

# OBSAH

<b>1</b>	<b>SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY .....</b>	<b>10</b>
1.1	ÚVOD .....	10
1.2	VIRUS HEPATITIDY C .....	12
1.2.1	<i>Organizace genomu</i> .....	13
1.2.2	<i>Protivirová terapie</i> .....	17
1.2.3	<i>Prediktory efektu terapie</i> .....	19
1.2.3.1	Virologické faktory.....	19
1.2.3.2	Hostitelské faktory.....	19
1.2.3.3	Faktory zevního prostředí.....	23
1.3	OXIDAČNÍ STRES U HEPATITIDY C .....	24
1.4	KATABOLICKÁ DRÁHA HEMU U HEPATITIDY C .....	30
<b>2</b>	<b>HYPOTÉZY A CÍLE STUDIE .....</b>	<b>34</b>
2.1	STUDIE A – EXPRESE HMOX A BLVRA.....	34
2.2	STUDIE B – POLYMORFISMY HMOX A UGT1A1 .....	35
<b>3</b>	<b>METODICKÁ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
3.1	SOUBOR PACIENTŮ A KONTROL .....	37
3.2	ODBĚR A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ .....	40
3.3	DESIGN STUDIE .....	41
3.3.1	<i>Studie A - Exprese HMOX a BLVRA</i> .....	41
3.3.2	<i>Studie B - Polymorfismy HMOX a UGT1A1</i> .....	42
3.4	PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE .....	44
3.5	ANALYTICKÉ METODY .....	47
3.5.1	<i>Zavedení metody na stanovení aktivity HMOX v PBMC</i> .....	47
3.5.1.1	Izolace PBMC.....	47
3.5.1.2	Plynová chromatografie.....	48
3.5.2	<i>Zavedení metod na analýzu genové exprese a HCV RNA</i> .....	49
3.5.2.1	Izolace RNA .....	49
3.5.2.1.1	Jaterní biopsie .....	49
3.5.2.1.2	PBL .....	49
3.5.2.1	RealTime RT PCR.....	50
3.5.2.1.1	Optimalizace reverzní transkripce (RT) .....	50
3.5.2.1.2	Návrh primerů pro qPCR .....	53
3.5.2.1.3	Validace qPCR.....	55
3.5.3	<i>Fragmentační analýza</i> .....	64
3.5.3.1	Izolace DNA .....	64
3.5.3.2	Multiplexová fragmentační analýza.....	65
3.6	STATISTICKÁ ANALÝZA .....	67
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>68</b>
4.1	STUDIE A – EXPRESE HMOX, BLVRA .....	68
4.1.1	<i>Exprese HMOX, BLVRA v jaterní tkáni</i> .....	68
4.1.2	<i>Aktivita HMOX v PBMC a exprese HMOX, BLVRA v PBL</i> .....	69
4.1.2.1	Pacienti před zahájením antivirové terapie .....	69
4.1.2.2	Pacienti v průběhu antivirové terapie.....	72
4.1.2.3	Predikce efektu protivirové terapie u pacientů s hepatitidou C.....	77
4.1.2.3.1	ROC analýza .....	77
4.1.2.3.2	Multivariační logistická regrese .....	77
4.2	STUDIE B-POLYMORFISMY HMOX A UGT1A1 .....	79
4.2.1	<i>Polymorfismy HMOX1 a UGT1A1 ve vztahu k pokročilosti jaterního postižení</i> .....	79
4.2.2	<i>Polymorfismy HMOX1 a UGT1A1 ve vztahu k účinku protivirové léčby</i> .....	81
<b>5</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>83</b>
5.1	ROLE HMOX A BLVRA V PATOGENEZI JATERNÍHO POŠKOZENÍ.....	83
5.2	ROLE BLVRA V PREDIKCI EFEKTU PROTIVIROVÉ TERAPIE.....	86
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>90</b>

6.1	STUDIE A – EXPRESE HMOX A BLVRA.....	90
6.2	STUDIE B – POLYMORFISMY HMOX A UGT1A1 .....	91
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>107</b>
8.1	PŘÍLOHA 1 .....	108
8.2	PŘÍLOHA 2 .....	109
8.3	PŘÍLOHA 3 .....	110
<b>9</b>	<b>SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....</b>	<b>111</b>
9.1	PUBLIKACE TÝKAJÍCÍ SE TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	111
9.1.1	<i>Práce v časopisech s IF.....</i>	<i>111</i>
9.1.2	<i>Práce v časopisech bez IF.....</i>	<i>111</i>
9.1.3	<i>Abstrakta v časopisech s IF.....</i>	<i>111</i>
9.1.4	<i>Abstrakta v časopisech bez IF.....</i>	<i>112</i>
9.2	PUBLIKACE TÝKAJÍCÍ SE JINÝCH TÉMAT.....	112
9.2.1	<i>Práce v časopisech s IF.....</i>	<i>112</i>

## **Abstrakt:**

Předkládaná práce se zabývá významem katabolické dráhy hemu u chronické hepatitidy C. Je zaměřena na objasnění možné asociace exprese/aktivity klíčových enzymů katabolické dráhy hemu, hemoxygenázy (*HMOX*) a biliverdinreduktázy (*BLVRA*) v jaterní tkáni a krvi (*studie A*) a polymorfismů *HMOX1* a UDP-glukuronosyltransferázy (*UGT1A1*) (*studie B*) s rozdílnými histologickými nálezy a rozdílnou účinností protivirové terapie.

Cílem práce bylo nalézt faktory, které by u pacientů s chronickou HCV infekcí mohly predikovat progresi jaterního poškození a efekt protivirové terapie před jejím zahájením.

Pro účely této studie jsme zavedli vysoce citlivou metodiku na stanovení aktivity *HMOX* v mononukleárech periferní krve (PBMC), která dosud nebyla k dispozici. Zavedli jsme a zvalidovali RealTime PCR metodiku na stanovení exprese *HMOX* a *BLVRA* v jaterní tkáni a v periferních leukocytech (PBL). (GT)<sub>n</sub> a (TA)<sub>n</sub> varianty promotoru genu pro *HMOX1* a *UGT1A1* jsme stanovili simultánní fragmentační analýzou, jejíž metodika byla v naší laboratoři nedávno vyvinuta a rovněž publikována.

Pomocí uvedených metod jsme neprokázali asociaci exprese/aktivity enzymů katabolické dráhy hemu a polymorfismů *HMOX1* a *UGT1A1* s histologickou aktivitou v jaterní tkáni. Prokázali jsme však významné rozdíly v expresi *BLVRA* v PBL mezi pacienty se setrvalou virologickou odpovědí (SVR) a pacienty bez virologické odpovědi (NVR), a to jak před zahájením terapie, tak i v jejím průběhu. Multivariační analýza potvrdila, že bazální exprese *BLVRA* v PBL je nezávislým prediktorem SVR.

**Klíčová slova:** virus hepatitidy C, katabolická dráha hemu, hemoxygenáza, biliverdinreduktáza, UDP-glukuronosyltransferáza, genová exprese, genetické polymorfismy

## **Abstract:**

This thesis focuses on the importance of the heme catabolic pathway in chronic hepatitis C (HCV). The aim is mainly to investigate, whether expression/activity of key enzymes of the heme catabolic pathway, heme oxygenase (HMOX) and biliverdin reductase (BLVRA) in the liver and blood (*study A*) or promoter variations of *HMOX1* and UDP-glucuronosyltransferase (*UGT1A1*) (*study B*) may be associated with the progression of fibrosis and may also predict antiviral treatment outcome in patients chronically infected with HCV.

We set up a new sensitive method to quantify HMOX activity by reduction gas chromatography. We developed and extensively validated RealTime PCR assay for *HMOX* and *BLVRA* expression in the liver and peripheral blood leucocytes (PBL). The (GT)<sub>n</sub> and (TA)<sub>n</sub> dinucleotide variations in *HMOX1* and *UGT1A1* gene promoters, respectively, were determined by fragment analysis.

No association was detected between either expression of *HMOX/BLVRA* or the *HMOX1/UGT1A1* promoter variants and the individual histological stages of liver disease in the HCV positive patients. A marked difference in *BLVRA* expression in PBL between the sustained responders (SVR) and patients with treatment failure (NVR) was detected before antiviral treatment and during the follow-up. Our data suggests, that *BLVRA* basal expression in PBL may be an independent predictor of SVR.

**Keywords:** hepatitis C virus, heme catabolic pathway, heme oxygenase, biliverdin reductase, UDP-glucuronosyltransferase, gene expression, gene polymorphisms

# SEZNAM ZKRATEK

18S rRNA	18S ribosomal RNA	18S ribozomální RNA
5'cap mRNA	7-methylguanosine 5'end of mRNA	7-metyl guanosin na 5' konci mRNA
+ssRNA virus	positive sense single stranded RNA virus	jednořetězcový RNA virus s pozitivním vláknem
-ssRNA virus	negative sense single stranded RNA virus	jednořetězcový RNA virus s negativním vláknem
A	adenine	adenin
AK	aminoacid	aminokyselina
ALP	alkaline phosphatase	alkalická fosfatáza
ALT	alanine aminotransferase	alaninaminotransferáza
AST	aspartate aminotransferase	aspartátaminotransferáza
AP-1	activator protein-1	aktivátorový protein 1
ADP	adenosine diphosphate	adenosindifosfát
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
AUC	area under an ROC curve	plocha pod ROC křivkou
Bach1	transcription factor Bach1	transkripční faktor Bach1
BLVRA/B	biliverdin reduktase A/B	biliverdinreduktáza A/B
BVR	biliverdine	biliverdin
bp	base pairs	páry bazí
C	cytosine	cytosin
CAT	catalase	kataláza
CCL5	C-C chemokine ligand 5	C-C chemokin ligand 5
cEVR	complete EVR	úplná časná virologická odpověď
c-Fos	cellular proto-oncogene c-Fos	protoonkogen c-Fos
CD81	membrane protein (cluster of differentiation 81)	membránový protein CD81
CLDN1	claudin1	klaudin 1
CoQ	coenzyme Q	koenzym Q
COX-2	cyclooxygenase-2	cyklooxygenáza-2
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4	cytotoxický T-lymfocytární antigen4
Cyto-c	cytochrome c	cytochrom c
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
dNTP, dNTPs	deoxyribonukleotide triphosphate(s)	deoxyribonukleotid trifosfát(y)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
E1, E2	HCV envelope glycoproteins E1, E2	obalové glykoproteiny HCV E1, E2
e-Jun	cellular proto-oncogene e-Jun	protoonkogen e-Jun
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
ETVR	end-of-treatment virological response	virologická odpověď na konci léčby
FAD	flavin adenine dinucleotide	flavinadenindinukleotid
FADH	reduced FAD	redukovaný FAD
G	guanine	guanin
(GT)n	(GT)n dinucleotide repeat	opakování dinukleotidů (GT)n
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
gDNA	genomic DNA	genomová DNA
GGT	gamma-glutamyl transpeptidase	gama-glutamyltransferáza
GNB3	guanine nucleotide binding protein3	guanin-nukleotid-vazebný protein3
GPX	glutathionperoxidase	glutathionperoxidáza

GSH/GSSG	reduced/oxidized glutathione	redukovaný/oxidovaný glutathion
GST	glutathione S-transferase	glutathion S-transferáza
GWAS	genome-wide association study	celogenomové asociační studie
Hb	haemoglobin	hemoglobin
HCC	hepatocellular carcinoma	hepatocelulární karcinom
HBV	hepatitis B virus	virus hepatitidy typu B
HCV	hepatitis C virus	virus hepatitidy typu C
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunodeficience
HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen
HMOX	heme oxygenase	hemoxygenáza
HPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase	hypoxantin fosforibosyl transferáza
HSC	hepatic stellate cells	jaterní hvězdicové buňky
Huh7	human hemochromatotic cell line	buněčné linie odvozené od nádorových buněk Huh7
HVR	hypervariable region	hypervariabilní oblast
IFIT1	interferon-induced antiviral protein	interferonem indukovaný protein inhibující virovou replikaci a translaci
IFN $\alpha, \lambda, \epsilon$	interferone $\alpha, \lambda, \epsilon$	interferon $\alpha, \lambda, \epsilon$
IGF1	insulin-like growth factor 1	inzulínu podobný růstový faktor 1
IL	interleukin	interleukin
IL28B	interleukin 28B	interleukin 28B
IMPDH	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	inosin monofosfát dehydrogenáza
IRES	internal ribosome entry site	interní vazebné místo pro ribosom
ISGs	interferon stimulated genes	geny stimulované interferonem
IU	international unit	mezinárodní jednotka
JFH-1	JFH-1 infection model	infekční klon JFH-1
JNK	Janus kinase	Janus kináza
kb	kilobase	kilobáze
kDa	kilodalton	kilodalton
kV	kilovolt	kilovolt
KIR2DL5	killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5	killer imunoglobulin-like receptor 2DL5
LDL	low-density lipoproteins	lipoproteiny o nízké hustotě
LDLR	LDL receptor	LDL receptor
MAPK	mitogen-activated protein kinase 3	mitogenem aktivovaná proteinkináza 3
MDA	malondialdehyde	malondialdehyd
NADH/NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid adenin dinukleotid
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease	nealkoholická steatóza jater
NASH	non-alcoholic steatohepatitis	nealkoholická steatohepatitida
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B	nukleární faktor-kappa B
NK buňky	natural liver cells	NK buňky
NS protein	non-structural protein	nestrukturní protein
nt	nucleotide	nukleotid
NVR	non virological responder	pacient bez SVR
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	oligoadenylát syntáza
OCN	occludin	okludin
OMIM	compendium of human genes and genetic disorders	databáze lidských genů a genetických onemocnění

OPN	osteopontin	osteopontin
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PBL	peripheral blood leucocytes	leukocyty periferní krve
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	mononukleáry periferní krve
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PEG-IFN	pegylated interferon	pegylovaný interferon
pEVR	partial early virological response	parciální časná virologická odpověď
Pfu pol	DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeum <i>Pyrococcus furiosus</i>	DNA polymeráza izolovaná z archaeabakterie <i>Pyrococcus furiosus</i>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E2	prostaglandin E2
PKR	protein kinase R	proteinkináza R
p7	HCV membrane protein	membránový protein HCV
PSC	primary sclerosing cholangitis	primární sklerozující cholangitida
qPCR	realTime PCR	PCR v reálném čase
R	resistant	rezistentní
Rn	normalised fluorescence	normalizovaná fluorescence
RNA	ribonucleid acid	ribonukleová kyselina
RBV	ribavirin	ribavirin
ROC	receiver operating characteristics curve	graf prahové operační charakteristiky
RONS	reactive oxygen and nitrogen species	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
rs	rs number for naming of SNP	rs číslo pro identifikaci SNP
RT	reverse transcription	reverzní transkripce
RVR	rapid virologic response	rychlá virologická odpověď
SNP	single nucleotid polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
SOD	superoxiddismutase	superoxiddismutáza
SR-BI	scavenger receptor class B, type 1	„scavenger“ receptor třídy B, typ I
SVR	sustained virologic response	setrvalá virologická odpověď
STAT-3	signal transducer and activator of transcription	signální transduktor a aktivátor transkripce
T	thymine	thymin
Ta	annealing temperature	teplota annealingu
Taq pol	DNA polymerase from the thermophilic bacterium <i>Thermus aquaticus</i>	DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
Th1	Th1 lymphocytes	Th1 lymfocyty
TGF-β	transforming growth factor β	transformující růstový faktor β
TNF-α	tumor necrosis factor alpha α	nádorový nekrotický faktor α
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UGT1A1	bilirubin - UDP glucuronyltransferase	bilirubin UDP glukuronyltransferáza
UTR	nontranslated region	netranslatovaná oblast
VR	variable region	variabilní oblast

# SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled virových proteinů .....	15
Tabulka 2: Klasifikace odpovědi na protivirovou léčbu .....	18
Tabulka 3: Oxidační poškození biomolekul.....	24
Tabulka 4: Přehled RONS .....	25
Tabulka 5: Základní charakteristiky terapeuticky naivních pacientů.....	39
Tabulka 6: Optimalizace množství RNA do reverzní transkripce .....	52
Tabulka 7: Testování výtěžnosti RT .....	53
Tabulka 8: Testování návaznosti RT Applera a Invitrogen .....	53
Tabulka 9: Sekvence primerů pro HCV RNA .....	54
Tabulka 10: Sekvence primerů pro genovou expresi .....	54
Tabulka 11: Optimalizace koncentrace primerů do qPCR.....	54
Tabulka 12: Validace qPCR - stanovení mezilehlé preciznosti .....	61
Tabulka 13: Testování účinnosti amplifikace – genová exprese.....	62
Tabulka 14: Testování účinnosti amplifikace – HCV RNA.....	62
Tabulka 15: Normalizace referenčních genů v jaterní tkáni .....	63
Tabulka 16: Normalizace referenčních genů v PBL .....	63
Tabulka 17: Sekvence primerů pro fragmentační analýzu.....	65
Tabulka 18: Aktivita HMOX v PBMC a exprese <i>HMOX</i> a <i>BLVRA</i> v PBL před zahájením terapie .....	69
Tabulka 19: Aktivita a exprese <i>HMOX</i> v průběhu terapie .....	72
Tabulka 20: Rozdíly v expresi <i>HMOX</i> mezi SVR a NVR .....	73
Tabulka 21: Vliv ribavirinem indukované anemie na expresi <i>BLVRA</i> v PBL.....	76
Tabulka 22: Multivariační logistická regrese potenciálních prediktorů SVR.....	78
Tabulka 23. Vztah mezi jednotlivými alelami promotorů genů <i>HMOX1</i> a <i>UGT1A1</i> a jaterní cirhózou .....	79
Tabulka 24: Vztah polymorfismů <i>HMOX1</i> a <i>UGT1A1</i> ke stagingu v histologickém hodnocení .....	80
Tabulka 25: Výskyt alely S v genu <i>HMOX1</i> a genotypu 7/7 <i>UGT1A1</i> ke stupni jaterní fibrózy .....	81
Tabulka 26: Vztah polymorfismů <i>HMOX</i> a <i>UGT1A1</i> , nízké virémie a typů virologické odpovědi k účinku protivirové terapie .....	82



# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura 5'-UTR a 3'-UTR .....	14
Obrázek 2: Translace polyproteinového prekurzoru .....	15
Obrázek 3: Životní cyklus viru .....	16
Obrázek 4: Zdroje RONS a hlavní metabolické cesty jejich vzniku.....	26
Obrázek 5: Vznik ROS v mitochondriích .....	27
Obrázek 6: Biologické efekty RONS u hepatitidy C .....	29
Obrázek 7: Katabolická dráha hemu .....	30
Obrázek 8: Design studie A .....	41
Obrázek 9: Design studie B.....	43
Obrázek 10: Kalibrace CO pro stanovení aktivity HMOX metodou GC.....	48
Obrázek 11: Křivky teploty tání (SW ABI PRISM 7500) .....	57
Obrázek 12: Amplifikační graf plazmidu HCV RNA.....	60
Obrázek 13: Kalibrace HCV minus (-ss) RNA .....	60
Obrázek 14: Kalibrace HCV plus (+ss) RNA.....	61
Obrázek 15: Korelace aktivity HMOX v PBMC a exprese HMOX1 v PBL.....	70
Obrázek 16: Korelace exprese BLVRA a HMOX 1 v PBL.....	71
Obrázek 17: Exprese BLVRA u pacientů s hepatitidou C v průběhu protivirové terapie .....	72
Obrázek 18: Rozdíly v expresi BLVRA mezi SVR a NVR v průběhu protivirové terapie .....	73
Obrázek 19: Individuální exprese BLVRA v PBL v průběhu terapie.....	74
Obrázek 20: ROC analýza exprese BLVRA v PBL.....	77

# 1 Současný stav problematiky

## 1.1 Úvod

Virus hepatitidy C (HCV) patří mezi nejdůležitější původce chronických hepatitid a progredující jaterní fibrózy, která může vést ke vzniku jaterní cirhózy. HCV infekce je nejčastější příčinou jaterních onemocnění ve vyspělých zemích světa. Akutní HCV infekce probíhá ve většině případů asymptomaticky, v 10 – 20% případů s nespecifickými „chřipkovými“ a gastrointestinální symptomy. Ikterickou formu má pouze třetina infikovaných. Ke spontánní eliminaci viru dochází v 10 – 40 % případech, častěji infekce progreduje do chronického stadia [1]. Chronická HCV infekce probíhá rovněž ve většině případů asymptomaticky a je v jasné příčinné souvislosti se vznikem jaterní cirhózy a hepatocelulárního karcinomu [2]. Jaterní cirhóza při chronické HCV infekci je nejčastější indikací ortotopické transplantace jater [3]. Výsledky protivirové terapie chronické HCV infekce nejsou dosud příliš uspokojivé. Vyléčení HCV infekce je dosahováno v cca 40-55% případech [4]. Dosud se nepodařilo identifikovat spolehlivý předpovědní faktor efektu protivirové léčby. Predikce efektu terapie je přitom klíčová pro zvýšení nákladové efektivity protivirové léčby a snížení rizika rozvoje závažných nežádoucích účinků.

Vysoké riziko vzniku jaterní cirhózy a hepatocelulárního karcinomu u HCV infikovaných pacientů je příčinou intenzivního výzkumu patogeneze a léčby HCV infekce. Přesto dosud nejsou přesně známy procesy zodpovědné za zánět jaterní tkáně a vznik fibrózy u HCV infekce. Kromě pravděpodobně imunopatogenního mechanismu zániku hepatocytů je za důležitý patogenní mechanismus pokládán zvýšený oxidační stres indukovaný virem hepatitidy C.

Předmětem našeho zájmu byla aktivita a exprese hemoxygenázy (HMOX), klíčového enzymu katabolické dráhy hemu. Naším cílem bylo zjistit, zda u chronické HCV infekce existuje vztah mezi aktivitou/expresí HMOX a histologickou aktivitou jaterního postižení,

případně mezi aktivitou/expresí HMOX a základními virologickými parametry před a během protivirové léčby.

