995; 9(2): 210–217.
168. Thompson Coon J., Rogers G., Hewson P. et al. Surveillance of cirrhosis for hepatocellular carcinoma: systematic review and economic analysis. // *Health Technol Assess*, 2007; 11(34): 1–206.
169. Tolmane I. Hroniska C vīrushepatīta ārstēšanas rezultātu ietekmējošo faktoru izpēte. // Promocijas darbs, Rīga, 2012a.
170. Tolmane I., Rozentale B., Keiss J. et al. The prevalence of viral hepatitis C in Latvia: a population-based study. // *Medicina (Kaunas)*, 2011; 47(10):532–535.
171. Tolmane I., Rozentale B., Keiss J. et al. Interleukin 28B Gene Polymorphism and Association with Chronic Hepatitis C Therapy Results in Latvia. // *Hepat Res Treat*, 2012b; 2012: 324090.
172. Tommasi A. M., Fabris P., Carderi I. et al. Lack of higher frequency of the chemokine receptor 5–delta32/delta32 genotype in hepatitis C. // *J Clin Gastroenterol*, 2006; 40(5): 440–443.
173. Topic A., Djukic M. Diagnostic characteristics and application of alcohol biomarkers. // *Clin Lab*, 2013; 59(3–4): 233–245.
174. Topic A., Ljubic M., Radojkovic D. Alpha–1–antitrypsin in pathogenesis of hepatocellular carcinoma. // *Hepat Mon*, 2012; 12(10 HCC): e7042.
175. Tsukamoto H., Xi X. P. Incomplete compensation of enhanced hepatic oxygen consumption in rats with alcoholic centrilobular liver necrosis. // *Hepatology*, 1989; 9(2): 302–306.
176. Tuma D. J., Casey C. A. Dangerous byproducts of alcohol breakdown—focus on adducts. // *Alcohol Res Health*, 2003; 27(4): 285–290.
177. Urbanek P., Lenicek M., Muchova L. et al. No association of promoter variations of HMOX1 and UGT1A1 genes with liver injury in chronic hepatitis C. // *Ann Hepatol*, 2011; 10(4): 445–451.
178. Van Poucke C., Detavernier C., Van Bocxlaer J. F. et al. Monitoring the benzene contents in soft drinks using headspace gas chromatography–mass spectrometry: a survey of the situation on the belgian market. // *J Agric Food Chem*, 2008; 56(12): 4504–4510.

179. Vīksna L., Keišs J., Sočņevs A. et al. Novel Laboratory Tests in Assessment of Liver Function in Acute and Chronic Liver Diseases. //Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural, Exact, and Applied Sciences, 2009; 63(4): 228–233.
180. Wakabayashi I., Groschner K. Modification of the association between alcohol drinking and non-HDL cholesterol by gender. // Clin Chim Acta, 2009; 404(2): 154–159.
181. Wang R. S., Nakajima T., Kawamoto T., Honma T. Effects of aldehyde dehydrogenase-2 genetic polymorphisms on metabolism of structurally different aldehydes in human liver. // Drug Metab Dispos, 2002; 30(1): 69–73.
182. Wang Y., Hodgkinson V., Zhu S. et al. Advances in the understanding of mammalian copper transporters. // Adv Nutr, 2011; 2(2): 129–137.
183. Werner J., Saghir M., Warshaw A. L. et al. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002; 283(1): G65–73.
184. Whalen R., Boyer T. D. Human glutathione S-transferases. // Semin Liver Dis, 1998; 18(4): 345–358.
185. White D. L., Ratziu V., El-Serag H. B. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. // J Hepatol, 2008; 49(5): 831–844.
186. Whitfield J. B., Zhu G., Heath A. C. et al. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. // Alcohol Clin Exp Res, 2001; 25(7): 1037–1045.
187. Wiegand J., Deterding K., Cornberg M., Wedemeyer H. Treatment of acute hepatitis C: the success of monotherapy with (pegylated) interferon alpha. // J Antimicrob Chemother, 2008; 62(5): 860–865.
188. Woitas R. P., Ahlenstiel G., Iwan A. et al. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. // Gastroenterology, 2002; 122(7): 1721–1728.
189. Worrall S., De Jersey J., Shanley B. C., Wilce P. A. Antibodies against acetaldehyde-modified epitopes: presence in alcoholic, non-alcoholic liver disease and control subjects. // Alcohol Alcohol, 1990; 25(5): 509–517.