Tyto možné asociace jsme studovali metodou prospektivní studie u skupiny pacientů s chronickou HCV infekcí léčených protivirovou terapií. V průběhu studie byly však publikovány nové poznatky týkající se přímého vlivu produktu HMOX, biliverdinu, na virovou replikaci, proto jsme naši studii rozšířili o analýzu exprese biliverdinreduktázy A (BLVRA).

## 1.2 Virus hepatitidy C

Člověk je jediným známým přirozeným hostitelem viru hepatitidy C (HCV), experimentálně může být tímto parenterálně přenosným virem infikován rovněž šimpanz [5,6]. Původ viru se podle evoluce jeho genetické diverzity předpokládá již v době před 600 – 2500 lety v jihovýchodní Asii (genotyp 6), odkud se z tohoto společného předka přenesl do západní Afriky, Japonska a dalších oblastí světa [7,8]. Hepatitida C, původně označovaná jako nonAnonB hepatitida (hepatitida NANB), byla u pacientů s posttranfusní hepatitidou poprvé popsána v roce 1975 [9]. Původce onemocnění se však nedařilo prokázat vzhledem k absenci vnímavé buněčné kultury, zvířecího modelu a především v důsledku technické a technologické nedostatečnosti tehdy používaných metod ve virologii. V roce 1987 Michael Houghton, Qui-Lim Choo, George Kuo a Daniel W. Bradley izolovali ze séra šimpanze s klinickými známkami nonAnonB hepatitidy klon cDNA odvozený z RNA viru a identifikovali nový neznámý virus, označený jako HCV [10]. Vzhledem ke způsobu virové replikace, která je bližší pestivirům než flavivirům [11,12], a nízké sekvenční homologii s flaviviry, byl pro HCV vytvořen v rámci čeledi Flaviviridae nový rod *Hepacivirus*, jehož je jediným zástupcem [6].

Stejně jako u ostatních RNA virů, genom HCV je extrémně heterogenní v důsledku mutací, vznikajících během virové replikace. V současnosti obsahuje databáze HCV více než 20 000 sekvencí [13]. Podle mezinárodní nomenklatury jsou HCV izoláty na základě své nukleotidové sekvence popsány a klasifikovány jako typy (6 genotypů, se shodou nukleotidové sekvence menší než 70%, označení arabskými číslicemi podle pořadí, v jakém byly postupně objeveny) a subtypy (více než 70 subtypů, se shodou nukleotidové sekvence 75-80%, označení malými písmeny) [14]. V hostitelském organismu se běžně vyskytuje v rámci téhož izolátu heterogenní směs geneticky rozdílných, ale blíže příbuzných kontinuálně se vyvíjejících populací virionů, označovaných jako „quasispecies“, se shodou

nukleotidové sekvence v rozmezí 95 - 99% [15]. Genetická variabilita je jednou ze strategií viru v jeho úniku před imunitní odpovědí hostitele a rovněž překážkou v úspěšnosti protivirové terapie. Jednotlivé genotypy jeví určité odlišnosti v průběhu onemocnění u infikovaného jedince a především v odpovědi na protivirovou terapii. Genotypy 1 a 4 patří mezi hůře léčitelné varianty viru, naopak genotypy HCV 2 a 3 vykazují vyšší účinnost léčby. Distribuce jednotlivých genotypů HCV je rozdílná geograficky. Globálně převažuje genotyp 1 (60% všech infekcí) a v menší míře genotyp 2. Genotyp 3 se rovněž vyskytuje celosvětově, avšak nejčastěji v jižní Asii a Austrálii, genotyp 4 na Středním východě a v Africe. Genotyp 5 se zřídka vyskytuje mimo Afriku a genotyp 6 převažuje v jihovýchodní Asii [16]. V ČR byla v roce 2007 zjištěna nejvyšší prevalence genotypu 1b (66 %), 3a (19,7 %) a 1a (13,3 %), s dominantním parenterálním přenosem při injekčním užívání drog [17].

Světová prevalence HCV je 3%, výskyt v Evropě se pohybuje mezi 0,5 – 2% [16]. Prevalence v ČR byla metodikou sérologického přehledu zkoumána pouze jednou, a to v roce 2001. Byla prokázána prevalence 0,2% a nyní se odhaduje mezi 0,3 až 0,5% [17,18].

### 1.2.1 Organizace genomu

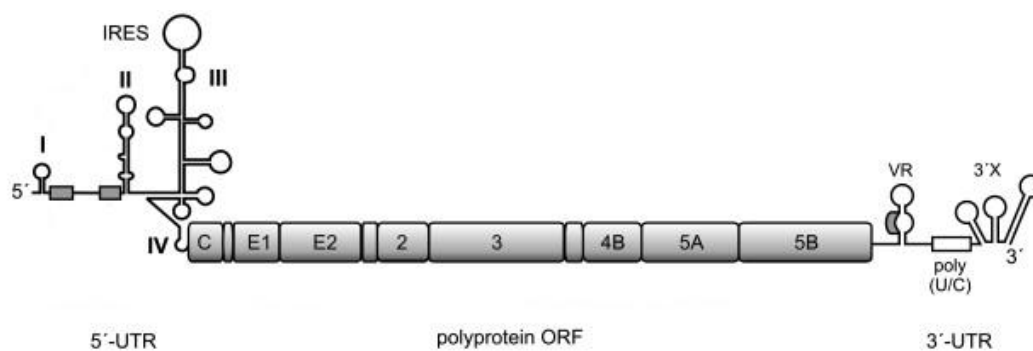
Virus hepatitidy C je obalený RNA virus, jehož genom složený z 9,6 kb tvoří jednovláknová RNA pozitivní polarity s jedním čtecím rámcem (ORF, Open Reading Frame) kódujícím vznik polyproteinového prekurzoru. Na obou koncích ORF se nacházejí vysoce konzervované netranslatované oblasti (5'-UTR, 3'-UTR, Untranslated Region) [19,20]. **5'-UTR oblast** (341 nt) s 90% primární sekvenční identitou mezi genotypy obsahuje vysoce konzervované sekundární a terciální struktury [21,22]. Skládá se ze 4 domén (**Obrázek 1**) a reguluje virovou replikaci a iniciaci translace virového proteinu v interním vazebném místě pro ribozom

(IRES, Internal Ribosome Entry Site) [23]. Struktura HCV IRES je bližší pestivirům než flavivirům, flaviviry mají výrazně kratší oblast IRES na 5'-konci [11].

**3'-UTR oblast** (200-235 nt) je složena ze 3 částí: ve směru 5→3 z variabilního regionu (VR), poly (U/C) regionu a vysoce konzervovaného X regionu. Variabilní region se liší délkou (25-70 nt) i sekvencí u různých genotypů, je však vysoce konzervativní mezi virovými řetězci stejného genotypu [24]. Poly U(C) region se liší délkou a sekvencí mezi odlišnými virovými izoláty [25] a X region je vysoce konzervovaná oblast u všech genotypů. 3'-UTR reguluje translaci, iniciaci virové replikace, stabilitu a maturaci virionů [26].

**Obrázek 1: Struktura 5'-UTR a 3'-UTR**

Převzato z [247]

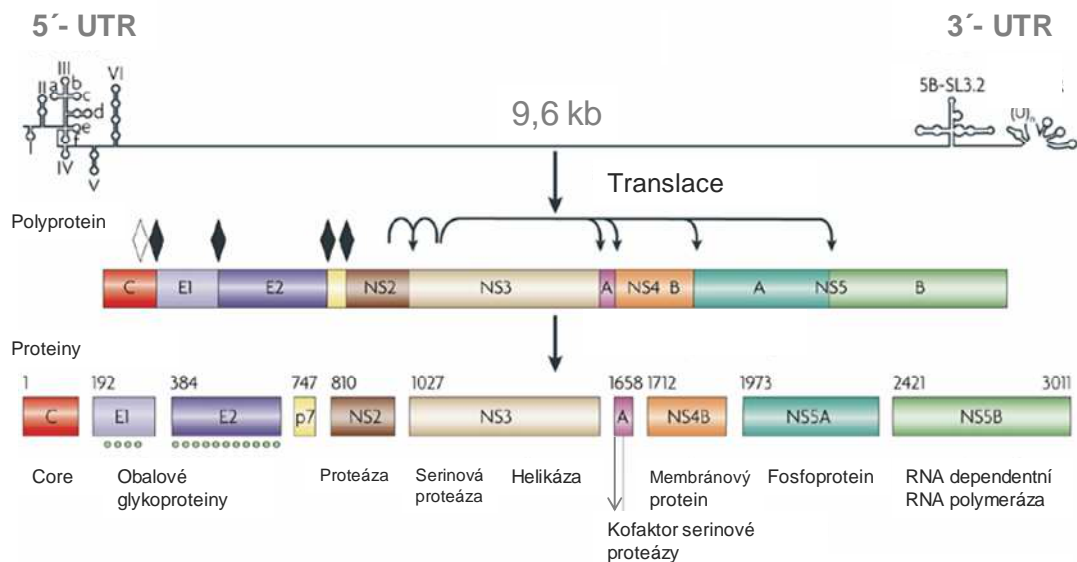


HCV RNA slouží jako mRNA pro translaci polyproteinového prekurzoru (**Obrázek 2**), který je následně štěpen buněčnými a virovými proteázami na jednotlivé strukturní (Core, E1, E2) a nestrukturní proteiny (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B) a protein p7, nacházející se na rozhraní strukturních a nestrukturních proteinů. Přehled proteinů HCV je uveden v tabulce (**Tabulka 1**).

## Obrázek 2: Translace polyproteinového prekurzoru

Upraveno podle [248]

IRES reguluje translaci polyproteinového prekurzoru na strukturální a nestrukturální proteiny. E1/E2, E2/p7 a p7/NS2 jsou štěpeny signálními peptidázami hostitele. HCV NS2–3 a NS3–4A jsou štěpeny virovými proteázami.

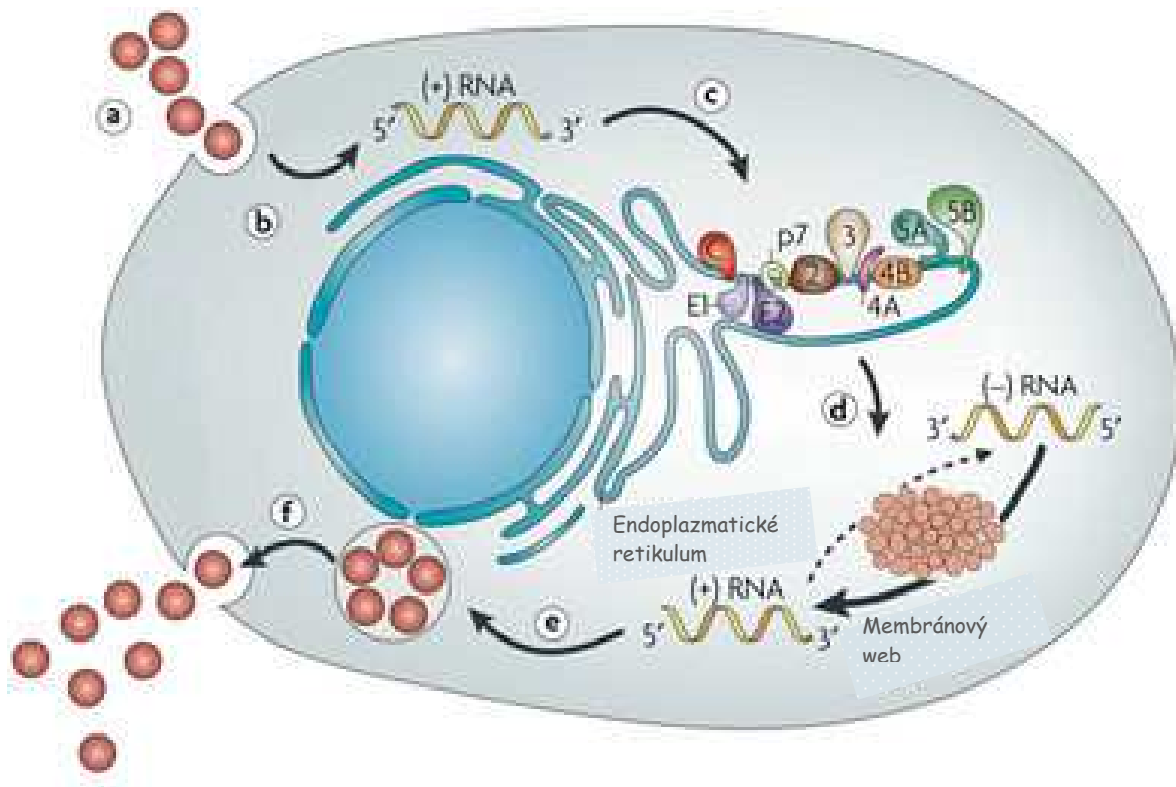


Tabulka 1: Přehled virových proteinů

Protein	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce [27,28,29,30,31]
Core	21 - 23	RNA vazebný; tvoří nukleokapsidu
E1	33-35	Obalový glykoprotein; asociovaný s E2
E2	70-72	Obalový glykoprotein; asociovaný s E1
P7	7	Kalciový iontový kanál (viroporin)
NS2	21-23	Štěpí NS2-NS3 (cysteinová proteáza)
NS3	69	Štěpí NS3-NS4A komplexu (serinová proteáza) ATPáza/helikáza
NS4A	6	Kofaktor serinové proteázy
NS4B	27	Indukce změny membrány
NS5A	56-58	Fosfoprotein, tvorba replikačního komplexu, vazba PKR, ISDR, IFN-rezistence
NS5B	65-68	RNA dependentní RNA polymerázy, iniciace transkripce

**Obrázek 3: Životní cyklus viru**  
Upraveno podle [248]

- Vazba virionu zprostředkovaná membránovými receptory (membránový protein CD81, LDL receptor-LDLR, scavenger receptor SR-BI, claudin 1-CLDN1, occludin-OCLN) a clathrid dependentní endocytóza
- Obnažení RNA genomu viru v cytoplasmě
- IRES-zprostředkovaná translace (viz obr. 2)
- Replikace RNA
- Sbalení a uspořádání RNA, dozrávání virionu
- Uvolnění nového virionu z buňky



Každá fáze životního cyklu viru se může stát potenciálním cílem protivirové terapie [32]:

**Fáze vstupu viru do buňky** - protilátky nebo molekuly proti receptorům a virus neutralizační protilátky (mohou zabránit zejména reinfekci štěpu po transplantaci).

**Translace polyproteinu** - inhibitory NS4A, NS5A, NS3/4A serinové proteázy.



**Replikace virové RNA** – inhibitory NS5B, cyclophilinu B, NS5B RNA-dependentní RNA polymerázy, NS2/3 autoproteázy, RNA helikázy. Zde patří rovněž antagonisté miR-122, specifické pro hepatocyty, které využívá virus pro svou replikaci.

**Dozrávání virionu** – inhibitory  $\alpha$ -glukosidázy, enzymu, hrajícího kritickou roli v maturaci virionu a iniciaci tvorby glykoproteinového obalu; při uvolnění nového virionu z buňky - interferencí s lipoproteinovými částicemi, které využívá virus k uvolnění z infikované buňky [33].

### 1.2.2 Protivirová terapie

Primárním terapeutickým cílem u chronické hepatitidy C je eliminace viru spojená s regresí fibrózy jater a snížením rizika vzniku cirhózy jater a hepatocelulárního karcinomu. Standardním terapeutickým postupem protivirové terapie je v současné době podání kombinace pegylovaného interferonu alfa (PEG-IFN) a virostatika ribavirinu (RBV) po dobu 24 - 48 týdnů v závislosti na vstupních parametrech (zejména genotypu a virémii HCV)[34]. Interferon byl užít jako preparát k terapii non-A, non-B hepatitidy již v 80. letech minulého století[35]. Ribavirin byl poprvé použit k terapii chronické infekce HCV v roce 1991 [36], standardní součástí léčby se stal po roce 1998 [37]. Imunomodulační účinek interferonů spočívá v tom, že zvyšují aktivitu cytotoxických T lymfocytů, přirozených zabíječů (NK buněk) a v tom, že stimulují T lymfocyty a makrofágy k tvorbě a sekreci dalších cytokinů. Interferony zvyšují expresi HLA antigenů I. třídy jak na zdravých, tak na virem infikovaných buňkách. Tímto mechanismem se infikované buňky stávají citlivějšími vůči cytotoxickým T lymfocytům [38]. Ribavirin inhibuje inosin monofosfát dehydrogenázu (IMPDH) a zapříčiní tak vyčerpání poolu guanosinu, potřebného pro účinnou virovou replikaci [39,40]. Ribavirin rovněž stimuluje antivirovou odpověď Th1 lymfocytů [41-44] mechanismem pravděpodobně nezávislým na INF [45]. PEG-IFN je podle typu podáván ve fixním dávkování (PEG-IFN-alfa2a 180ug 1x týdně) nebo v dávkování podle tělesné hmotnosti (PEG-IFN-alfa2b 1,0-1,5

ug/kg 1x týdně). Ribavirin je rovněž podáván podle tělesné hmotnosti, obvyklá denní dávka při hmotnosti do 75 kg je 1000 mg, při hmotnosti vyšší pak 1200 mg. Touto léčbou je dosaženo setrvalé virologické odpovědi (SVR, tj. negativní HCV RNA v séru 24 týdnů po skončení terapie) přibližně v 55% případů [4]. Pouze pacienti, kteří dosáhnou časně virologické odpovědi (EVR, pokles HCV RNA ve 12. týdnu  $\geq 2$  log proti výchozím hodnotám, popř. negativní HCV RNA v séru ve 12. týdnu léčby) nebo rychlé virologické odpovědi (RVR, negativní HCV RNA ve 4. týdnu léčby) mají naději dosáhnout SVR. Pouze tito pacienti mají být léčeni až do 48. týdne léčby. Pokud k dosažení EVR nedojde (pokles HCV RNA  $< 2$ log ve 12. týdnu léčby), je pacient považován za rezistentního na terapii (R) a jeho léčba má být ukončena již ve 12. týdnu léčby. Podrobnou klasifikaci všech variant odpovědi na protivirovou léčbu ukazuje **Tabulka 2** [46]

**Tabulka 2: Klasifikace odpovědi na protivirovou léčbu**

Rychlá virologická odpověď (RVR)	HCV RNA negativní ve 4. týdnu terapie
Parciální časná virologická odpověď (pEVR)	HCV RNA pozitivní ve 4. i ve 12. týdnu terapie, ale ve 12. týdnu pokles o $\geq 2$ log <sub>10</sub> proti výchozím hodnotám
Úplná časná virologická odpověď (cEVR)	HCV RNA pozitivní ve 4. týdnu a negativní ve 12. týdnu
Rezistence (R)	Pokles virémie $< 2$ log <sub>10</sub> proti výchozím hodnotám ve 12. týdnu
Odpověď na konci léčby (ETVR)	Negativní HCV RNA v okamžiku ukončení protivirové léčby
Setrvalá virologická odpověď (SVR)	Negativní HCV RNA ve 24. týdnu po ukončení protivirové léčby
Znovuobjevení HCV RNA (Breakthrough)	Znovuobjevení pozitivní HCV RNA po předchozím dosažení negativity během protivirové terapie
Pomalá virologická odpověď (Slow Response, SR)	pEVR s přetrvávající pozitivní HCV RNA ve 24. týdnu protivirové léčby

## **1.2.3 Prediktory efektu terapie**

### **1.2.3.1 Virologické faktory**

#### **1.2.3.1.1.1 Virová nálož**

Ačkoliv virová nálož ani genotyp viru nemá jasně prokazatelný vztah k progresi jaterního postižení [47,48] nízká virová nálož před zahájením terapie (<600000-800000 IU/ml) byla v řadě studií prokázána jako nezávislý prediktor odpovědi na terapii nezávisle na genotypu [4,49-52]. Nejlepší predikci efektu protivirové terapie umožňuje v současné době hodnocení virové kinetiky (poklesu sérové HCV RNA) v prvních fázích léčby, zejména v prvních 12 týdnech. Pacienti dosahující RVR mají pravděpodobnost dosažení SVR 91%, pacienti s cEVR mají pravděpodobnost SVR 60% [53].

#### **1.2.3.1.1.2 Genotyp HCV/množství kvazidruhů**

V mnoha studiích byl rovněž potvrzen vliv genotypu HCV na predikci efektu terapie. Pacienti s genotypem 1 dosahují SVR v 41-52% případů oproti 76-84% u genotypů 2 a 3,[4,54-55] a 65-72% u genotypu 4 [56-58] a 70-79% u genotypu 6 [59]. Velké randomizované studie genotypu 5 dosud nebyly provedeny. Další virologické faktory asociované se SVR zahrnují počet mutací ve specifických regiorech [60-62] a vývoj kvazidruhů [63-65]. Kvazidruhy mají zřejmě význam pro přechod akutní infekce ve chronickou, resp. jejich rychlý vývoj brání spontánní eliminaci viru, ale jejich význam pro histologickou progresi jaterního postižení nebyl rovněž jednoznačně prokázán [66].

### **1.2.3.2 Hostitelské faktory**

#### **1.2.3.2.1.1 Pohlaví/věk**

Byla prokázána korelace ženského pohlaví s dosažením SVR [67], avšak multivariační analýzy (po zahrnutí hmotnosti) tuto asociaci nepotvrdily [4,55]. Dostupná literární data ukazují, že riziko progresu jaterního postižení je nižší u žen než u mužů [68]. Dosavadní data

rovněž ukazují na skutečnost, že čím nižší je věk v okamžiku expozice, tím nižší je riziko progresu jaterního postižení do jaterní cirhózy. Jako kritická hranice zlomu prognóz bývá udáván věk 40 let [48,69]. Obezita je prediktorem progresu u pacientů s chronickou HCV infekcí. Body mass index (BMI)  $\geq 25\text{kg/m}^2$  je významně asociovaný s progresí fibrózy [70] a inverzně asociovaný s dosažením SVR [51,71].

#### **1.2.3.2.1.2 Demografické parametry**

Rasa je významným hostitelským faktorem asociovaným s účinností terapie [72]. Sníženou pravděpodobnost dosažení SVR mají Afro-Američané s účinností terapie od 8-28% proti jiným rasám s účinností 22-52% [73-77]. Mechanismy, kterými rasa ovlivňuje účinnost antivirové terapie, mají zřejmě imunogenetické aspekty a zůstávají dosud neobjasněny.

#### **1.2.3.2.1.3 Histologické parametry**

Nealkoholická steatohepatitida (NASH) negativně ovlivňuje průběh HCV infekce [78].

V etiologii NASH se uplatňuje především diabetes mellitus (DM) II. typu a obezita. Bylo prokázáno, že jak DM, tak i obezita jsou nezávislými faktory, které samy o sobě negativně ovlivňují průběh HCV infekce [69]. Pokročilá fibróza a cirhóza jsou významným nezávislým prediktorem neodpovídatosti na antivirovou terapii [79], zatímco absence cirhózy a steatózy pozitivně koreluje se SVR [49,50,80]. Steatóza je rovněž asociovaná s akcelerací progresu do jaterní fibrózy [81-83].

#### **1.2.3.2.1.4 Biochemické parametry**

Pacienti s normální aktivitou alanin aminotransferázy (ALT) mají méně závažné jaterní postižení než pacienti s vyšší aktivitou ALT. Progrese jaterního postižení do závažnějších stádií fibrózy je u osob s normální aktivitou ALT rovněž minimální nebo žádná [84]. Byla popsána asociace mezi hladinami ALT a SVR u pacientů s genotypem 2 a 3 [49], v jiných studiích však tato souvislost nebyla potvrzena [51,55]. Nízké hladiny sérové gama-

glutamyltransferázy (GGT) byly v řadě studií asociovány se SVR [51,85,86]. Zvýšený obsah železa je známý jako faktor způsobující rychlejší progresi jaterní léze [87] a jako negativní prediktivní faktor terapeutické odpovědi [88,89]. Zvýšené hladiny ferritinu v séru jsou rovněž prediktorem nižší úspěšnosti terapie [90-92]. Recentní studie potvrzují, že HCV infekce má přímý vliv na rozvoj inzulínové rezistence a je asociována s hyperinzulinémií [93]. Inzulínová rezistence je asociovaná s horší odpovědí na terapii, zejména u pacientů s genotypem 1 [77,94-98].

#### 1.2.3.2.1.5 Genetická diverzita hostitele

##### Polymorfismy genu *IL28B*

*IL28B* je gen kódující interferon typu III, IFN- $\lambda$ 3, který je lokalizován na 19. chromozomu. Objev polymorfismů tohoto genu je výsledkem tzv. genome-wide association studies (GWAS). V oblasti genu *IL28B* bylo dosud identifikováno několik jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism, SNP) s úzkým vztahem k nejrůznějším parametrům HCV infekce. Mechanismus, jakým je pozitivní efekt příznivého genotypu zprostředkován, nebyl dosud objasněn.

Prvním SNP popsáním v oblasti genu *IL28B* byl SNP rs12979860 [99]. Tento SNP je v silném vztahu k efektu protivirové léčby. Genotyp CC v této poloze je asociován s 2,5x vyšší účinností terapie než genotypy TT a CT [100]. Různý výskyt tohoto výhodného genotypu CC v různých geografických oblastech a populacích vysvětluje do velké míry různou účinnost protivirové léčby v různých etnikách. Asociace genotypu CC rs12979860 s dosažením setrvalé virologické odpovědi (SVR) představuje dosud nejpřesnější prediktivní faktor efektu léčby. Kromě zmíněného polymorfismu bylo popsáno dalších 6 SNP v této oblasti se vztahem k HCV. rs12979860 je z nich jednoznačně nejvýznamnější, avšak jeho prediktivní hodnota je stále z klinického pohledu nedostatečná. Rozhodování o léčbě tudíž ani

nadále nemůže být založeno pouze na znalosti a výsledku analýzy SNP *IL28B*. Pozitivní prediktivní hodnota je navíc ovlivněna obecnou pravděpodobností dosažení SVR v dané populaci.

Polymorfismy genu *HFE* (C282Y a H63D mutace) mají pozitivní vliv na dosažení SVR [87,101-103] přestože obě mutace jsou pozitivně asociovány s vyššími koncentracemi železa v jaterní tkáni, faktorem inverzně asociovaným s dosažením SVR [87,88,101,104-110]. Recentní studie ovšem nepotvrdily vliv koncentrace železa v jaterní tkáni na predikci účinnosti terapie [91,111,112]. Smith et al prokázali, že heterozygoti mají častěji výskyt jaterní cirhózy nežli pacienti bez mutované alely [113]. Asociace genetických polymorfismů s účinností terapie byly rovněž popsány u genů kódujících *OASL* (2'-5'-oligoadenylate synthetase-like), *IFIT1* (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1) [114], *KIR2DL5* (killer cell immunoglobulin-like receptors), *IL-6*, *IL-12B*, *IL-18*, *CCL5* (chemokine (C-C motif) ligand 5), *TNF- $\alpha$*  (tumor necrosis factor alpha), *IFN- $\gamma$* , *OPN* (osteopontin), *GNB3* (guanine nucleotide binding protein), a *CTLA4* (cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), ačkoliv role těchto genů u HCV infekce dosud nebyly objasněny [115]. V některých dalších studiích se však tyto asociace nepotvrdily. Nekonzistentní výsledky těchto analýz mohou být způsobeny rasovými rozdíly, odlišně definovanou účinností terapie a genotypy účastníků studie [116].

#### **1.2.3.2.1.6 Expresse INF stimulovaných genů v jaterní tkáni a v PBMC**

Mnoha studii byly potvrzeny rozdíly v aktivaci INF stimulovaných genů (ISGs) v jaterní tkáni a/nebo v PBMC v souvislosti s efektem protivirové terapie [42,117-122]. Prokázaná byla jak upregulovaná bazální exprese ISGs v jaterní tkáni u nonrespondérů [117,120], indikující preaktivaci signálních drah IFN již před zahájením terapie a jejich následná odolnost vůči další aktivaci během terapie; tak rovněž i upregulovaná exprese u SVR [123].

Tyto rozdíly mohou být zprostředkovány jak rozdílnou indukcí ISGs po podání IFN během antivirové terapie, tak i přímým antivirovým účinkem nebo imunoregulační funkcí jednotlivých proteinů ISGs [124,125]. U některých ISGs byla prokázána inverzní korelace mezi makrofágy hepatocytů a jaterní tkání [119,126].

### 1.2.3.3 Faktory zevního prostředí

Koinfekce s dalšími viry, které mají podobné cesty šíření jako HCV, patří mezi nejdůležitější faktory, které ovlivňují průběh HCV infekce. Významným faktorem je **koinfekce s virem hepatitidy B (HBV)**. Chronická HBV infekce významně zhoršuje prognózu osob se současnou infekcí HCV. Rovněž osoby, které mají sérologické známky prodělané HBV infekce (total anti-HBc pozitivní) mají významně vyšší riziko rozvoje jaterní cirhózy v porovnání s osobami bez prodělané HBV infekce [127,128]. **Koinfekce s virem lidské imunodeficiency (HIV)** negativně ovlivňuje přirozený průběh infekce HCV. HIV/HCV-koinfikovaní pacienti mají vyšší HCV virémii, jež je závislá na pokročilosti imunodeficitu. Průběh infekce HCV u osob infikovaných HIV je rovněž charakterizován častějším přechodem do chronicity a v porovnání s osobami infikovanými pouze HCV dochází k rychlejší progresi fibrózy do cirhózy a vyššímu riziku vzniku HCC. Léčba chronické HCV infekce u HIV koinfikovaných pacientů má v průměru horší výsledky než u HIV negativních pacientů [129-131]. Je prokázáno negativní ovlivnění průběhu HCV infekce současným zvýšeným **příjmem alkoholu**. Alkoholici, kteří jsou infikováni HCV, mají významně vyšší riziko rozvoje jaterní cirhózy i HCC [132,133]. Není dosud znám patogenetický mechanismus působení alkoholu, ani zda alkohol přímo ovlivňuje replikaci viru [134]. Podle některých prací dochází vlivem alkoholu k mírnému zvýšení hladin sérové HCV RNA [135]. Příjem alkoholu v množství větším než 70 g/den je spojen s genezí kvazidruhů [136]. Některé studie identifikovaly **kouření** jako nezávislý rizikový faktor pro rozvoj jaterní fibrózy [137-139] a vznik HCC u chronické hepatitidy C [69].

### **1.3 Oxidační stres u hepatitidy C**

V patogenzi poškození jaterní tkáně při HCV infekci hraje roli rovněž oxidační stres za účasti reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) - souhrnně RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species). Mezi RONS patří volné radikály a sloučeniny, které snadno oxidují jiné látky, nebo se na radikály mění. Koncentrace RONS je udržována ve fyziologickém rozmezí účinnými antioxidačními systémy, které chrání buňku před negativním působením oxidačního stresu. Podněty způsobující oxidační stres vedou ke změnám v expresi antioxidačních enzymů [140]. Mezi nejvýznamnější enzymy patří superoxiddismutáza (SOD), kataláza (CAT), glutathionperoxidáza (GPX), glutathion-S-transferáza (GST), hemoxygenáza (HMOX) a biliverdinreduktáza (BLVRA). Mezi významné nenzymové antioxidanty patří bilirubin, glutathion, thioredoxin, kyselina lipoová, koenzym Q<sub>10</sub>, albumin, kyselina močová, močovina, albumin, flavonoidy, vitamíny A, C, E, měď, zinek, selen, a kofaktory jako kyselina listová, vitaminy B1, B2, B6 a B12, transferin, ferritin, haptoglobin, hemopexin, ceruloplasmin a laktoferin [141-146]. Vitamin C však může rovněž podporovat vznik hydroxylových radikálů v přítomnosti volného železa [147]. Některé antioxidanty se tedy mohou chovat jako oxidanty u pacientů s nadbytkem železa v játrech [13]. RONS, vznikající běžně v organismu, hrají důležitou roli v transportu buněčné energie, v imunitní ochraně organismu a rovněž jako signální molekuly [148]. Nadměrnou tvorbou RONS a/nebo poklesem antioxidační obrany dochází k oxidaci biomolekul (nenasycených mastných kyselin lipidů, proteinů i DNA), při které se mění jejich funkce a dochází k patologickému procesu (zánětu, fibrogenzi, mutacím DNA atd.). Následky oxidačního poškození biomolekul shrnuje

**Tabulka 3.**



**Tabulka 3: Oxidační poškození biomolekul**

Převzato z: [148]

CÍL	POŠKOZENÍ	NÁSLEDKY
nenasyčené mastné kyseliny v lipidech	ztráta dvojných vazeb tvorba reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	změněná fluidita lipidů změny v propustnosti membrán vliv na membránově vázané enzymy tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy
proteiny	agregace a síťování fragmentace a štěpení modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin reakce s hemovým železem	změny v transportu iontů vstup $Ca^{2+}$ do cytosolu změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení kruhu deoxyribózy modifikace a poškození bazí zlomy řetězce, křížové vazby řetězců	mutace translační chyby inhibice proteosyntézy

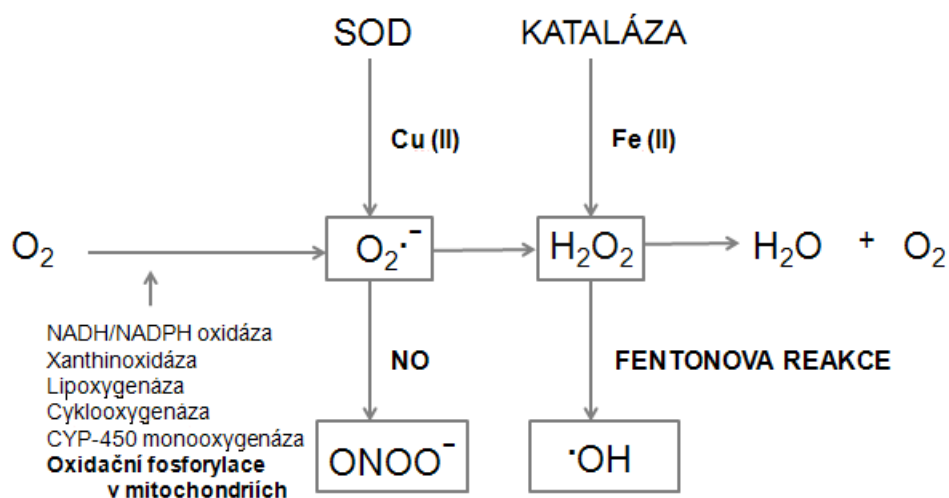
Působení RONS hraje významnou roli při vzniku a rozvoji řady závažných onemocnění, jako jsou ateroskleróza, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, plicní choroby, jaterní choroby, imunitní dysfunkce, neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc), psychiatrická onemocnění (schizofrenie, depresivní poruchy), Downův syndrom, zhoubné nádory [13],[149]. Přehled RONS udává **Tabulka 4**.

**Tabulka 4: Přehled RONS**

Reaktivní formy kyslíku	Reaktivní formy dusíku
Superoxid – $O_2^{\cdot-}$ Hydroxylový radikál – $HO^{\cdot}$ Peroxyl – $ROO^{\cdot}$ Alkoxy – $RO^{\cdot}$ Hydroperoxyl – $HO_2^{\cdot}$ Peroxid vodíku – $H_2O_2$ Kyselina chlorná – $HClO$ Ozon – $O_3$ Singletový kyslík – $^1O_2$	Oxid dusnatý – $NO^{\cdot}$ Oxid dusičitý – $NO_2^{\cdot}$ Nitrosyl – $NO^+$ Nitroxid – $NO$ Peroxynitrit – $ONOO$ Alkylperoxynitrit – $ROONO$

Zdroje RONS a hlavní metabolické cesty jejich vzniku ukazuje **Obrázek 4**.

**Obrázek 4: Zdroje RONS a hlavní metabolické cesty jejich vzniku**  
Upraveno podle [249]



Některé proteiny viru hepatitidy C (Core, E1, NS3, NS5A) přímo indukují vznik RONS v hepatocytech [150]. Nestrukturní proteiny HCV vytvářejí replikační komplex asociovaný s membránou endoplazmatického retikula (ER) hepatocytů. **NS5A protein**, zakotvený na membráně ER, indukuje oxidační stress přímo v ER [151] a nepřímo pak v mitochondriích při úniku  $Ca^{2+}$  z ER do mitochondrií. Zvýšením  $Ca^{2+}$  se mění transmembránový potenciál mitochondrií a dochází k produkci ROS [152-154], vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů STAT-3 a NF- $\kappa$ B, které požadují  $Ca^{2+}$  a ROS [29,155]. Bylo prokázáno pětinasobné zvýšení oxidačního stresu *in vitro* spolu s indukcí MnSOD, HMOX1, katalázy a GSH jako adaptivní odpovědi na oxidační stres v Huh7 buňkách exprimujících NS5A [154,156]. Prokázána byla také redukováná antioxidační obrana reprezentovaná snížením hladin glutathionu, vitaminů A, C, E a selenu [157]. Zda i další HCV proteiny indukují ER stres, zůstává dosud neobjasněno.

**NS3 protein** indukuje RONS aktivací NADPH oxidázy [158,159].

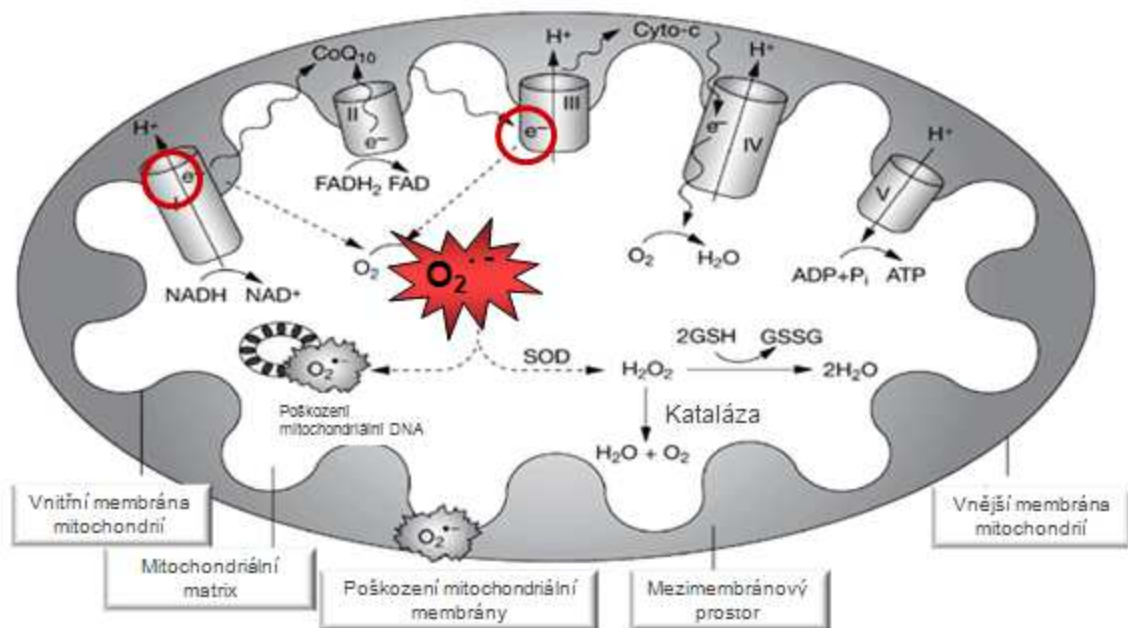
Exprese **HCV Core proteinu** je asociována se zvýšením RONS, sníženým intracelulárním a mitochondriálním obsahem GSH a zvýšenými hladinami oxidovaného thioredoxinu a produktů peroxidace lipidů [156,160]. HCV Core protein stimuluje přímo produkci ROS v

mitochondriích (**Obrázek 5**) mechanismem inhibice elektronového transportního řetězce [13,150,161]. Byla popsána *in vitro* inhibice komplexu I (bez snížené aktivit komplexu II a III) následkem porušené funkce mitochondrií, způsobené zvýšením obsahu  $\text{Ca}^{2+}$ , ke kterému dochází díky lokalizaci HCV Core proteinu na vnější membráně mitochondrií. Tento předpoklad je v souladu s mitochondriálními abnormalitami nalezenými *in vivo* u Core-exprimujících zvířecích modelů a u pacientů s hepatitidou C [160,162]. Navzdory zvýšené produkci RONS v bunkách exprimujících Core protein nebylo pozorováno kompenzační zvýšení HMOX ani katalázy. Ovšem, jak Core protein, tak i NS5, indukoval MnSOD [156]. Mechanismus indukce RONS u **E1 proteinu** dosud není objasněn.

**Obrázek 5: Vznik ROS v mitochondriích**

Upraveno podle [250]

Vznik ROS v mitochondriích je důsledkem přímé interakce HCV core proteinu s transportéry elektronů v dýchacím řetězci.



Stav chronického oxidačního stresu u HCV infekce může přispívat ke vzniku fibrózy a karcinogeneze v játrech [163]. K aktivaci fibrogenese u HCV infekce přispívá složitá kaskáda dějů. Především dochází k tomu, že dlouhotrvající infekce vede k opakovanému a prakticky trvalému poškození hepatocytů. Toto poškození spouští reparativní procesy v jaterní tkáni,

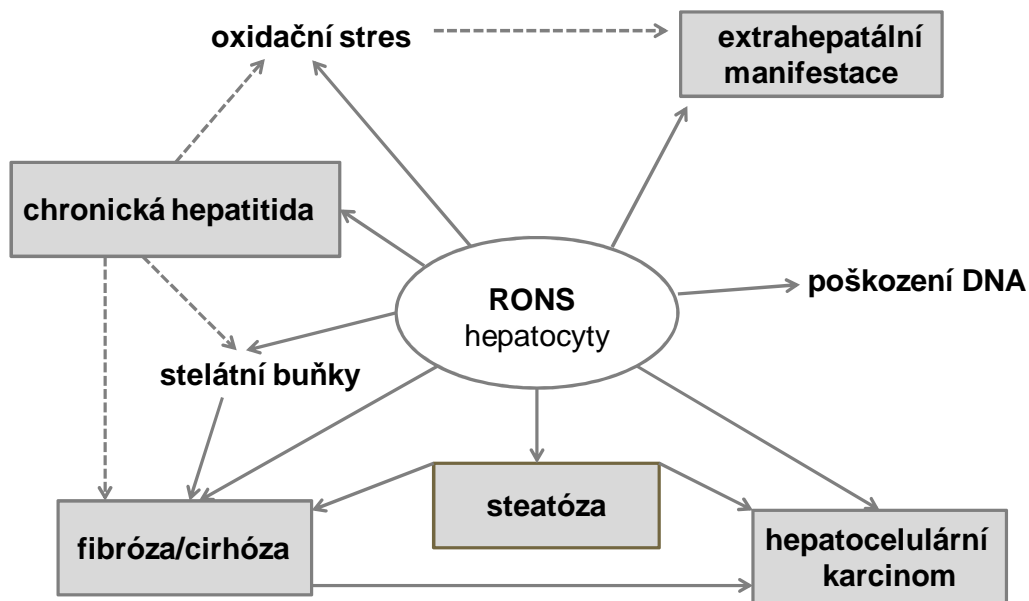
při kterých oxidativní stres, zánětlivá odpověď zprostředkovaná imunokompetentními buňkami a/nebo cytokiny spolu s aktivací hvězdicovitých buněk (HSC) aktivují fibrogenezi [164]. Oxidační stres hraje roli ve vývoji jaterní steatózy a její progresu do fibrózy u pacientů s virem hepatitidy C [164,165]. Významnou roli ve vývoji jaterní fibrózy asociované s HCV infekcí hraje syntéza kolagenu a TGF- $\beta$ , nejvýznamnějšího profibrogenního cytokinu indukovaného RONS. Profibrogenní efekt TGF- $\beta$  rovněž podporuje absence antioxidantů (snížení GSH). Oxidační stres může kromě syntézy TGF- $\beta$  indukovat proliferaci HSC a syntézu kolagenu [166]. U NS5A proteinu je popsána aktivace NF- $\kappa$ B, která dále aktivuje cyklooxygenázu-2 (COX-2), vedoucí ke zvýšené syntéze Prostaglandinu E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), který může inhibovat apoptózu nádorových buněk, indukovat jejich proliferaci a stimulovat angiogenezi [167]. ROS dále aktivují STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription). Aktivovaný STAT3 stimuluje buněčný růst, inhibuje apoptózu a chová se jako onkogen [168]. Nadbytek železa u některých pacientů s hepatitidou C může rovněž přispívat k jaternímu poškození [169]. Oxidační poškození DNA přispívá k vývoji HCV asociovaného HCC [170].