190. Worrall S., Thiele G. M. Protein modification in ethanol toxicity. // *Adverse Drug React Toxicol Rev*, 2001; 20(3): 133–159.
191. Wu D., Cederbaum A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. // *Alcohol Res Health*, 2003; 27(4): 277–284.
192. Yao P., Hao L., Nussler N. et al. The protective role of HO–1 and its generated products (CO, bilirubin, and Fe) in ethanol–induced human hepatocyte damage. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009; 296(6): G1318–1323.
193. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? // *Alcohol Res Health*, 2006; 29(4): 245–254.
194. Zein N. N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. // *Clin Microbiol Rev*, 2000; 13(2): 223–235.
195. Zeremski M., Hooker G., Shu M. A. et al. Induction of CXCR3– and CCR5– associated chemokines during acute hepatitis C virus infection. // *J Hepatol*, 2011; 55(3): 545–553.
196. Zeremski M., Petrovic L. M., Talal A. H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. // *J Viral Hepat*, 2007; 14(10): 675–687.
197. Zeuzem S., Feinman S. V., Rasenack J. et al. Peginterferon alfa–2a in patients with chronic hepatitis C. // *N Engl J Med*, 2000; 343(23): 1666–1672.

Ētikas atļauja

## Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011 • Tālr. 67876182 • Fakss 67876071 • E-pasts: [vm@vm.gov.lv](mailto:vm@vm.gov.lv)

Rīgā

29.07.2011. Nr.01-29.1/18

Rīgas Stradiņa universitātes  
Molekulārās ģenētikas zinātniskajai  
laboratorijai

*Atzinums Nr.01-29.1/18 par pieteikuma  
projektu „Ksenobiotiķu metabolisma gēnu  
polimorfie varianti Latvijas populācijā  
un to saistība ar patoloģiju”*

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2011.gada 29.jūlijā izskatīja Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas iesniegto pieteikuma projektu „Ksenobiotiķu metabolisma gēnu polimorfie varianti Latvijas populācijā un to saistība ar patoloģiju”.

Pamatojoties uz Centrālā medicīnas ētikas komitejas 2011. gada 29.jūlija protokola Nr.3 punktu 2, tiek izsniegts atzinums, ka Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas iesniegtais pieteikuma projekts „Ksenobiotiķu metabolisma gēnu polimorfie varianti Latvijas populācijā un to saistība ar patoloģiju” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas  
komitejas priekšsēdētājs



J.Bundulis

# Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Rīgā, Baznīcas ielā 25, LV1010

tel. 7043721

fax7043751

28.05.2003 A-10

## Lēmums Nr.10

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2003. gada 28. maijā izskatīja Rīgas Stradiņa Universitātes Medicīnas bioloģijas un ģenētikas katedras Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas pieteikuma projektu "Monogēno patoloģiju: Cistiskās fibrozes, hereditārās hemohromatozes, neirosensorās vājdzirdības, Žilbēra sindroma un alfa 1-antitripsīna nepietiekamības – mutāciju un polimorfo rajonu DNS diagnostiku ieviešana Latvijā".

Pamatojoties uz Centrālā medicīnas ētikas komitejas 2003. gada 28. maija sēdes protokola Nr. 3 punktu 2, tiek izsniegts atzinums, ka Rīgas Stradiņa Universitātes Medicīnas bioloģijas un ģenētikas katedras Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas pieteikuma projekts "Monogēno patoloģiju: Cistiskās fibrozes, hereditārās hemohromatozes, neirosensorās vājdzirdības, Žilbēra sindroma un alfa 1-antitripsīna nepietiekamības – mutāciju un polimorfo rajonu DNS diagnostiku ieviešana Latvijā" atbilst bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas komitejas priekšsēdētājs