Oxidační stres u HCV může přispívat kromě jaterního poškození rovněž k extrahepatálním komplikacím. HCV infekce je často asociována s diabetem, hyperglykémie indukuje oxidativní stres a zvýšená produkce RONS vede k inzulinové rezistenci [171]. TNF- $\alpha$ , který zvyšuje produkci ROS, byl identifikován jako klíčová molekula, podílející se na vývoji diabetu během HCV infekce [172].

Dosud není zřejmé, jak RONS ovlivňují replikaci HCV. Bylo popsáno potlačení replikace HCV RNA *in vitro* narušením replikačního komplexu vlivem oxidativního stresu. Inhibice replikace je pravděpodobně zprostředkována volnými ionty kalcia a PGE<sub>2</sub> [167,169]. Studie *in vivo* dávají dosud nekonzistentní výsledky – snížení virové nálože bylo pozorováno v klinické

studii u použití kombinované antioxidační terapie u 25% pacientů. U 44% došlo rovněž k normalizaci jaterních enzymů [173]. V další studii virová nálož pozitivně korelovala s erytrocytálním malondialdehydem (MDA), produktem peroxidace lipidů, ne však s plazmatickým MDA [174]. Je tedy možné, že k redukcii virové nálože přispívají i antioxidanty, a že oxidanty i antioxidanty mohou mít různé efekty v různých fázích životního cyklu viru [13]. Biologické účinky RONS u HCV znázorňuje **Obrázek 6**.

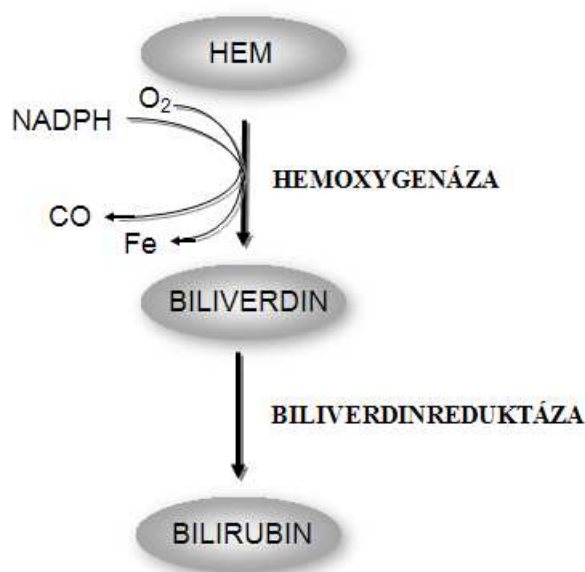
**Obrázek 6: Biologické efekty RONS u hepatitidy C**  
Upraveno podle [13]



## 1.4 Katabolická dráha hemu u hepatitidy C

Hemoxygenáza (HMOX) je jedním z enzymů katabolické dráhy hemu. Degraduje prooxidační hem na ekvimolární množství oxidu uhelnatého (CO), volné železo a biliverdin. Biliverdin je rychle metabolizován na bilirubin pomocí biliverdinreduktázy (BLVRA) [175]. Všechny tyto produkty jsou bioaktivní.

Obrázek 7: Katabolická dráha hemu



Existují dva strukturně podobné izoenzymy HMOX. Inducibilní HMOX1 (OMIM\*141250), označovaná též jako "heat shock protein 32" (HSP32) a konstitutivní HMOX2 (OMIM\*141251) [176].

Gen lidské HMOX1 je uložen na chromosomu 22q12. V oblasti proximálního promotoru tohoto lokusu byly identifikovány opakující se sekvence (variable number of tandem repeat, VNTR) guanin - thymin (GT)<sub>n</sub> [146]. Předpokládá se, že tyto vysoce polymorfní sekvence by mohly alterovat transkripční aktivitu. Čím více (GT)<sub>n</sub> sekvencí je v oblasti promotoru, tím nižší je transkripce HMOX1 genu. Již bylo prokázáno, že tento "dlouhý" polymorfismus je asociován s rozvojem ischemické choroby srdeční a celou řadou dalších onemocnění spojených se zvýšeným oxidačním stresem [177]. Během posledních let bylo popsáno, že

zvýšená enzymatická aktivita HMOX vede k antioxidačním, cytoprotektivním a neurotransmitterovým účinkům. HMOX hraje pravděpodobně i roli u protizánětlivých procesů [178,179]. Biliverdin a bilirubin vykazují silné antioxidační vlastnosti *in vitro* i *in vivo* [180-182]. Přechodné zvýšení koncentrací intracelulárního železa může spustit syntézu ferritinu vedoucí k využití silných cytoprotektivních vlastností, které mohou ovlivnit redox potenciál a genovou expresi v buňce. HMOX produkovaný CO má také anti-apoptotické a cytoprotektivní vlastnosti, moduluje genovou expresi vasokonstričních a zánětlivých procesů. Mezi jeho účinky patří i neurotransmise umožněná stimulací sGC aktivity [146,183-185]. V játrech mají izoenzymy HMOX1 a HMOX2 rozdílná místa exprese. HMOX1, inducibilní forma, je exprimována především v Kupferových buňkách, zatímco konstitutivní HMOX2 je nadměrně exprimována v hepatocytech [186]. *In vivo* indukce HMOX1 vede k ochraně myši před jaterním poškozením vyvolaným apoptózou. CO vznikající reakcí katalyzovanou HMOX je nezbytný pro udržení sinusoid v relaxovaném stavu pomocí mechanismů založených na sGC v hvězdicovitých buňkách (HSC) [186].

U potkanů vedl CO k zabránění vzniku rejekce štěpu a k ochraně před poškozením typu ischemie/reperfuze. Overexprese *HMOX1* v jaterní tkáni by také mohla mít silný protifibrogenetický účinek. Li et al [187] prokázali, že indukce *HMOX1* v lidských jaterních myofibroblastech zprostředkovává inhibici jejich proliferace a expresi prokolagenu I. Tyto účinky byly připisovány bilirubinu, jednomu z produktů degradace hemu. V další práci bylo na potkanech prokázáno, že stabilní exprese *HMOX1* potlačila fibrózu stejně jako transkripční hladiny kolagenu typu I a proliferační aktivitu HSC u tetrachlormethanem (CCl<sub>4</sub>) indukované cirhózy [187]. Yachie et al [188] zkoumali expresi *HMOX1* v PBMC během akutních zánětlivých onemocnění. Významně zvýšená mRNA *HMOX1* ukázala, že monocytární produkce HMOX1 by mohla účinkovat jako potentní protizánětlivý mediátor, který ovlivňuje vznik buněčného nebo tkáňového poškození v případech oxidačního stresu a při zvýšených

hladinách krevních cytokinů. Overexprese nebo indukce *HMOX1 in vitro* snižuje replikaci HCV a rovněž zvyšuje ochranu vůči oxidačnímu poškození [189]. Nicméně, exprese *HMOX1* v jaterní tkáni *in vivo* během HCV infekce je snížena. Ke stejným výsledkům vedou i experimenty *in vitro* [190,191]. Stejně tak byla exprese významně snížena u buněk hepatocelulárního karcinomu *in vitro*, které exprimovaly HCV Core protein. Podle imunohistochemického vyšetření byl tento pokles pozorován v hepatocytech, nikoliv v Kupferových buňkách. Oproti tomu Ghaziani et al. popsali indukci exprese *HMOX1* a downregulaci jejího regulátoru, Bach1, v přítomnosti HCV proteinů *in vitro* [192].

HMOX má klíčovou roli při tvorbě bilirubinu. Samotná jaterní exkrece bilirubinu je závislá na aktivitě bilirubin UDP-glukuronosyltransferázy (UGT1A1, OMIM \*191740). Gen lidské UGT1A1 je lokalizován na chromozomu 2q37. Genetické variace v genu *UGT1A1* byly rovněž popsány ve vztahu k mnoha patologickým stavům, na jejichž vzniku či rozvoji se podílí oxidační stres [193]. Nejvýznamnější z těchto variant se jeví polymorfismus promotoru genu *UGT1A1*, kde je různý výskyt repetitivních dinukleotidů thymin-adenin (TA)<sub>n</sub>. Výskyt alely (TA)<sub>7</sub> je asociován s nekonjugovanou hyperbilirubinemií. U genotypu TA 7/7 (*UGT1A1*\*28) může být typický obraz Gilbertova syndromu [182]. V posledních letech bylo publikováno mnoho studií ukazujících na antioxidační a protizánětlivý potenciál bilirubinu. Nízké hladiny bilirubinu byly naopak asociovány se zvýšeným rizikem vzniku nádorů, autoimunitních či vaskulárních a neurodegenerativních nemocí [181]. V obraně proti oxidačnímu stresu hraje rovněž důležitou roli BLVRA [180]. Existují 2 izofomy lidské BLVR, BLVRA (OMIM\*109750) a BLVRB (OMIM\*600941), produkty odlišných genů [194]. Gen lidské BLVRA je uložen na chromozomu 7p13, BLVRB na chromozomu 19q13. BLVRA reaguje účinněji s biliverdinem IX $\alpha$ , BLVRB redukuje biliverdin IX $\beta$ , IX $\gamma$  a IX $\delta$ . BLVRB převažuje v období fetálního vývoje, zatímco BLVRA v dospělosti [195]. Gen pro BLVR je pozitivně regulován oxidačním stresem a hypoxií, negativně TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) [196].



Byla popsána upregulace *BLVR* v ledvinných nádorových buňkách [197] a plicních makrofázích kuřáků s primárním spontánním pneumotoraxem [198] a rovněž v plazmě a lymfocytech (*BLVRA* i *BLVRB*) u pacientů s Alzheimerovou chorobou [199]. Byl rovněž popsán cytoprotektivní efekt *BLVRA* nezávislý na degradaci hemu [200,201]. *BLVRA* má kromě své redukční aktivity vůči biliverdinu mnoho dalších funkcí podle své lokalizace v buňce. V jádře účinkuje jako transkripční faktor a hraje tak důležitou roli v regulaci genů spojených se stresovou odpovědí včetně *HMOX1* [202-204] a *HMOX2* [205]. *BLVRA* patří rovněž mezi vzácné kinázy s duální specifitou, které se uplatňují v buněčné signalizaci [206]. *BLVRA* aktivuje signální dráhy IGF-1 (insulin/insulin growth factor) a MAPK (mitogen-activated protein kinase) [207] a přispívá tak k aktivaci transkripčního faktoru AP-1. Buněčnou odpověď na stres indukovaný virem hepatitidy C reguluje AP-1 signalizačními drahami, zahrnujícími například kinázy MAPK a JNK [208]. Byly popsány polymorfismy *BLVRA* asociované s hladinami bilirubinu v séru [209] a ischemickou chorobou srdeční [210,211], jaterní cirhózou [212] a cholestázou [213]. Tyto nové poznatky spolu s biliverdinem jako modulátorem buněčné signalizace a bilirubinem jako významným nitrobuněčným antioxidantem zdůrazňují význam *BLVRA* pro širokou škálu buněčných funkcí [214]. Nedávno byla prokázána inhibice virové replikace biliverdinem. Nakagami et al [215] popsal protivirovou aktivitu biliverdinu u HIV [216] a lidského herpetického viru typu 6 (HHV6). Lehmann et al. [217] zkoumal *in vitro* účinek jednotlivých produktů HMOX na replikaci HCV. Jeho studie v roce 2010 prokázaly, že s HCV replikací interferuje biliverdin indukci exprese protivirových interferonů. Huang et al. [123] prokázal vztah mezi genovou expresí v PBMC během prvních týdnů terapie PEG INF/RBV a eradikací HCV infekce a našel rovněž asociaci SVR se signifikantně vyššími hladinami *BLVRB*, embryonální formy *BLVR*, v týdnu 4 od započetí terapie. Expres *BLVRA* v játrech a PBMC u HCV infekce dosud nebyla popsána.

## **2 Hypotézy a cíle studie**

### **2.1 Studie A – Exprese HMOX a BLVRA**

**1. Charakterizovat expresi HMOX v PBMC a aktivitu HMOX v PBL u pacientů s chronickou hepatitidou C před zahájením protivirové terapie v porovnání se skupinou zdravých kontrol. Objasnit vztah mezi expresí a aktivitou HMOX a základními klinickými a virologickými charakteristikami HCV infekce. Charakterizovat změny aktivity a exprese HMOX během protivirové terapie v týdnech 12, 24, 36 a 48 od zahájení terapie a nalézt případnou asociaci s efektem protivirové terapie.**

Tato studie by měla potvrdit hypotézu, že HCV snižuje expresi HMOX1 v PBL podobně jako v játrech. Tato suprese indukovaná strukturními či nestrukturními proteiny HCV by měla korelovat s úrovní replikace viru v PBMC a s virémií. Je možné, že protivirová léčba zvýší expresi HMOX1 a že bazální exprese i exprese HMOX1 během protivirové terapie bude rozdílná u pacientů na léčbu odpovídajících (SVR) a neodpovídajících či rezistentních (NVR). Tato studie by měla ukázat vztah mezi chronickou HCV infekcí a regulací exprese HMOX v PBL, který dosud nebyl zkoumán.

**2. Charakterizovat expresi BLVRA v PBL u pacientů s chronickou hepatitidou C v porovnání se skupinou zdravých kontrol. Charakterizovat změny exprese BLVRA během protivirové terapie v týdnech 12, 24, 36 a 48 od zahájení terapie s cílem nalézt případnou asociaci s efektem protivirové terapie.**

Na základě poznatku, že biliverdin *in vitro* inhibuje NS3/4A proteázu, by tato studie mohla potvrdit hypotézu, že snížená exprese BLVRA (a tedy vyšší hladina biliverdinu) interferuje s replikací viru rovněž v PBL. Exprese BLVRA v PBL by mohla korelovat přímo s HCV RNA v PBL a lišit se u pacientů na léčbu odpovídajících (SVR) a rezistentních (NVR).

### **3. Charakterizovat expresi *HMOX* a *BLVRA* v jaterní tkáni pacientů s chronickou hepatitidou C ve srovnání s expresí v krvi.**

Tato studie by měla potvrdit hypotézu, že exprese *HMOX* a *BLVRA* v jaterní tkáni u HCV infikovaných pacientů koreluje s úrovní replikace viru v jaterní tkáni a tudíž i s virémií. Vzhledem k poznatku, že zvýšená exprese *HMOX1* v jaterních myofibroblastech a v HSC má velký protifibrotický a protizánětlivý potenciál, snížená exprese *HMOX1* v jaterní tkáni by měla korelovat s vývojem fibrózy a zánětem jaterní tkáně. Pokud by exprese *HMOX* i *BLVRA* v jaterní tkáni korelovala s expresí v PBL, znamenala by analýza exprese těchto genů pro pacienta významně menší zátěž v porovnání s analýzou jaterní biopsie.

## **2.2 Studie B – Polymorfismy *HMOX* a *UGT1A1***

### **1. Studovat varianty polymorfismu rs 1805173 v promotoru genu pro *HMOX1* u pacientů s chronickou HCV infekcí a objasnit jejich možnou asociaci s progresí jaterního poškození a rovněž s odpovědí na terapii u HCV infikovaných pacientů.**

Tato studie by měla potvrdit hypotézu, že polymorfismy *HMOX1* jsou zodpovědné za změněnou expresi a/nebo aktivitu *HMOX*. Polymorfismus zodpovědný za nižší expresi *HMOX1* by mohl být příčinou rozvoje rozdílně závažné fibrózy (staging) a zánětu (grading) ve vztahu k rozdílné délce trvání infekce a nižšího efektu protivirové terapie.

### **2. Studovat polymorfismus rs 81753472 v promotoru genu pro *UGT1A1* u pacientů s chronickou HCV infekcí. Zjistit, zda genetická predispozice (nepřítomnost polymorfismu *UGT1A1\*28*) může být asociována s HCV infekcí, jejím průběhem,**

**odpovědí na terapii a zda může být rizikovým faktorem pro rozvoj fibrózy/cirhózy u HCV infikovaných pacientů.**

Polymorfismus UGT1A1\*28, který je zodpovědný za rozvoj benigní hyperbilirubinémie, je spojený s nízkou prevalencí onemocnění asociovaných s oxidačním stresem. Tato studie by měla potvrdit hypotézu, že jedinci s HCV infekcí mohou mít nižší frekvenci tohoto polymorfismu, popř. těžší průběh či horší odpověď na terapii, než jedinci s přítomností tohoto polymorfismu.

## 3 Metodická část

### 3.1 Soubor pacientů a kontrol

Studie byla provedena v souladu s principy Helsinské deklarace, protokol studie byl odsouhlasen etickou komisí 1.LF UK a etickou komisí Ústřední vojenské nemocnice Praha. Všechny osoby zařazené do studie podepsaly informovaný souhlas, studie byla registrována v mezinárodní databázi [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).

Do studie byli během let trvání projektu zahrnuti pacienti splňující základní kritéria stanovení diagnózy chronické HCV infekce (anti-HCV a HCV RNA pozitivita po dobu prokazatelně delší nežli 6 měsíců). Soubor pro analýzu genové exprese tvořili terapeuticky naivní pacienti s následnou standardní protivirovou terapií (PEG-IFN a RBV) dle doporučení AASLD/EASL a ČHS [218,219]: 1) PEG-IFN alpha 2a (Pegasys, Roche, Switzerland): 180  $\mu$ g + 1x týdně + RBV (Copegus, Roche, Switzerland ) 1000 - 1200 mg denně, podle hmotnosti (1000 mg  $\leq$  75 kg, 1200 mg > 75 kg); a 2) PEG-IFN alpha-2b (Schering-Plough CEAG): 1.5  $\mu$ g/kg hmotnosti 1x týdně + RBV (Rebetol, Schering-Plough CEAG): 1000 - 1200 mg denně, podle hmotnosti (1000 mg  $\leq$  75 kg, 1200 mg > 75 kg).

Do souboru pro stanovení polymorfismů byli zahrnuti pacienti před zahájením, během či po skončení protivirové terapie. Zařazeny byly dále osoby, které absolvovaly necílenou jaterní biopsii a histologické hodnocení prokázalo nález kompatibilní se základní diagnózou chronické HCV infekce. Pro některá hodnocení provedená v rámci projektu byly zařazeny i osoby bez provedené jaterní biopsie. Jaterní biopsie nebyla vyžadována u osob s klinicky jasnou jaterní cirhózou. Za známky jaterní cirhózy byla v těchto případech považována trombocytopenie a dekompenzace portální či metabolická.

Kontrolní skupina osob pro analýzu genové exprese v jaterní tkáni byla tvořena pacienty s jiným jaterním onemocněním (steatóza, NASH, PSC, NAFLD, cholestáza, metabolická jaterní onemocnění), kteří byli bioptováni. Ani u těchto pacientů nebyla jaterní

biopsie nadbytečným zatížením, protože u výše jmenovaných onemocnění je odběr jaterní biopsie standardní součástí vyšetřovacího programu, stejně jako u pacientů s HCV infekcí. Kontrolní skupina pro stanovení genové exprese v PBL byla tvořena zdravými dobrovolníky z VFN a 1. LF UK. Kontrolní skupina pro analýzu polymorfismů byla tvořena zdravými dárci krve, jejichž genomovou DNA disponujeme v rámci naší databáze DNA.

**Tabulka 5: Základní charakteristiky terapeuticky naivních pacientů**

Data jsou vyjádřena jako průměr±standardní odchylka (SD), nebo medián (rozmezí). \*p- rozdíl mezi SVR a NVR.

	HCV (N=58)	SVR (N=38)	NVR (N=20)	P*
Pohlaví (M:Ž)	1,2	1,0	1,9	0,28
Věk (roky)	45,0(38,0-53,8)	43,5(37,3-51,8)	46,0(43,5-54,0)	0,22
Virémie (log IU/ml)	6,05±0,67	6,05±0,45	6,05±0,50	0,98
HCV (-ss) RNA v PBL (%)	93	88	100	0,86
Genotyp HCV 1 (%)	84	76	94	0,20
Genotyp <i>IL28B</i> (rs12979860) CC (%)	37	44	22	0,11
Grading – jaterní biopsie	5(4-5)	5(3-5)	4,5(4-6)	0,36
Staging – jaterní biopsie	1(1-3)	1(1-2)	3(1-5)	0,03
Celkový bilirubin (μmol/l)	15,9(12,4-19,4)	15,0(11,4-20,6)	16,7(14,6-18,3)	0,66
ALT (μkat/l)	0,97(0,77-1,80)	0,93(0,76-1,39)	1,08(0,85-2,19)	0,95
AST (μkat/l)	0,67(0,53-1,21)	0,63(0,49-1,25)	0,79(0,58-1,13)	0,71
ALP (μkat/l)	1,28(0,99-1,95)	1,28(1,05-2,02)	1,32(0,99-1,83)	0,19
GGT (μkat/l)	0,68(0,49-1,76)	0,57(0,41-1,69)	1,15(0,66-1,96)	0,73
Hemoglobin (g/l)	146,9±16,6	143,5±17,0	153,4±14,1	0,02
Trombocyty x 10 <sup>9</sup> /l	195,5±63,4	205,5±66,4	177,0±54,1	0,08

### **3.2 Odběr a uchovávání vzorků**

**Jaterní biopsie** byla prováděna standardní perkutánní aspirační technikou modifikovanou Menghiniho jehlou nebo aspirační technikou transjugulárním přístupem. Do studie byly zařazeny vzorky jaterních biopsií u pacientů, kde byl odběr biopsie součástí vyšetřovacího procesu pacientů s chronickou HCV infekcí. Do studie nebyl zařazen žádný vzorek jaterní biopsie mimo terapeutický protokol. Část jaterní tkáně byla bezprostředně po odběru uložena do RNAlateru (Ambion Diagnostics, Austin, USA) a po homogenizaci (MagNa Lyser System Roche, Germany) byl lyzát uchováván při  $-80^{\circ}\text{C}$  k izolaci celkové RNA. Další část vzorku tkáně byla bezprostředně po odběru uložena do 10% formalinu k histologickému vyšetření a k imunohistochemické analýze. Hodnocení gradingu a stagingu podle Ishaka [220] bylo provedeno dle zavedeného postupu [220]. **Imunohistochemie:** vyšetření k identifikaci buněk exprimujících HMOX byla prováděna v ÚVN za standardních podmínek při použití primárních protilátek namířených proti HMOX.

**Vzorky krve** pro genovou expresi byly sbírány do PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland) a uchovávány při  $-20^{\circ}\text{C}$  a po 24 hod při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Vzorky krve pro aktivitu HMOX byly sbírány do odběrových zkumavek s EDTA Vacutainer (BD Vacutainer, NJ, USA), do 5 hodin od odběru byly izolovány PBMC hustotním gradientem (Ficoll) a dále uchovávány ve fosfátovém pufru při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ze séra byly stanoveny markery jaterního poškození (ALT, AST, GGT, ALP) a bilirubin rutinní analýzou na automatickém analyzátoru (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). HCV RNA v séru byla kvantifikována systémem Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan (detekční limit 15 IU/ml) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). HCV genotypy byly analyzovány soupravou VERSANT HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) (Siemens Healthcare Diagnostics, Camberley, UK). Vzorky krve pro izolaci DNA byly sbírány do odběrových zkumavek s EDTA a uchovávány při  $-20^{\circ}\text{C}$ .



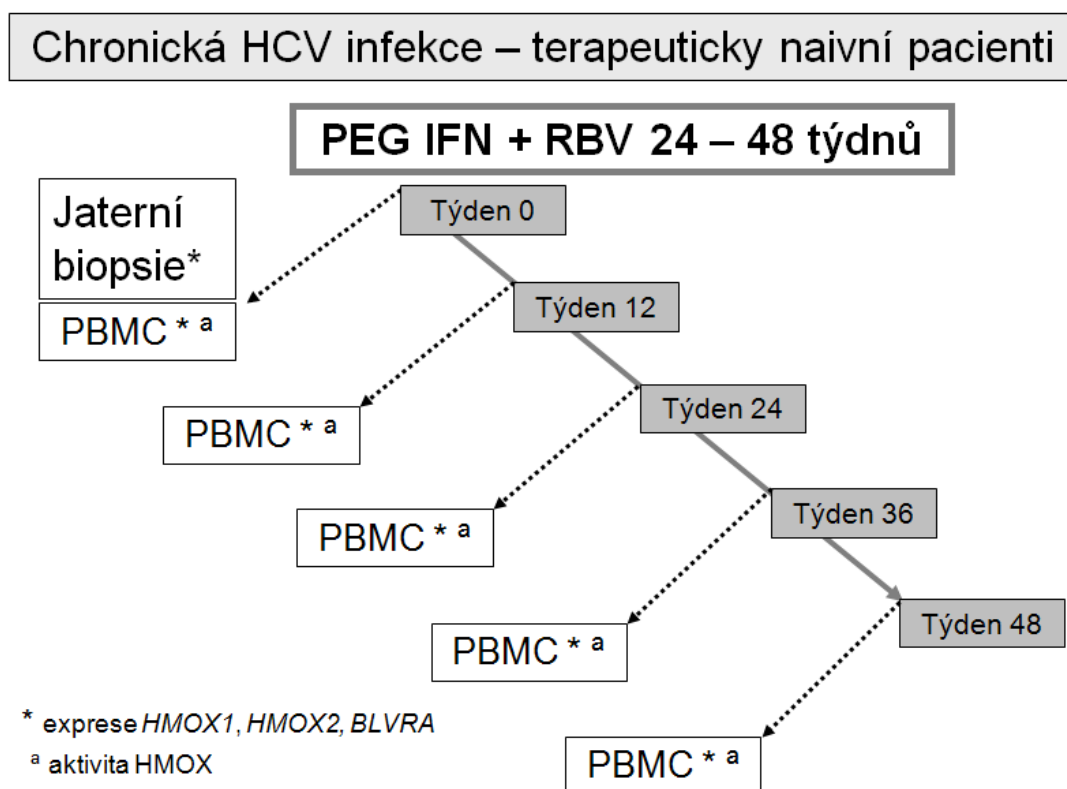
### 3.3 Design studie

#### 3.3.1 Studie A - Exprese HMOX a BLVRA

Typ: Observační, prospektivní, srovnávací studie

- **Počet kontrol:** 55 (PBMC/PBL – zdraví dobrovolníci)  
31 (játerní biopsie – HCV negativní pacienti podstupující odběr biopsie s minimálními histologickými změnami a jiným nezápřítivým onemocněním)
- **Počet pacientů:** 58 terapeuticky naivních HCV infikovaných pacientů splňujících základní kritéria stanovení diagnózy chronické HCV infekce (anti-HCV a HCV RNA pozitivita po dobu prokazatelně delší nežli 6 měsíců) s následnou standardní protivirovou léčbou (PEG INF+RBV)  
Inkluzní kritéria: pozitivita anti-HCV a HCV RNA déle než 6 měsíců  
Exkluzní kritéria: Koinfekce HBV, HIV; poruchy metabolismu hemu (porfyrie).

Obrázek 8: Design studie A



**Metodika:** aktivita HMOX a relativní exprese *HMOX1*, *HMOX2*, *BLVRA*

**Materiál:** jaterní biopsie, PBMC (mononukleáry periferní krve)/PBL(periferní leukocyty)

**Doba studie:** 2007 – 2012

**Harmonogram:**

- Expresse *HMOX* a *BLVRA* v jaterní biopsii před zahájením terapie
- Expresse/aktivita *HMOX* v PBMC/PBL a *BLVRA* v PBL v týdnech 0, 12, 24, 36 a 48 od zahájení standardní protivirové terapie.

### 3.3.2 Studie B - Polymorfismy *HMOX* a *UGT1A1*

**Typ:** Asociační studie typu „case-control“

- **Počet kontrol:** 146 zdravých dárců krve, jejichž genomovou DNA disponujeme v rámci naší databáze DNA.
- **Počet pacientů:** 146 HCV infikovaných pacientů před zahájením, během či po skončení protivirové terapie. Zařazeny byly dále osoby, které absolvovaly necílenou jaterní biopsii a histologické hodnocení prokázalo nález kompatibilní se základní diagnózou chronické HCV infekce. Jaterní biopsie nebyla vyžadována u osob s klinicky jasnou jaterní cirhózou.

Inkluzní kritéria: HCV infekce před, v průběhu nebo pacienti po ukončení standardní protivirové terapie

Exkluzní kritéria: Koinfekce HBV, HIV

**Metodika:** Fragmentační analýza (TA)<sub>n</sub> varianty *UGT1A1* (rs 81753472)

(GT)<sub>n</sub> varianty *HMOX1* (rs 1805173)

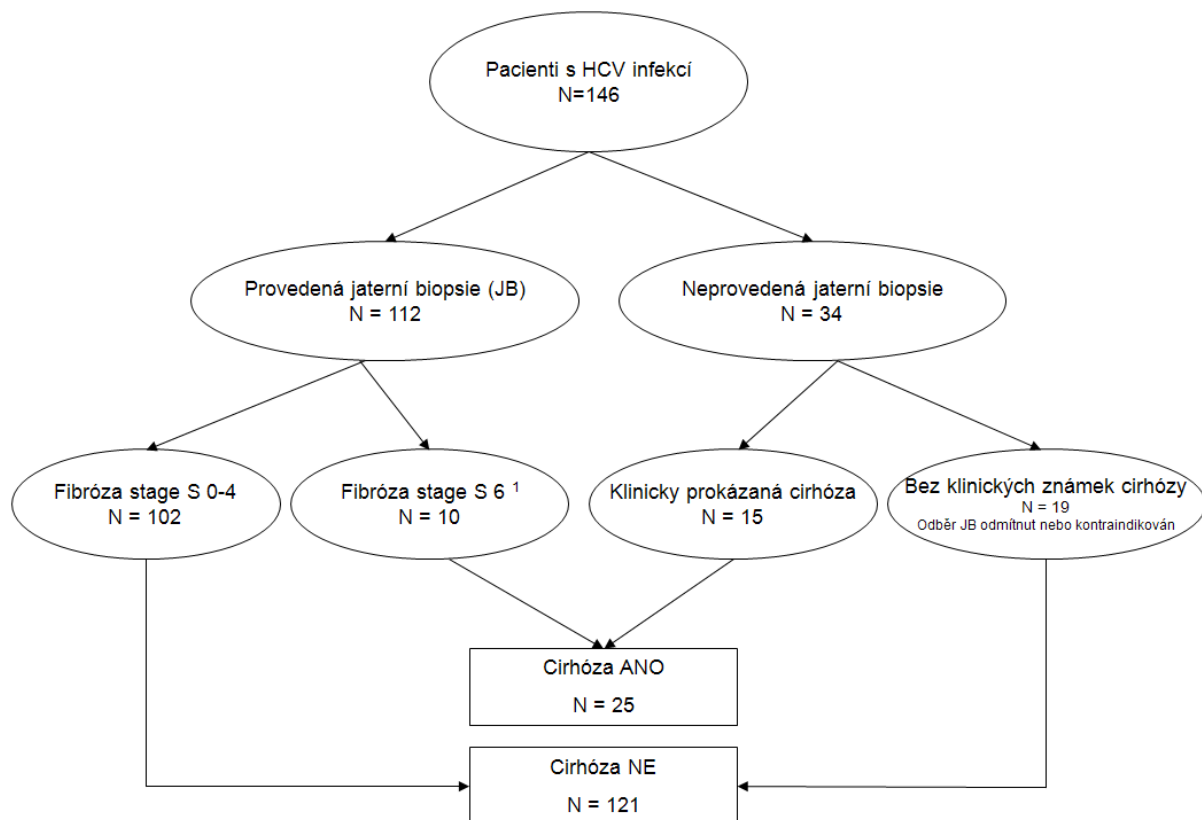
**Materiál:** Krev, jaterní biopsie (histologické vyšetření)

**Doba studie:** 2007 – 2010

Harmonogram:

- Odběr krve na fragmentační analýzu polymorfismů *HMOX* a *UGT1A1* (n=146)
- Odběr vzorků jaterní biopsie pro histologické vyšetření (grading, staging) (n=112)

Obrázek 9: Design studie B



### 3.4 Přístroje a chemikálie

#### Přístroje

- MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, SRN)
- Centrifuga Beckman GPR (Beckman, Fullerton, CA, USA)
- Centrifuga Jouan MR23i (Trigon-plus, Praha, ČR)
- Sonikátor XL (Microsonix incorporated, Farmingdale, NY, USA)
- Elektroforéza Power Pack 1000 (BioRAD, Benicia, CA, USA)
- UV transiluminátor Camag Reprostar 3 (Camag, Muttenz, Switzerland)
- RGA analyzátoru Reduction Gas Analyzer (AMETEK Process Instrument, Newark, DE, USA)
- Spektrofotometr ND-1000, NanoDrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)
- Termocykler TC-512 (Techne, Burlington, NJ, USA)
- RealTime system ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Sekvenátor *CEQ<sup>TM</sup> 8000* Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)

#### Reagencie:

#### Aktivita HMOX

*Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), *Hemin* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Nikotinamidadenindinukleotidfosfát* (NADPH, Sigma, St. Louis, MO, USA), *Kyselina sulfosalicylová* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Dihydrogenfosforečnan draselný* ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Penta, Praha, ČR), *Fosforečnan disodný* ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Penta, Praha, ČR), *Trypan blue solution* (Sigma, St. Louis, MO, USA).

### **Izolace RNA**

*Ethanol, 96%, (v/v)* (Penta, Praha, ČR), *Keramické částice* (MagNA Lyser Green Beads, Roche GmbH, Německo), *PAXgene Blood RNA Tubes* (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland), *PAXgene kit* (Qiagen, Dallas, TX, USA), *RNA later* (Ambion Diagnostics, Austin, TX, USA), *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Dallas, TX, USA), *Rnase-Free DNase set* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **Elektroforéza**

*Tris(hydroxymethyl)aminomethane, p.a.* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Agaróza* (Eliphore, Alisabeth Pharmacon, Brno, ČR), *Disodná sůl kyseliny ethylendiamin-tetraoctové Na<sub>2</sub>EDTA, p.a.* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Gene Ruler 50 bp DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH, USA), *Ethidiumbromid 10 mg/ml* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Gel loading buffer* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Kyselina boritá p.a.* (Penta, Praha, ČR).

### **Reverzní transkripce**

*Molecular Biology Grade Water* (Eliphore, Alisabeth Pharmacon, Brno, ČR), *High-Capacity cDNA kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), *RNase Inhibitor 5000 IU* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), *Rnase Out Inhibitor 5000 U* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), *Ribonuclease H* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), *RnaseZapSolution* (Ambion, Foster City, CA, USA), *ThermoScript™ Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### **PCR**

*Primery* (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR), *PCR buffer* (Fermentas Inc, Glen Burnie, Maryland, USA), *dTP Mix* (Fermentas Inc, Glen Burnie, Maryland, USA), *MgSO<sub>4</sub>* (Fermentas Inc, Glen Burnie, Maryland, USA), *MgCl<sub>2</sub>* (Fermentas Inc, Glen Burnie,

Maryland, USA, *Taq polymeráza* (0,63/25 µl) (Fermentas Inc, Glen Burnie, Maryland, USA Fermentas), *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),  
*2x SYBR Green Master Mix buffer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

### **Izolace DNA**

*Dodecylsírán sodný SDS, p.a.* (Serva GmbH, Heidelberg, Germany), *Ethanol, 96% (v/v)* (Penta, Praha, ČR), *Chlorid sodný, p.a.* (Penta, Praha, ČR), *Izopropanol, p.a.* (Penta, Praha, ČR), *Glycerol* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Chlorid vápenatý, p.a.* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Izopropylalkohol* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA, p.a.* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, p.a.* (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Proteinkináza K* (Chemos, Praha, ČR).

### **Fragmentační analýza**

*Pfu DNA polymerase (2,5 IU/µl)* (Fermentas Inc, Glen Burnie, Maryland, USA), *WellRED fluorescent dyes* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), *Sample Loading Solution* (Beckman Coulter), *CEQ DNA Size Standard* (Beckman Coulter Fullerton, CA, USA),  
*DNase/RNase-free H2O O'GeneRuler™ 50bp/100 bp DNA standard* (Fermentas, Inc, Glen Burnie, Maryland, USA USA), *Oligonukleotidové sondy(primery) pro PCR a sekvenování DNA* (Generi Biotech, Hradec králové, ČR), *Genome Lab™ DTCS –Quick Start Kit* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), *Genome Lab™ Separací gel* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)

### **Polymorfismus IL28B**

*MagNA Pure Compact Nucleic acid isolation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), *LightMix Kit IL28B* (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Germany).

## 3.5 Analytické metody

### 3.5.1 Zavedení metody na stanovení aktivity HMOX v PBMC

#### 3.5.1.1 Izolace PBMC

PBMC byly izolovány z nesrážlivé krve centrifugací s hustotním gradientem *Ficoll-Paque<sup>TM</sup>*.

**Princip metody:** Granulocyty a erytrocyty pronikají během centrifugace skrze separační médium na dno zkumavky, PBMC zůstávají v buffy coatu mezi vrstvou plazmy a separačního média.

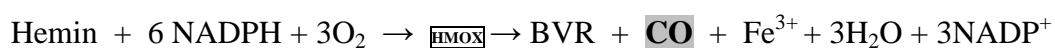
**Postup:**

1. Krev se navrství pasturovou pipetou do 15 ml sterilní zkumavky s 5 ml Ficoll-Paque tak, aby se neporušila vrstva média (obsah se nesmí smíchat).
2. Zkumavka se centrifuguje při laboratorní teplotě 1800 rpm/20min.
3. Ze zkumavky se odebere 2/3 plazmy, do další 15 ml sterilní zkumavky se sesbírá buffy coat z rozhraní plazmy a Ficollu.
5. Zkumavka s buffy coatem se se doplní do objemu 10 ml fyziologickým roztokem a centrifuguje 10 min při 1800 ot/min.
6. Peleta se rozpustí v 200  $\mu$ l 0,1M  $K_3PO_4$  (pH 7,4). Odebere se alikvot 5  $\mu$ l do 95  $\mu$ l fyziologického roztoku, 20  $\mu$ l alikvotu se naředí naředit 2 x a v Bürkerově komůrce se spočítají buňky.
7. Z výsledného počtu buněk se spočítá množství vzorku do reakce (20 milionů buněk na reakci).
8. Před měřením se buňky lyzují sonikací, vzorek se do stanovení uchovává na ledu.

### 3.5.1.2 Plynová chromatografie

Aktivita HMOX byla stanovena v homogenátu PBMC nově zavednou metodou modifikovanou dle metody pro stanovení CO ve tkáních [221].

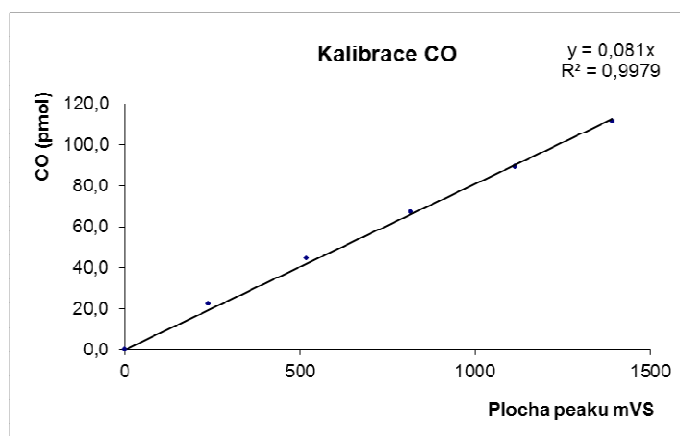
**Princip metody:** Aktivita HMOX vyjádřená v pmol CO/h/10<sup>6</sup> buněk je určena kvantifikací produkce CO, vznikajícího oxidací hemu za účasti HMOX a přímo úměrného množství vznikající plynné rtuti detekované RGA detektorem.



#### Postup:

20  $\mu\text{l}$  sonikátu (2 miliony buněk na reakci) se inkubuje 15 min při 37 °C ve směsi s 20  $\mu\text{l}$  heminu (150  $\mu\text{M}$ ) a 20  $\mu\text{l}$  4,5 mM NADPH ve vzduchotěsné vialce zbavené CO. Reakce je ukončena denturací 30% (w/v) kyselinou sulfosalicylovou. Uvolněný CO do prostoru nad roztokem je oddělen od jiných potenciálně redukujících plynů (vodík) syntetickým vzduchem bez CO na koloně naplněné molekulárním sítem. CO prochází redukčním detektorem, obsahujícím pevný oxid rtuťnatý (katalyzátor oxid manganatý). Během oxidace CO na CO<sub>2</sub> a vodíku na H<sub>2</sub>O je uvolňována plynná rtuť, jejíž koncentrace je detekována UV detektorem (254 nm). Díky vysoké molární absorptivitě rtuťi v UV oblasti je tato metodika vysoce citlivá (pmol CO)-viz kalibrační křivka (Obrázek 10).

Obrázek 10: Kalibrace CO pro stanovení aktivity HMOX metodou GC





## 3.5.2 Zavedení metod na analýzu genové exprese a HCV RNA

### 3.5.2.1 Izolace RNA

#### 3.5.2.1.1 *Jaterní biopsie*

**Homogenizace jaterní tkáně:** Vzorek jaterní biopsie byl po rozmrazení přenesen z RNA lateru a do zkumavky s keramickými částicemi (MagNA Lyser Green Beads) s 500  $\mu$ l lyzačního pufru (Buffer RLT, součástí kitu RNeasy Mini Kit). Vzorky jaterní tkáně byly homogenizovány 10s při 6500 ot na přístroji MagNA Lyser (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, SRN).

**Izolace RNA:** RNA byla izolována z homogenátu jaterní tkáně kitem (RNeasy Mini Kit, Qiagen, USA). Integrita RNA byla kontrolována elektroforeticky. Kvalita a kvantita byla kontrolována spektrofotometricky. Poměr R260 nm/280 nm byl použit k posouzení čistoty vzorků.

#### 3.5.2.1.2 *PBL*

RNA byla po rozmražení krve uchovávané v PAXgene Blood RNA Tubes izolována pomocí kitu PAXgene kit. Integrita RNA byla kontrolována elektroforeticky. Kvalita a kvantita byla kontrolována spektrofotometricky. Poměr R260 nm/280 nm byl použit k posouzení čistoty vzorků.

### 3.5.2.1 RealTime RT PCR

#### 3.5.2.1.1 Optimalizace reverzní transkripce (RT)

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly RNA do DNA. Reverzní transkripcí získáme molekulu DNA, která je označována jako cDNA (complementary DNA).

Byly použity 2 soupravy:

- Se specifickými primery: ThermoScript™ Reverse Transcriptase (Invitrogen) – syntéza cDNA probíhá při teplotě 55°C, souprava deklaruje vyšší výtěžnost a specifitu i u produktů s velikostí od 100 bp do 12 kb. Pro analýzu HCV RNA.
- S random hexamery: High-Capacity cDNA kit (Applied Biosystems) – syntéza cDNA probíhá při 37° C. Pro analýzu genové exprese.

#### Postup RT se specifickými primery (HCV RNA pozitivní a negativní polarity)

Současně s HCV RNA pozitivní polarity (**HCV +ssRNA**) v jaterní tkáni a PBL jsme analyzovali rovněž řetězce negativní polarity (**HCV –ssRNA**) v PBL, jejichž průkaz je markerem aktivní replikace viru. Postup pro RT a sekvenci specifických „tagovaných“ primerů – označený řetězec (**taq** sekvence) při reverzní transkripci umožní jeho následné specifické stanovení při qPCR bez rizika detekce negativních řetězců vzniklých během samotné amplifikace, jsme převzali z literatury [222].