U.Likops

**Alēļu kombināciju analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā  
salīdzinājumā ar kontroles grupu**

Analizēto gēnu (marķieru) secība kombinācijā	Alēļu kombinācija	Biežums kontroles grupa	Biežums pacientu grupā	CHISQ	P
<i>NAT2(A590G)/</i>	TACT1M1TA1	0,030	0,013	0,834	0,361
<i>NAT2(C481T)/ MTHFR/</i>	TACT1M1TG1	0,011	0,027	0,703	0,402
<i>GSTT1/ GSTM1/ GSTA1/</i>	CGCT1M0TG1	0,048	0,027	0,801	0,371
<i>GSTP1/ UGT1A1</i>	CGCT1M0CA2	0,069	0,044	0,678	0,410
	TACT1M0TA2	0,044	0,015	1,918	0,166
	TACT1M0CA2	0,013	0,017	0,042	0,837
	CGTT1M0TA1	0,073	0,023	3,552	0,059
	CGTT1M0TA2	0,029	0,022	0,116	0,734
	CGTT1M1TA1	0,022	0,015	0,171	0,679
	CGTT1M1TG1	0,015	0,016	0,005	0,942
	CGTT1M1CA1	0,015	0,041	1,261	0,261
	TGCT1M1CA2	0,041	0,025	0,434	0,510
	CGCT1M1CA1	0,008	0,033	1,579	0,209
	TGCT1M1CA1	0,003	0,028	1,849	0,174
	TGTT1M1CA1	0,022	0,025	0,020	0,887
	CGCT0M1TA2	0,022	0,027	0,050	0,824
	TGCT1M0CA2	0,011	0,042	1,858	0,173
	CGCT1M0CG1	0,026	0,047	0,681	0,409
	CGTT1M0CA1	0,064	0,024	2,419	0,120
	CGTT1M0CG2	0,011	0,037	1,428	0,232
	TACT0M0CA1	0,033	0,008	2,006	0,157
	CGCT1M1CG1	0,004	0,018	0,893	0,345
	CGCT1M1TA2	0,008	0,027	1,078	0,299
	CGCT1M1CG2	0,029	0,008	1,532	0,216
	CGCT1M1TA1	0,021	0,029	0,155	0,694
	CGCT1M0CA1	0,032	0,019	0,414	0,520
	CGCT1M0TA1	0,016	0,018	0,008	0,928
	TACT1M1CA2	0,026	0,029	0,022	0,883
	TATT1M0CG2	0,010	0,021	0,458	0,499
	TGCT1M0CA1	0,034	0,043	0,133	0,716
	TATT1M0CA1	0,019	0,038	0,670	0,413
	TGCT1M0CG2	0,018	0,014	0,039	0,844
	TACT1M0CA1	0,050	0,039	0,147	0,702
	TACT1M0TG2	0,027	0,014	0,513	0,474
	TGCT1M0TA1	0,012	0,021	0,247	0,619
	TGTT1M0TA1	0,034	0,028	0,059	0,808
	TGCT1M1CG1	0,011	0,031	0,960	0,327

Tabulas nobeigums					
Analizēto gēnu (marķieru) secība kombinācijā	Alēļu kombinācija	Biežums kontroles grupa	Biežums pacientu grupā	CHISQ	P
	CGTT0M1CA1	0,013	0,018	0,062	0,804
	TACT1M1TG2	0,026	0,009	1,073	0,300
	TATT1M1TA1	0,000	0,020	1,842	0,175
<i>NAT2 (A590G)/NAT2C481T</i>	CA	0,005	0,019	1,101	0,294
	TA	0,271	0,271	0,000	0,998
	CG	0,469	0,426	0,561	0,454
	TG	0,255	0,284	0,317	0,573
<i>GSTT1/ GSTM1</i>	T0M1	0,133	0,063	6,565	0,010
	T1M1	0,233	0,372	8,094	0,004
	T0M0	0,067	0,040	1,493	0,222
	T1M0	0,567	0,525	0,670	0,413
<i>GSTA1/GSTP1</i>	TG	0,138	0,112	0,428	0,513
	CG	0,172	0,197	0,271	0,603
	TA	0,293	0,247	0,759	0,384
	CA	0,397	0,444	0,642	0,423
<i>GSTT1/ GSTM1/ GSTA1/ GSTP1</i>	T1M1TG	0,039	0,040	0,006	0,938
	T1M0TG	0,087	0,066	0,552	0,458
	T0M1CG	0,039	0,021	1,151	0,283
	T1M1CG	0,046	0,077	1,327	0,249
	T0M0CG	0,017	0,008	0,581	0,446
	T1M0CG	0,079	0,112	1,011	0,315
	T0M1TA	0,057	0,016	5,23	0,022
	T1M1TA	0,062	0,079	0,339	0,561
	T0M0TA	0,008	0,017	0,410	0,522
	T1M0TA	0,174	0,121	2,072	0,150
	T0M1CA	0,028	0,030	0,008	0,929
	T1M1CA	0,089	0,167	4,183	0,041
	T0M0CA	0,042	0,013	3,590	0,058
	T1M0CA	0,233	0,234	0,000	0,987