Specifické primery do RT[222]:

pro HCV RNA (-ssRNA):

**taq** RC1                      **ggcgcgcatggtggcgaataa****GTCTAGCCATGGCGTTAGTA**

pro HCV RNA (+ssRNA):

RC21+                      **CTCCCGGGGCACTCGCAAGC**

Syntéza cDNA probíhá v jedné reakci.

Výsledný PCR produkt pro HCV RNA pozitivní polarity (246 bp):

**GTCTAGCCATGGCGTTAGTA**TGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCAT  
AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGATAAAC  
CCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCG  
AAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGT**GCTTGCAGTGCCCCGGGAG**

Výsledný PCR produkt pro HCV RNA negativní polarity (delší o taq sekvenci) (267 bp):

ggcgcgcatggtggcgaataa**GTCTAGCCATGGCGTTAGTA**TGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCT  
CCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCT  
CTTTCTTGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAG  
TAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGT**GCTTGCAGTGCCCCGGGAG**

Podmínky RT:

RNA denaturace 65°C 8 min

Zchlazení (led) 1 min

**Reakční směs** (celkový objem 20 µl):

- 2,0 µl dNTP mix (10 mM)
- 1,6 µl Primer taq-RC1 (10 µM)
- 1,6 µl Primer RC21+ (10 µM)
- 5,3 µl Nuclease-free H<sub>2</sub>O
- 1,5 µl RNA (30 ng/µl)

Inkubace 65°C 5 min

Zchlazení (led) 1 min

Centrifugace pulzně

- 4 µl cDNA Synthesis Buffer (5x)
- 1 µl DTT (0,1 M)
- 1,0 µl Thermoscript Reverse transcriptase (15 IU/ µl)
- 1,0 µl RNase Out Inhibitor (40 IU/ µl)
- 1,0 µl Nuclease-free H<sub>2</sub>O

Inkubace 60°C 60 min

Zastavení reakce 85 °C 5 min

- 1 µl RNase H (2U)

Inkubace 37°C 20 min

Vzorky cDNA byly naředěny 5x a uchovány při -20 C.

Postup RT s random hexamery (stanovení genové exprese):

Syntéza cDNA byla provedena soupravou High-Capacity cDNA kit podle protokolu doporučeného výrobcem. Doporučené množství RNA udává výrobce kitu 0,02 – 2 µg.

Byla provedena optimalizace množství RNA do reverzní transkripce v rozmezí od 0,05 – 0,9 µg RNA/20 µl reakční směsi (**Tabulka 6**):

**Tabulka 6: Optimalizace množství RNA do reverzní transkripce**

µg RNA/20 µl reakční směsi	Koncentrace cDNA µg/ml	Cycle treshold (qPCR)
0,9	1770	23,47
0,8	1700	23,80
0,7	1730	23,96
0,6	1726	24,15
<b>0,5</b>	<b>1665</b>	<b>24,43</b>
0,4	1670	24,50
0,3	1775	24,67
0,2	1665	25,00
0,1	1645	25,34
0,05	1425	26,10

Na přípravu cDNA bylo použito 0,5 µg RNA/20 µl reakční směsi.

Reakční směs (celkový objem 20 µl)

- 2 µl 10x RT Buffer
- 0,8 µl dNTP mix (100 mM)
- 2,0 µl 10x RT Random Primers
- 1,0 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase
- 1,0 µl RNase Inhibitor
- 7,2 µl Nuclease-free H<sub>2</sub>O
- 6,0 µl RNA (30 ng/µl)

Teplotní profil:

10 min 25°C  
120 min 37°C  
5 s 85°C

Vzorky cDNA byly naředěny vodou (5x) a skladovány při -20 °C.

Pro porovnání obou souprav byla testována výtěžnost (**Tabulka 7**) a návaznost (**Tabulka 8**)

**Tabulka 7: Testování výtěžnosti RT**

Vzorek jaterní biopsie HCV pozitivní	Invitrogen Koncentrace cDNA(+ss) (ng/μl)	Applera Koncentrace cDNA(+ss) (ng/μl)
1	2096	2369
2	2095	2089
3	2141	2291
4	1908	2239
5	1698	2347
6	1933	2408
7	2095	2342
8	2466	2379
9	1905	2341
10	2063	2369

Do RT bylo použito 500 ng RNA.

Závěr: Výtěžnost RT testovaných souprav byla srovnatelná.

**Tabulka 8: Testování návaznosti RT Applera a Invitrogen**

Jaterní biopsie HCV pozitivní	Cycle treshold HCV +ss Invitrogen -duplikáty	Cycle treshold HCV +ss Applera -duplikáty	Delta $c_t$
1	27,50/27,40	26,90/26,97	0,54
2	25,15/25,43	24,0/24,33	1,12
3	>30	>30	-
4	>30	>30	-
5	24,48/24,40	23,22/23,26	0,20
6	27,27/27,24	26,38/26,46	0,58
7	27,88/27,87	27,46/27,50	0,40
8	>30	>30	-
9	26,57/26,74	27,25/27,41	0,67
10	23,73/27,7	24,03/24,21	1,60

Do PCR bylo použito 4 μl 5x ředěné cDNA.

Závěr: Mezi testovými metodami byl rozdíl  $\Delta c_t \leq 1,6$ . Byla potvrzena návaznost testovaných souprav.

### 3.5.2.1.2 Návrh primerů pro qPCR

#### **Stanovení HCV RNA**

Sekvence primerů (Tabulka 9) byly získány z literatury [222]

**Tabulka 9: Sekvence primerů pro HCV RNA**

	Forward primer	Reverse primer	Fragment (bp)
HCV+ssRNA	GTCTAGCCATGGCGTTAGTA	CTCCCGGGGCACTCGCAAGC	246
HCV-ssRNA	GGCCGTCATGGTGGCGAATAA	CTCCCGGGGCACTCGCAAGC	267

**Studium genové exprese:**

Sekvence genů byla získána z GeneBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Primery (Tabulka 10) byly navrženy programem: Primer 3: <http://frodo.wi.mit.edu/>

Porovnání sekvencí DNA bylo provedeno programem: BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Tabulka 10: Sekvence primerů pro genovou expresi**

	Forward primer	Reverse primer	Fragment (bp)
<i>HMOX1</i>	GGGTGATAGAAGAGGCCAAGA	AGCTCCTGCAACTCCTCAA	67
<i>HMOX2</i>	GAAGGAAGGGACCAAGGAAG	CTCCTCGAGGGCTGAGTATG	139
<i>BLVRA</i>	TCCCTCTTTGGGGAGCTTTC	GGACCCAGACTTGAAATGGAAG	180
<i>GAPD</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87
<i>18S rRNA</i>	TAACCCGTTGAACCCCATTC	GGGCAGGGACTTAATCAACG	114
<i>UBC</i>	ATTTGGGTGCGGTTCTTG	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	*
<i>HPRT</i>	CACTGGCAAAACAATGCAGAC	GGGTCCTTTTCACCAGCAAG	92

\*Vandesompele J [223]

Pro testované geny a HCV RNA byla testována optimalizace koncentrace primerů.

Byly testovány koncentrace 50, 300 a 900 nM a jejich vzájemné kombinace (Tabulka 11).

**Tabulka 11: Optimalizace koncentrace primerů do qPCR**

1. výběr	Forward primer (nM)		
Reverse Primer (nM)	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

2. výběr	Forward primer (nM)		
Reverse Primer (nM)	100	200	300
100	100/100	200/100	300/100
200	100/200	200/200	300/200
300	100/300	200/300	300/300

Závěr: Dle výsledků  $c_T$  byla zvolena **koncentrace primerů 200 nM** (minimální koncentrace primerů při maximální  $\Delta R_N$  a minimální  $c_T$ ).

### 3.5.2.1.3 Validace qPCR

#### Příprava linearizovaného plazmidu pro qPCR

Pro validaci metodiky na stanovení HCV RNA byl použit linearizovaný plazmid. Byla optimalizovaná PCR pro přípravu amplikonu (HCV + ssRNA , HCV –ssRNA) k zaklonování do plazmidu:


Optimalizace Mg<sup>2+</sup>: 5 vzorků o koncentraci Mg 1, 2, 3, 4, 5 mM/25 μl

Optimalizace teploty annealingu: gradient Ta 54,3 – 66,6°C

#### Reakční směs (celkový objem 25 μl)

- 2,5 μl PCR pufr (10x)
- 1-5 μl MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 2,5 μl dNTP (2mM)
- 0,5 μl Forward primer (10μM)
- 0,5 μl Reverse primer (10μM)
- 0,12 μl Taq polymeráza (0,63/25 μl)
- \* μl H<sub>2</sub>O (\* do objemu 25 μl)
- 4,0 μl cDNA

#### **PCR profil** (gradient Ta: 54,3 – 66,6°C):

- |                      |          |        |  |
|----------------------|----------|--------|--|
| 1. Úvodní denaturace | 94°C     | 120 s  |  |
| 2. PCR-denaturace    | 94°C     | 30 s   |  40 cyklů |
| annealing            | gradient | 30 s   |  |
| extenze              | 72°C     | 45 s   |  |
| 3. Závěrečná extenze | 72°C     | 10 min |  |

PCR produkt byl hodnocen elektroforeticky.

Závěr: Optimální koncentrace Mg<sup>2+</sup>: **2 – 3 mM**

Optimální Ta: **54,3 – 59,2** (HCV +ssRNA, HCV-ssRNA)

Klonovaný standard pro validaci PCR byl připraven v Laboratoři experimentální hepatologie, IKEM, použitím kitu TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Koncentrace získaných plazmidů:


HCV positive strand: 1,5.10<sup>10</sup> kopií, HCV negative strand: 2,3.10<sup>11</sup> kopií

Reakční směs pro qPCR (celkový objem 20  $\mu$ l):

- 10  $\mu$ l SYBR Green Master Mix Buffer (2x)
- 0,4  $\mu$ l Forward primer (10 $\mu$ M)
- 0,4  $\mu$ l Reverse primer (10 $\mu$ M)
- 5,2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

4,0  $\mu$ l 5x řed cDNA

#### qPCR profil ABI PRISM 7500:

1. Úvodní denaturace 95°C 10 min
  2. PCR-denaturace 95°C 15 s  
annealing 60°C 60 s  
bez extenze
  3. Závěrečná extenze 72°C 10 min
  4. Melting analýza 90-60 °C
-  40 cyklů

##### 3.5.2.1.3.1.1 Velikost PCR produktu

Velikost PCR produktů byla ověřena elektroforeticky porovnáním se standardem *Gene Ruler 50 bp DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH, USA).

##### 3.5.2.1.3.1.2 Specificita

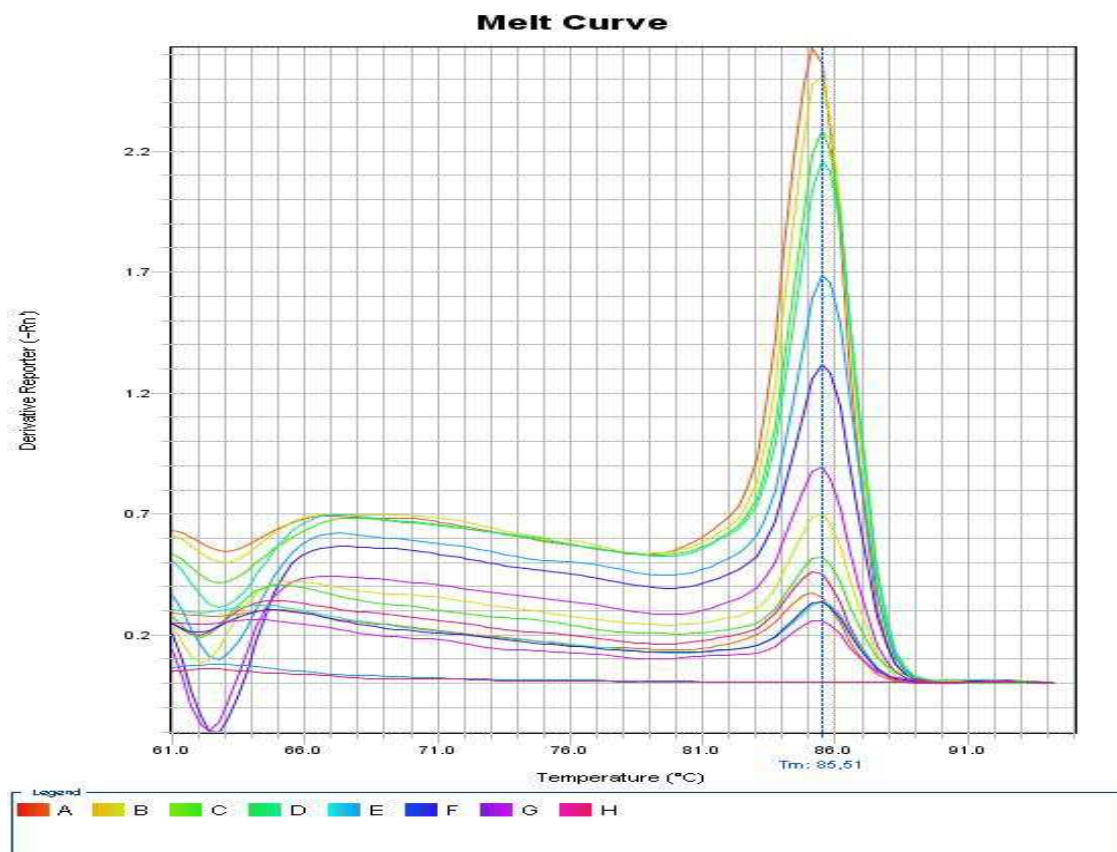
Specificita primerů byla testována pro každý produkt v RealTime analyzátoru **analýzou teploty tání T<sub>M</sub>** po skončení každé RealTime analýzy. Disociační křivky všech testovaných genů i HCV RNA poskytovaly specifické produkty (**Obrázek 11a-e**).



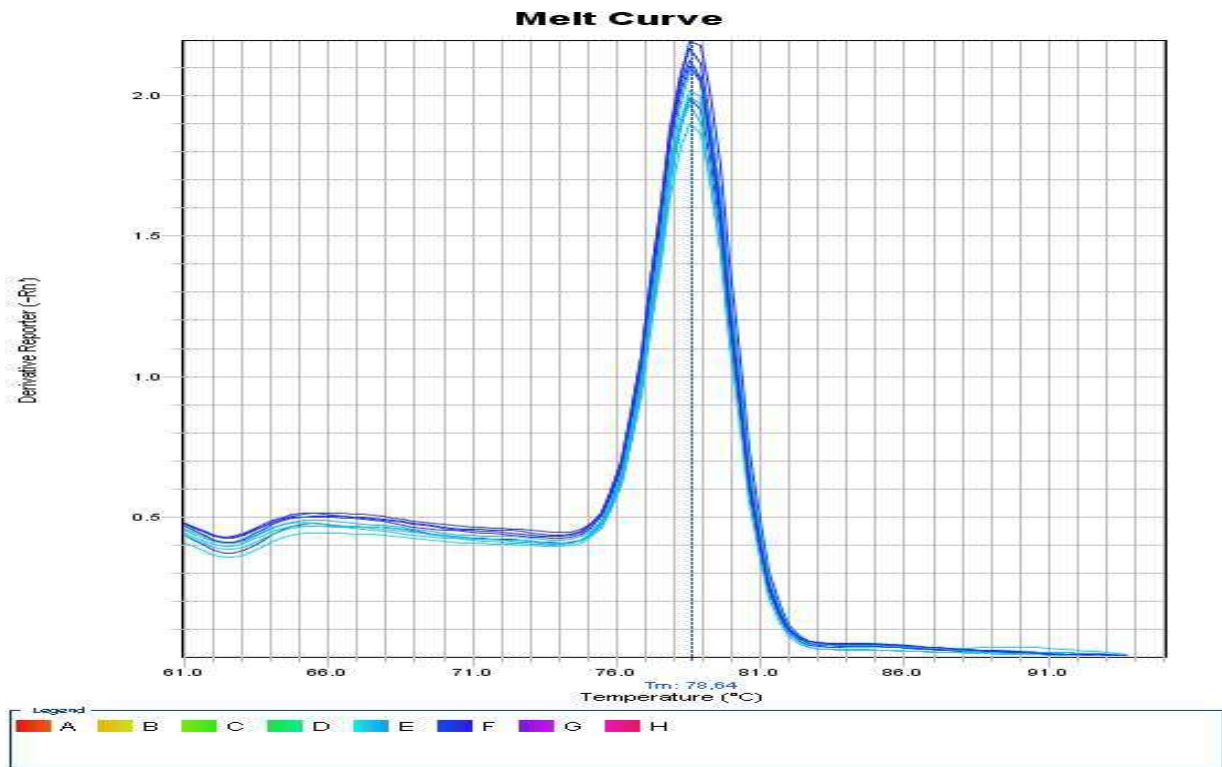
Obrázek 11: Křivky teploty tání (SW ABI PRISM 7500)

Rn = normalizovaná fluorescence

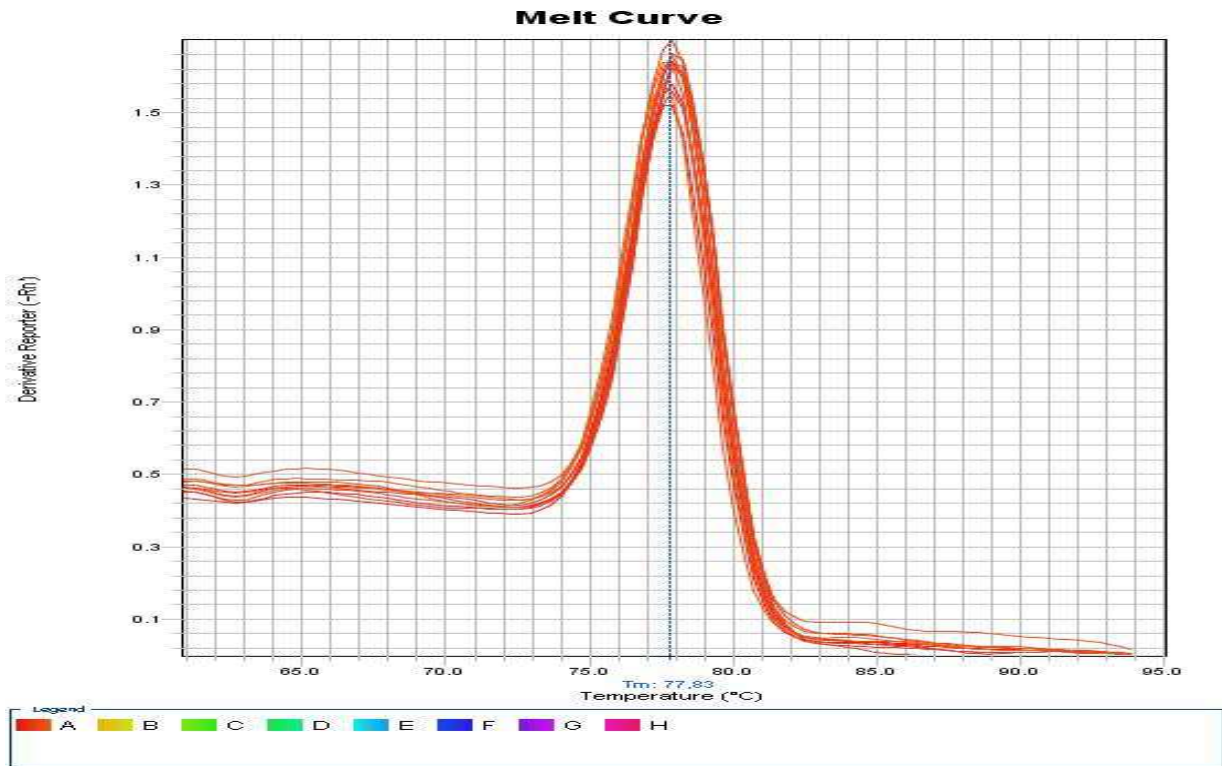
Obrázek 11a: HCV (-ss) RNA, plazmid, max. koncentrace  $10^9$  kopií



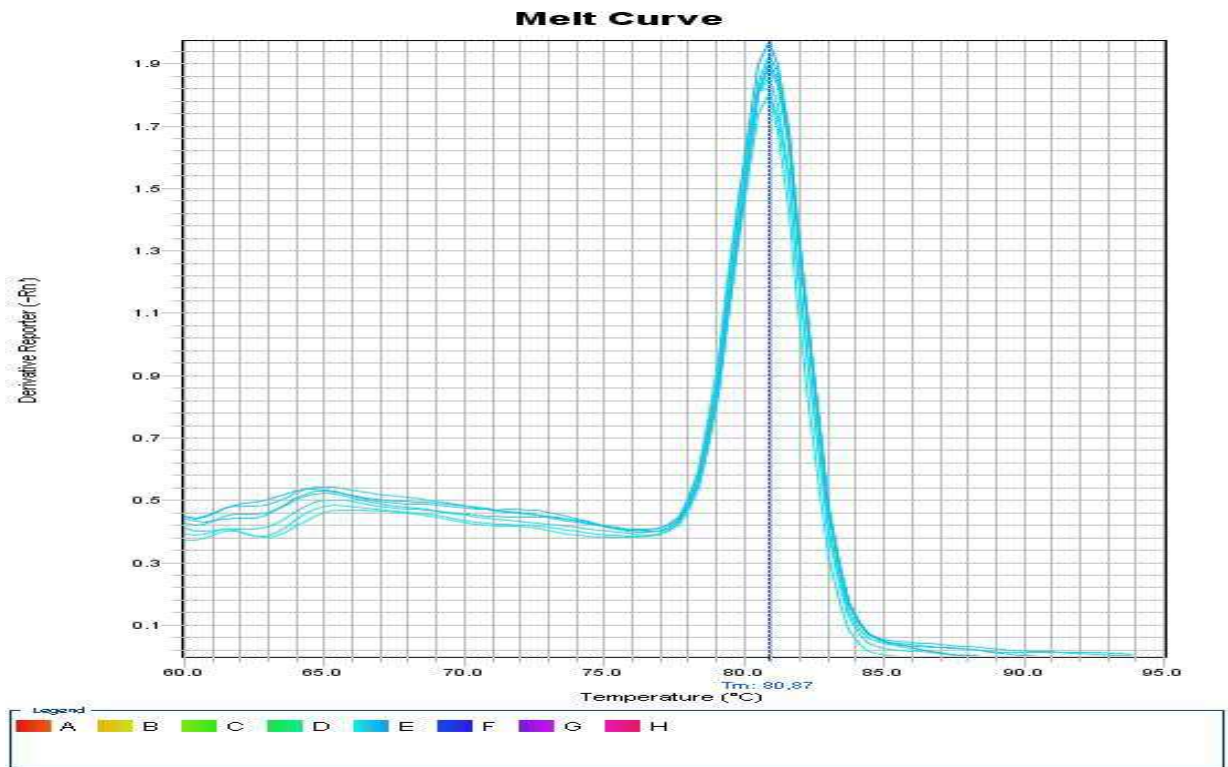
Obrázek 11b: *HPRT* (cDNA)



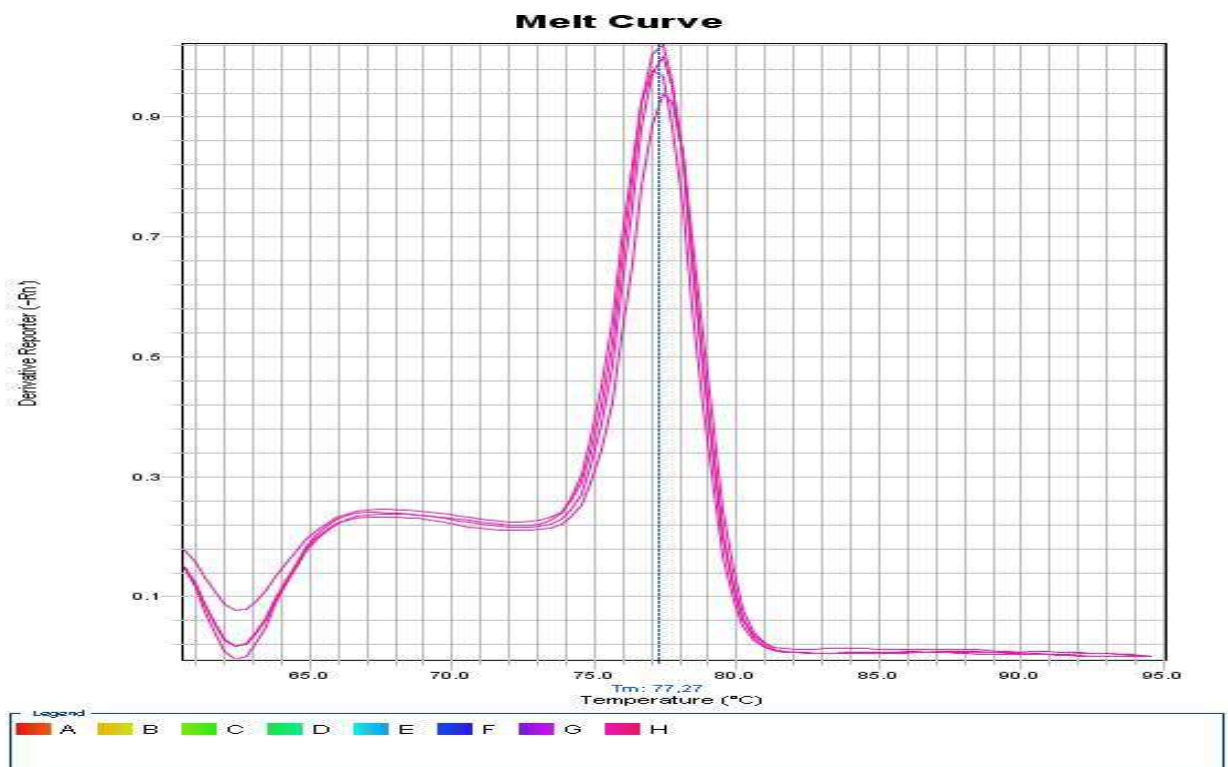
Obrázek 11c: *HMOX1* (cDNA)



Obrázek 11d: *HMOX2* (cDNA)



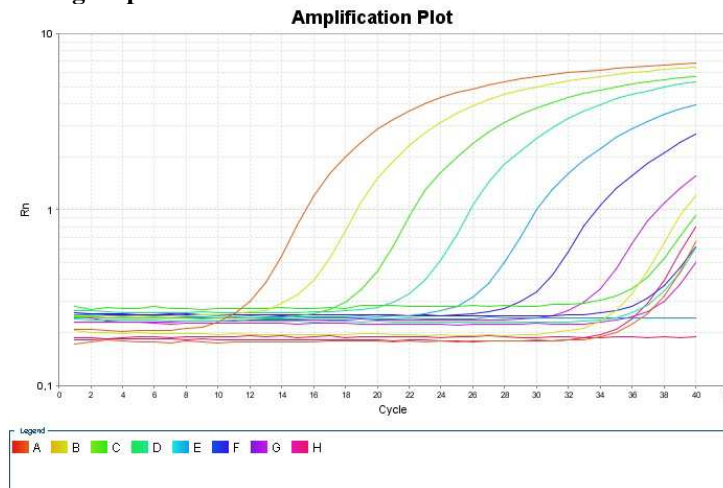
Obrázek 11e: *BLVRA*(cDNA)



### 3.5.2.1.3.1.3 Rozsah a mez detekce

Rozsah a mez detekce/stanovitelnosti pro HCV RNA pozitivní a negativní polarity byla stanovena RealTime analýzou plazmidů HCV RNA ss+/ss- (Obrázek 12) a vyhodnocena z kalibrační přímky (Obrázek 13, Obrázek 14).

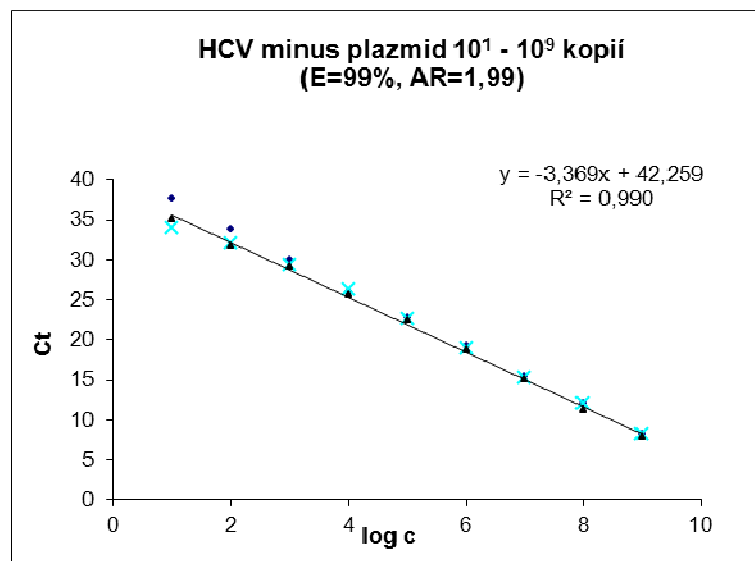
Obrázek 12: Amplifikační graf plazmidu HCV RNA



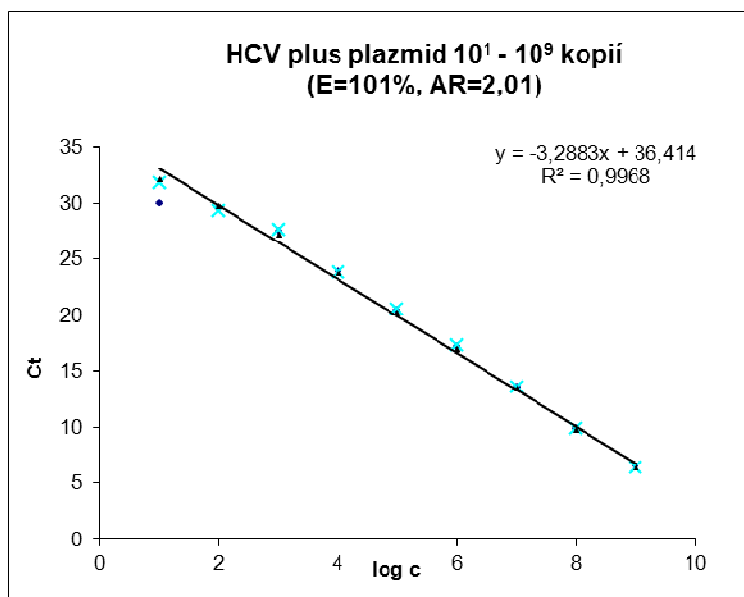
HCV minus strand, plazmid, max. koncentrace  $10^8$  kopií, SW ABI PRISM 7500  
Rn = normalizovaná fluorescence

Obrázek 13: Kalibrace HCV minus (-ss) RNA

Plazmid  $10^1 - 10^9$  kopií



**Obrázek 14: Kalibrace HCV plus (+ss) RNA**  
Plazmid  $10^1 - 10^9$  kopií



Testované rozmezí kalibrace: 1 kopie -  $10^9$  kopií HCV RNA

Použitelné rozmezí kalibrace:  $10^2/10^3$  kopií –  $10^9$  kopií HCV RNA

Mez detekce:  $10^1/10^2$  kopií HCV RNA

Mez stanovitelnosti:  $10^2/10^3$  kopií HCV RNA

**Akceptovatelná detekce pro dobrou reprodukovatelnost:  $\leq 30$   $c_t$**

### 3.5.2.1.3.1.4 Reprodukovatelnost

Stanovení mezilehlé preciznosti:

Počet analýz: 10  
Počet koncentračních hladin: 6  
Použitý materiál: plazmid

**Tabulka 12: Validace qPCR - stanovení mezilehlé preciznosti**

<b>Ct</b>	<b>SD</b>	<b>VK (%)</b>
13,84	1,07	7,7
16,35	0,53	3,2
19,58	0,79	4,0
22,80	1,03	4,5
26,07	0,93	3,6
28,96	0,88	3,5

Závěr: Získané hodnoty VK jsou do 10%.

### 3.5.2.1.3.1.5 Testování účinnosti amplifikace

Z kalibračních křivek plazmidů a cDNA byla stanovena účinnost amplifikace testovaných genů (Tabulka 13) a HCV RNA (Tabulka 14).

Účinnost amplifikace pro stanovení genové exprese a HCV RNA vztažené na kontrolní geny by měla být optimálně v rozmezí od 90 do 110% (slope od -3,6 do -3,10).

**Tabulka 13: Testování účinnosti amplifikace – genová exprese**

	Plazmid/PCR produkt*		cDNA	
	účinnost amplifikace (%)	slope	účinnost amplifikace (%)	slope
HMOX1	110	-3,11	110	-3,12
HMOX2	-	-	102	-3,27
BLVRA	-	-	105	-3,20
HPRT	99*	-3,37	102	-3,27
GAPDH	108*	-3,15	105	-3,17
18sRNA	101*	-3,29	98	-3,38

**Tabulka 14: Testování účinnosti amplifikace – HCV RNA**

	Plazmid	
	účinnost amplifikace (%)	slope
HCV ss +	101	-3,29
HCV ss -	99	-3,37

Závěr: Účinnost amplifikace všech testovaných genů byla v požadovaném rozmezí.

### 3.5.2.1.3.2 Normalizace referenčních genů

Výběr referenčních genů byl proveden se záměrem získat referenční gen stabilní současně v jaterní tkáni (Tabulka 15) i v PBL (Tabulka 16) u neinfekčních kontrol i u HCV infikovaných pacientů bez změny vlivem protivirotické terapie. Normalizace byla provedena stanovením míry exprese (požadovaná míra stability exprese  $M < 1,5$ ) dle Vandesompela [223].

**Tabulka 15: Normalizace referenčních genů v jaterní tkáni**

Jaterní tkáň	HPRT	18sRNA	GAPD	UBC	Normalizační faktor
Vzorek 1	0,72	0,94	1,0	0,62	1,442
Vzorek 2	0,54	1,00	0,24	0,14	0,675
Vzorek 3	1,00	0,89	0,93	1,00	1,714
Vzorek 4	1,02	0,98	0,64	0,68	1,457
Vzorek 5	1,19	0,89	0,58	0,59	1,397
Vzorek 6	0,52	0,53	0,34	0,33	0,755
Vzorek 7	0,69	0,57	0,59	0,54	1,045
Vzorek 8	0,58	0,42	0,22	0,25	0,605
Vzorek 9	0,29	0,23	0,23	0,23	0,411
Vzorek 10	0,78	0,82	0,74	0,91	1,458
<b>Stabilita exprese M</b>	0,560	0,635	0,551	0,640	

Závěr: Všechny testované referenční geny měly požadovanou stabilitu exprese ( $M < 1,5$ )

**Tabulka 16: Normalizace referenčních genů v PBL**

PBMC	HPRT	18sRNA	GAPD	UBC	Normalizační faktor
Vzorek 1	0,63	0,65	0,37	0,12	0,791
Vzorek 2	0,62	0,83	0,38	0,14	0,868
Vzorek 3	0,75	1,00	1,00	1,00	2,000
Vzorek 4	0,61	0,64	0,25	0,09	0,650
Vzorek 5	1,00	0,56	0,40	0,18	0,960
Vzorek 6	0,71	0,51	0,39	0,19	0,866
Vzorek 7	0,69	0,46	0,71	0,28	1,078
Vzorek 8	0,62	0,62	0,71	0,42	1,250
<b>Stabilita exprese M</b>	0,749	0,739	0,629	0,898	

Závěr: Všechny testované referenční geny měly požadovanou stabilitu exprese ( $M < 1,5$ )

### 3.5.3 Fragmentační analýza

#### 3.5.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena modifikovanou vysolovací metodou podle Millera [224].

1. **Hemolýza erytrocytů** – vzorek krve se přelije do 15 ml zkumavky a doplní 5 mM EDTA roztokem. Následuje centrifugace při 5000 rpm/10min/4°C, odlití supernatantu, resuspendace sedimentu 5mM EDTA a opakování, dokud není supernatant bez hemoglobinu (bílá peleta).
2. **Lýza leukocytů** – k sedimentu se přidá 2 ml 2x FASANA (20 ml 5M NaCl + 20 ml 0,5M EDTA + 20 ml 0,5 M Tris, pH=8,0, doplnit do 250 ml sterilní vodou). Po důkladném protřepání a rozpuštění pelety se přidá 2 ml 1% SDS se 100 µl proteinázy K (20 mg/ml) . Směs se inkubuje 48 hod v termostatu při 55°C.
3. **Deproteinace** – po inkubaci se přidají 2 ml nasyceného roztoku NaCl a směs se vortexuje se 15 s a uloží na 30 – 60 min při 4 - 8°C. Po promíchání a následné centrifugaci při 10000 rpm/10min/4°C je vodná fáze nad vrstvou proteinů odebrána do nové zkumavky.
4. **Vysrážení DNA** – k vodné fázi obsahující DNA se přidá 6 ml ledového izopropanolu a zkumavka se obrací až do vysrážení vlákna DNA. Vlákna DNA se přenesou do 2 ml zkumavky s 1 ml 70% ethanolu a centrifuguje se při 5000g/5 min, 24°C. Po odlití 70% ethanolu se vlákna promyjí 0,5 ml ethanolu, centrifuguje se při 5000g/5 min, 24°C, po vysušení se DNA rozpustí v 200 µl TE pufru (160 µl 0,5 M EDTA+ 0,8 ml 1M TRIS-Cl, pH 8, doplnit do 80 ml sterilní vodou).



### 3.5.3.2 Multiplexová fragmentační analýza

Fragmentační analýza probíhá v DNA sekvenátoru na principu kapilární elektroforézy. Tento přístroj využívá ke stanovení sekvence DNA separaci fragmentů syntetizovaných terminační enzymovou Sangerovou metodou. Při fragmentační analýze se amplifikační směs DNA separuje podle své velikosti. Každý amplifikát daného polymorfismu nese jeden typ fluoroforu, který po ozáření světlem určité vlnové délky emituje světlo určité barvy. Díky různým typům navázaných fluoroforů excitují amplikony při průchodu kapilárou po ozáření laserem světlo různé barvy a intenzity za vzniku peaků. Poloha každého peaku vůči známému standardu pak znamená typ alely daného polymorfismu specifického pro testovaný gen. Vyhodnovacího software který převede píky do podoby číselného výsledku.

Použili jsme v naší laboratoři zavedenou multiplexová variantu, která simultánně analyzuje DNA vzorek pro dva polymorfismy [226].

Design primerů (Tabulka 17): Primer3 program (<http://frodo.wi.mit.edu/>)

*UGT1A1* (GenBank accession number AY603772.1)

*HMOX1* (GenBank accession number AY460337.1)

**Tabulka 17: Sekvence primerů pro fragmentační analýzu**

<i>HMOX1</i> forward	5' - CTG CAG CTT CTC AGA TTT CC - 3'
<i>HMOX1</i> reverse	5' - ACA AAG TCT GGC CAT AGG AC - 3'
<i>UGT1A1</i> forward	5' -GAA CTT GGT GTA TCG ATT GGT TTT TGC - 3'
<i>UGT1A1</i> reverse	5' -CAT CCA CTG GGA TCA ACA GTA TCT TCC - 3'

D2-, D3-, a D4-značené amplikony byly naředěny 1:5 H<sub>2</sub>O a smíchány. Reverzní primery byly fluorescenčně značeny na 5' konci: D2-PA, D3-PA, D4-PA Well RED fluorescent dyes (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), značené primery byly smíchány s příslušnými neředěnými primery:


D4-HMOX1 reverse 1:1  
D2-UGT1A1 reverse 1:1  
D3-UGT1A1 reverse 1:1  
D4-UGT1A1 reverse 1:2

#### Reakční směs:

- 2,50  $\mu$ l Reakční pufr (bez  $MgSO_4$ )
- 3,00  $\mu$ l  $MgSO_4$
- 0,50  $\mu$ l dNTP mix (10 mM)
- \* Primery (10 $\mu$ M)\*
- 0,35  $\mu$ l Pfu DNA Polymerase (2,5 IU/ $\mu$ l)
- 25 ng gDNA

\* Primery(10  $\mu$ M): *HMOX1* forward, *HMOX1* reverse, *UGT1A1* forward and *UGT1A1* reverse (1.2, 0.7, 0.3 a 0.3  $\mu$ l)

#### **PCR profil:**

1. Úvodní denaturace 95°C 3 min
  2. PCR-denaturace 95°C 30 s  
annealing 63°C 45 s  
extenze 72°C 45 s
  3. Závěrečná extenze 72°C 5 min
- 35 cyklů 

#### Reakční směs:

- 3  $\mu$ l PCR produkt (multiplex)
- 36.25  $\mu$ l CEQ Sample Loading Solution (Beckman Coulter)
- 0.75  $\mu$ l CEQ DNA Size Standard 400-bp (Beckman Coulter)

Vzorek byl dále separován na principu na automatickém 8-kapilárním CEQ 8000 DNA sekvenátoru (Beckman Coulter).

#### Parametry analýzy na CEQ 8000 :

- denaturace: 90 °C 120 s
- teplota kapilár: 50 °C
- doba vstřiku: 30s při 2,0 kV
- doba běhu: 35 min při 6 kV

Vyhodnocovací SW: CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter)

### **3.6 Statistická analýza**

#### Aktivita HMOX, HCV RNA, Genová exprese

Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  standardní odchylka (SD), nebo medián (rozmezí). Rozdíly mezi sledovanými soubory (HCV vs. kontroly, SVR vs. NVR) byly hodnoceny nepárovým t-testem nebo Mann-Whitney U testem. Významnost vztahu mezi expresí *BLVRA* a efektem terapie byla určena chi-kvadrátem. Lineární regrese, Pearsonova korelace a multivariační logistická regrese byly hodnoceny SW Sigma Stat, verze 3.01.

Vzorky byly analyzovány v tripletech, delta cycle threshold ( $\Delta ct$ ) byl vyhodnocen metodou  $2^{-\Delta ct}$ , kde  $\Delta ct = (ct \text{ vzorku} - ct \text{ kontroly})$ .

#### Polymorfismy *HMOX*, *UGT1A1*

Fisherův exaktní test byl použit pro vyšetření analýzy asociace polymorfismů obou genů s jaterní cirhózou a jednotlivými stupni pokročilosti jaterní léze (tj. se stagingem v histologickém hodnocení). Prediktivní hodnota přítomnosti vyšetřovaných alel pro výsledek protivirové léčby byla hodnocena pomocí ROC (Receiver Operating Characteristics Curve) analýzy.