**Analizēto marķieru kombināciju saistībā ar letālu vai neletālu alkohola  
toksiska hepatīta iznākumu**

Analizēto gēnu (marķieru) secība kombinācijā	Alēļu kombinācija	Biežums letālajiem gadījumiem	Biežums neletālajiem gadījumiem	CHISQ	P
<i>NAT2(A590G)/</i>	TACT1M1TA1	0,034	0,029	0,023	0,879
<i>NAT2(C481T)/</i>	TGCT1M0TG1	0,000	0,029	0,850	0,357
<i>MTHFR/ GSTT1/</i>	CGCT1M0TG1	0,000	0,054	1,615	0,204
<i>GSTM1/ GSTA1/</i>	CGCT1M0CA2	0,069	0,065	0,006	0,937
<i>GSTP1/ UGT1A1</i>	TACT1M0TA2	0,100	0,040	1,332	0,248
	TACT1M0CA2	0,004	0,016	0,237	0,626
	CGTT1M0TA1	0,069	0,063	0,011	0,915
	CGTT1M0TA2	0,004	0,026	0,519	0,472
	CGTT1M1TA1	0,046	0,014	0,886	0,347
	CGTT1M1TG1	0,046	0,000	3,246	0,072
	CGTT1M1CA1	0,046	0,000	3,246	0,072
	TGCT1M1CA2	0,034	0,043	0,039	0,844
	TGTT1M1CA1	0,000	0,029	0,850	0,357
	TGCT0M1TA2	0,000	0,043	1,288	0,256
	CGCT1M0CG1	0,034	0,016	0,347	0,556
	CGTT1M0CG1	0,000	0,029	0,850	0,357
	CGTT1M0CA1	0,053	0,024	0,521	0,470
	TGTT1M0CA1	0,060	0,028	0,554	0,457
	CGTT1M0CA2	0,031	0,033	0,004	0,949
	CGTT0M0CA1	0,034	0,014	0,417	0,518
	CGCT0M0CA1	0,034	0,014	0,417	0,518
	CGCT1M1CG2	0,000	0,029	0,850	0,357
	CGCT1M1TA1	0,000	0,029	0,850	0,357
	CGCT1M0CA1	0,016	0,035	0,241	0,623
	CGCT1M0TA1	0,000	0,020	0,577	0,448
	TACT1M1CA2	0,046	0,014	0,886	0,347
	TGTT1M0CG1	0,000	0,021	0,614	0,433
	TGCT1M0CG1	0,000	0,048	1,452	0,228
	TACT1M0CA1	0,069	0,042	0,323	0,570
	TGCT1M0CA1	0,009	0,016	0,064	0,800
	TACT1M0TG2	0,034	0,024	0,081	0,776
	TATT1M0TA1	0,034	0,019	0,201	0,654
	TACT1M1CG2	0,046	0,000	3,246	0,072
	TACT1M1TG2	0,011	0,029	0,263	0,608
	CGCT1M0TG2	0,000	0,023	0,680	0,410
	TGTT0M1CG1	0,034	0,005	1,354	0,245
	TGTT0M1CA1	0,000	0,038	1,141	0,285

Tabulas nobeigums					
Analizēto gēnu (marķieru) secība kombinācijā	Alēļu kombinācija	Biežums letālajiem gadījumiem	Biežums neletālajiem gadījumiem	CHISQ	P
GSTT1/ GSTM1/ GSTA1/ GSTP1	T1M1TG	0,042	0,039	0,009	0,924
	T1M0TG	0,016	0,122	3,495	0,062
	T0M1CG	0,079	0,027	1,648	0,199
	T1M1CG	0,066	0,036	0,548	0,459
	T0M0CG	0,027	0,012	0,330	0,566
	T1M0CG	0,038	0,096	1,208	0,272
	T0M1TA	0,052	0,061	0,037	0,847
	T1M1TA	0,066	0,060	0,015	0,904
	T1M0TA	0,200	0,162	0,259	0,611
	T0M1CA	0,002	0,035	1,104	0,293
	T1M1CA	0,097	0,088	0,022	0,882
	T0M0CA	0,081	0,025	1,995	0,158
	T1M0CA	0,233	0,238	0,003	0,960
<i>GSTT1/ GSTM1</i>	T0M1	0,158	0,122	0,290	0,590
	T1M1	0,263	0,220	0,277	0,599
	T0M0	0,105	0,049	1,331	0,249
	T1M0	0,474	0,610	1,958	0,162
<i>NAT2</i> (A590G)/ <i>NAT2C481T</i>	TA	0,395	0,218	3,998	0,046
	CG	0,447	0,487	0,162	0,687
	TG	0,158	0,295	2,557	0,110
GSTA1/GSTP1	TG	0,094	0,162	0,973	0,324
	CG	0,195	0,158	0,243	0,622
	TA	0,300	0,287	0,023	0,879
	CA	0,410	0,393	0,032	0,858

## Pielikums 3

## Alēļu asociācija totālajiem neatbildētājiem salīdzinājums starp dzimumiem

Rs# (dbSNP)	Gēns	Retākā alēle	MAF nulles atbilde	MAF pacienti ar atbildi uz antivirālo terapiju	$\lambda^2$	P vērtība	OR	CI 95%
<b>Sievietēm (n = 70)</b>								
gstm1	<i>GSTM1</i>	M0	0,25	0,479	1,561	0,211	0,362	0,069– 1,886
gsth1	<i>GSTT1</i>	T0	0	0,145	1,348	0,245	0,00	–
rs8175347	<i>UGT1A1</i>	7	0,4	0,339	0,147	0,701	1,296	0,343– 4,889
rs333	<i>CCR5</i>	D	0,5	0,274	2,608	0,106	2,643	0,786– 8,883
rs1800562	<i>HFE</i>	Y	0	0,043	0,359	0,548	0,00	–
rs1799945	<i>HFE</i>	D	0,08333	0,066	0,047	0,827	1,273	0,145 – 11,14
rs76151636	<i>ATP7B</i>	Q	0	0,024	0,301	0,582	0,00	–
rs28929474	<i>SERPINA1</i>	PIZ	0	0,025	0,307	0,579	0,00	–
rs17580	<i>SERPINA1</i>	PIS	0,0833	0,008	4,112	0,042	10,82	0,632– 185,1
<b>Vīriešiem (n = 80)</b>								
gstm1	<i>GSTM1</i>	M0	0,285	0,482	1,933	0,164	0,4296	0,127– 1,451
gsth1	<i>GSTT1</i>	T0	0,142	0,125	0,035	0,849	1,167	0,236– 5,768
rs8175347	<i>UGT1A1</i>	7	0,307	0,404	0,855	0,355	0,6536	0,264– 1,617
rs333	<i>CCR5</i>	D	0,423	0,140	10,87	0,001	4,492	1,754– 11,5
rs1800562	<i>HFE</i>	Y	0,090	0,076	0,050	0,822	1,20	0,244– 5,886
rs1799945	<i>HFE</i>	D	0,136	0,148	0,021	0,882	0,9058	0,244– 3,362
rs76151636	<i>ATP7B</i>	Q	0,090	0,015	0,104	0,045	6,20	0,825– 46,55
rs28929474	<i>SERPINA1</i>	PIZ	0	0,024	0,592	0,441	0,00	–
rs17580	<i>SERPINA1</i>	PIS	0,041	0,008	1,703	0,191	5,348	0,322– 88,59