## 4 Výsledky

### 4.1 Studie A – Expres HMOX, BLVRA

#### 4.1.1 Expres HMOX, BLVRA v jaterní tkáni

Stanovili jsme expresi *HMOX1* v jaterní tkáni pacientů s chronickou hepatitidou C (n= 35) a porovnali s expresí *HMOX1* v jaterní tkáni osob s jinými jaterními chorobami (n=31) (steatózou (n=3), akutní lézí (n=4), NASH (n=3), PSC (n=6), cirhózou (n=2), NAFLD (n=1), cholestázou (n=2), s abusem alkoholu (n=4) a s minimálními změnami v histologickém nálezu (n=6). Vzhledem ke zjištěným hladinám exprese jsme usoudili, že na rozdíl od našeho původního předpokladu nebude pro účely této studie možné skupinu s jinými jaterními chorobami posuzovat jako normální kontroly. Z tohoto důvodu jsme skupinu kontrol vymezili pouze na vzorky s minimálními změnami či s normálním histologickým nálezem (n=6). V porovnání s takto definovanými kontrolami jsme nenalezli rozdíl v expresi *HMOX1/2* mezi oběma skupinami. Prokázali jsme však významně zvýšenou expresi *BLVRA* u HCV pacientů ( $0,28 \pm 0,16$  vs.  $0,17 \pm 0,06$ ;  $p=0,009$ ). Vzorky jaterní tkáně pacientů s HCV jsme použili rovněž ke zjištění korelace analyzovaných enzymů katabolické dráhy hemu mezi jaterní tkáni a PBL. Ve skupině pacientů s HCV infekcí nebyla nalezena korelace mezi HCV RNA a mRNA *HMOX1* / *HMOX2* a *BLVRA* v jaterní tkáni (*HMOX1*,  $r^2=0,077$ ,  $p=0,136$  / *HMOX2*,  $r^2=0,022$ ,  $p=0,418$  / *BLVRA*,  $r^2=0,005$ ,  $p=0,689$ ). V PBL exprese *HMOX1* korelovala s HCV RNA na hladině významnosti 0,053 ( $r^2=0,094$ ,  $p=0,053$ ). Bez asociace s HCV RNA v PBL byla exprese *BLVRA* ( $r^2=0,007$ ,  $p=0,688$ ), ovšem se slabou silou testu (0,059). Mezi jaterní tkáni a PBL nekorelovala jak exprese *HMOX1* ( $r^2=0,200$ ,  $p=0,182$ ) tak i exprese *HMOX2* ( $r^2=0,126$ ,  $p=0,402$ ). **Expres *BLVRA* v PBL korelovala s expresí *BLVRA* v jaterní tkáni ( $r^2=0,347$ ,  $p=0,03$ ).**

## 4.1.2 Aktivita HMOX v PBMC a exprese HMOX, BLVRA v PBL

### 4.1.2.1 Pacienti před zahájením antivirové terapie

Ve srovnání s kontrolami byla u pacientů s HCV infekcí testovaných před započítím léčby prokázána významně snížená aktivita HMOX v PBMC, avšak bez významného rozdílu v expresi *HMOX1* v PBL (Tabulka 18). Korelace mezi expresí *HMOX1* a aktivitou HMOX v PBMC byla prokázána jen u kontrol (Obrázek 15a), ve skupině HCV infikovaných pacientů před zahájením léčby mRNA *HMOX1* a aktivita HMOX nekoreluje (Obrázek 15b). Z důvodu absence korelace exprese *HMOX1* a aktivity celkové HMOX jsme se rozhodli stanovit retrospektivně rovněž expresi *HMOX2*. V porovnání se skupinou kontrol byla exprese *HMOX2* snížena (Tabulka 18). V návaznosti na publikovanou práci Lehmana [217] prokazující interferenci biliverdinu s virem hepatitidy C jsme v totožném souboru HCV infikovaných pacientů a kontrol stanovili rovněž expresi *BLVRA*. V porovnání se zdravými kontrolami byla u pacientů s HCV infekcí testovanými před započítím léčby prokázána významně zvýšená exprese *BLVRA* (Tabulka 18). Korelaci mezi expresí *BLVRA* a *HMOX* v PBL jsme však opět prokázali pouze u kontrol (Obrázek 16a), nikoli u HCV pacientů (Obrázek 16b).

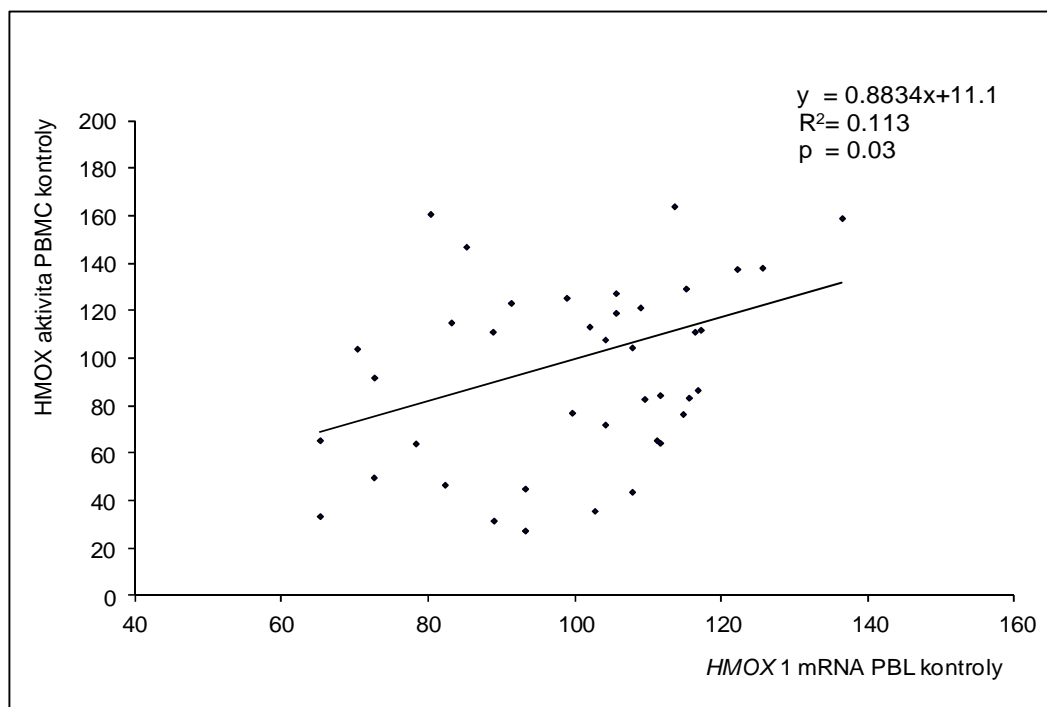
Tabulka 18: Aktivita HMOX v PBMC a exprese HMOX a BLVRA v PBL před zahájením terapie

	aktivita/mRNA	p
<b>Kontroly</b>		
aktivita HMOX v PBMC	36.31 ± 18.06	-
mRNA <i>HMOX1</i> v PBL	4.00 ± 1.89	-
mRNA <i>HMOX2</i> v PBL	4.98 ± 0.94	-
mRNA <i>BLVRA</i> v PBL	1.28 ± 0.36	-
<b>HCV týden 0</b>		
aktivita HMOX v PBMC	20.58 ± 16.27	<b>0.001</b>
mRNA <i>HMOX1</i> v PBL	3.61 ± 2.06	0,32
mRNA <i>HMOX2</i> v PBL	4.28 ± 1.14	<b>0.001</b>
mRNA <i>BLVRA</i> v PBL	1.65 ± 0.67	<b>0.001</b>

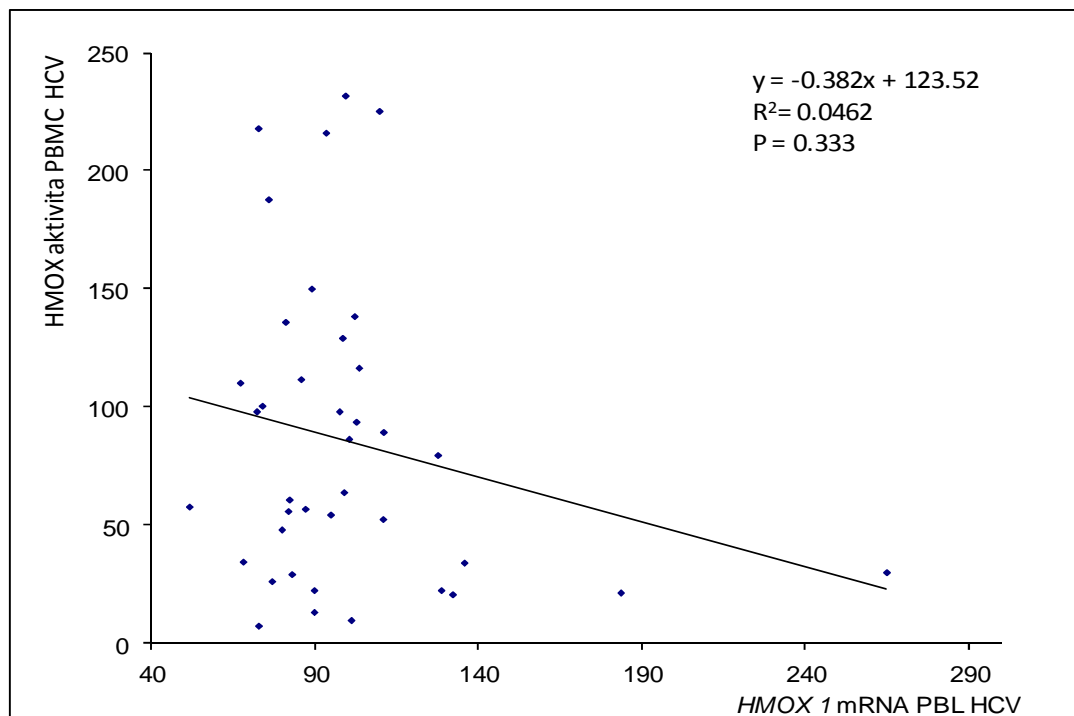
Aktivita HMOX je vyjádřena v pmol CO/hr/10<sup>6</sup> buněk.  
p: HCV pacienti vs. kontroly

Obrázek 15: Korelace aktivity HMOX v PBMC a exprese *HMOX1* v PBL

a) Kontroly

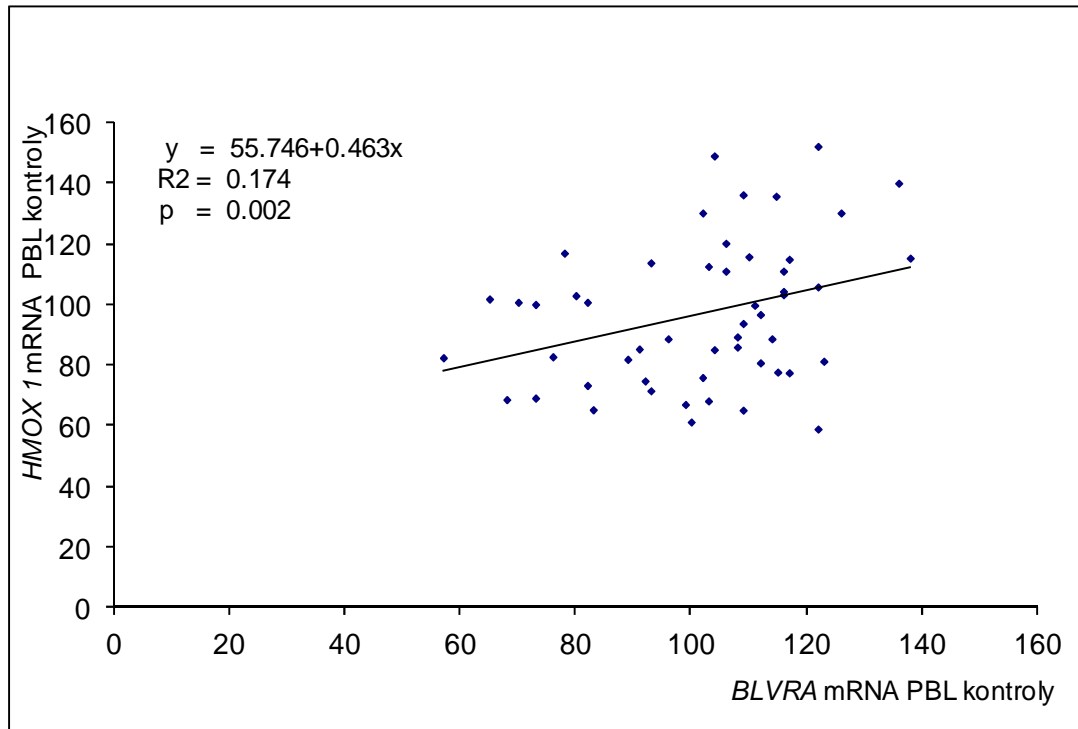


b) HCV pacienti

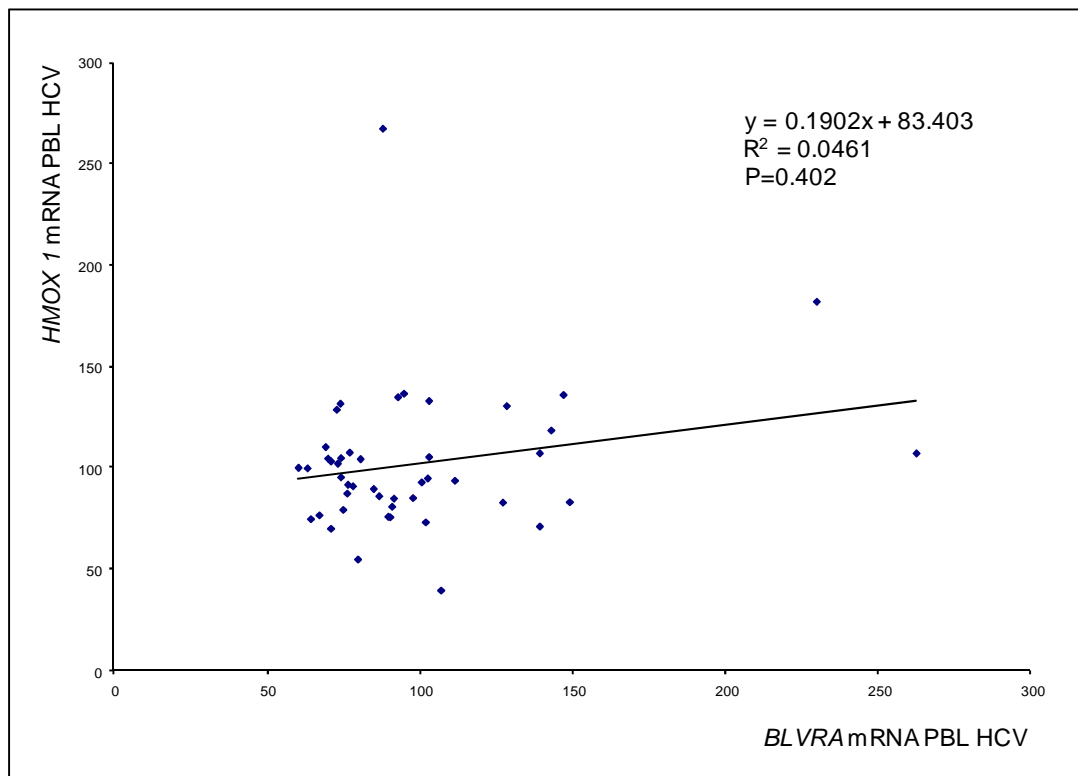


Obrázek 16: Korelace exprese *BLVRA* a *HMOX 1* v PBL

a) Kontroly



b) HCV pacienti



### 4.1.2.2 Pacienti v průběhu antivirové terapie

Stanovili jsme aktivitu a expresi *HMOX* a expresi *BLVRA* v PBMC/PBL před započítím protivirové terapie a v týdnech 12, 24, 36 a 48 od započítí terapie. Neprokázali jsme žádný významný rozdíl v expresi *HMOX1* ani v aktivitě *HMOX* v průběhu terapie (Tabulka 19)

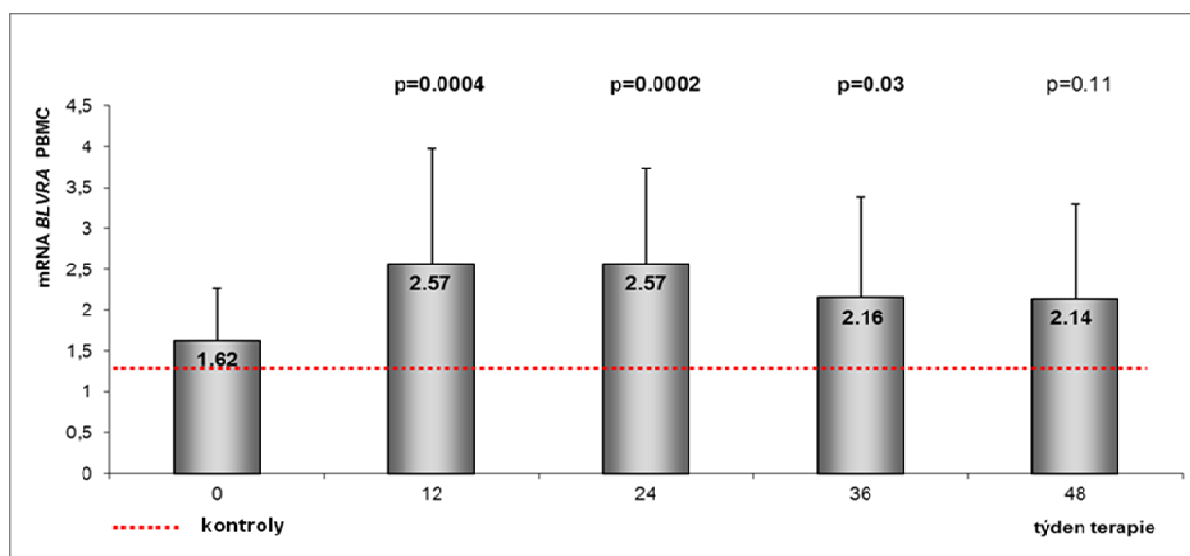
**Tabulka 19: Aktivita a exprese *HMOX* v průběhu terapie**

	týden 0	týden 12	týden 24	týden 36	týden 48
aktivita <i>HMOX</i> (pmol CO/h/10 <sup>6</sup> )	20,6 ± 16,3	27,6 ± 21,6 p=0,19	27,9 ± 15,3 p=0,55	28,9 ± 33,2 p=0,12	23,9 ± 9,0 p=0,53
exprese <i>HMOX1</i>	3,5 ± 2,0	3,7 ± 2,1 p=0,82	3,4 ± 1,7 p=0,66	3,3 ± 1,4 p=0,49	3,5 ± 1,4 p=0,84

p: týden 12, 24, 36 a 48 vs. týden 0

Exprese *BLVRA* se v průběhu protivirové léčby (12., 24, 36. týden od zahájení protivirové terapie) zvýšila v porovnání s týdnem 0 (před léčbou) (Obrázek 17).

**Obrázek 17: Exprese *BLVRA* u pacientů s hepatitidou C v průběhu protivirové terapie**



p: týden 12, 24, 36 a 48 vs. týden 0

Pacienti byli rozděleni na základě výsledku protivirové terapie do 2 skupin. Respondéři byli definováni jako pacienti se setrvalou virologickou odpovědí (SVR, nedetekovatelná HCV RNA v týdnech 24, 36, a 48 po zahájení protivirové terapie, n=38). Pacienti, kteří nedosáhli



SVR, byli definováni jako bez virologické odpovědi (NVR, n=20, z toho 15 bylo rezistentních, 5 dosáhlo virologické odpovědi na konci léčby s následným relapsem).

Nenalezli jsme rozdíly v expresi a aktivitě HMOX během protivirové léčby (Tabulka20)

**Tabulka 20: Rozdíly v expresi HMOX mezi SVR a NVR**

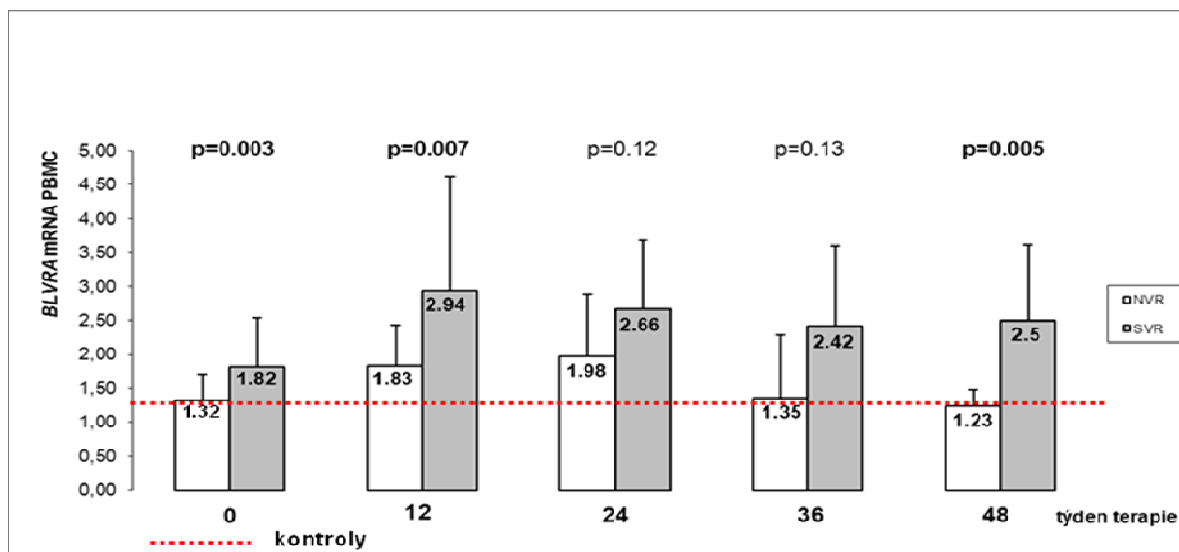
	týden 0	týden 12	týden 24	týden 36	týden 48
aktivita HMOX (pmol CO/h/10 <sup>6</sup> )	SVR 19,1 ± 17,3 NVR 22,9 ± 14,7 p=0,47	SVR 33,6 ± 23,8 NVR 26,0 ± 20,0 p=0,40	SVR 26,5 ± 20,7 NVR 28,2 ± 23,0 p=0,96	SVR 28,9 ± 15,4 NVR 14,7 ± 8,2 p=0,62	SVR 34,1 ± 32,5 NVR 39,2 ± 54,6 p=0,71
exprese HMOX1	SVR 3,63 ± 1,91 NVR 3,15 ± 2,31 p=0,71	SVR 4,18 ± 2,42 NVR 2,99 ± 1,28 p=0,21	SVR 3,57 ± 1,88 NVR 2,91 ± 1,27 p=0,69	SVR 3,62 ± 1,39 NVR 2,27 ± 0,78 p=0,08	SVR 3,31 ± 1,76 NVR 3,96 ± 0,50 p=0,60

p: SVR vs. NVR

Nalezli jsme však rozdílnou expresi BLVRA mezi respondéry a nonrespondéry (Obrázek 18).

Exprese BLVRA před zahájením terapie byla významně zvýšená pouze u pacientů se SVR v porovnání s kontrolami (1,82±0,74 vs. 1,28±0,36; p=0,003), ale ne u pacientů s NVR v porovnání s kontrolami (1,32±0,34 vs. 1,28±0,36; p=0,65).

**Obrázek 18: Rozdíly v expresi BLVRA mezi SVR a NVR v průběhu protivirové terapie**

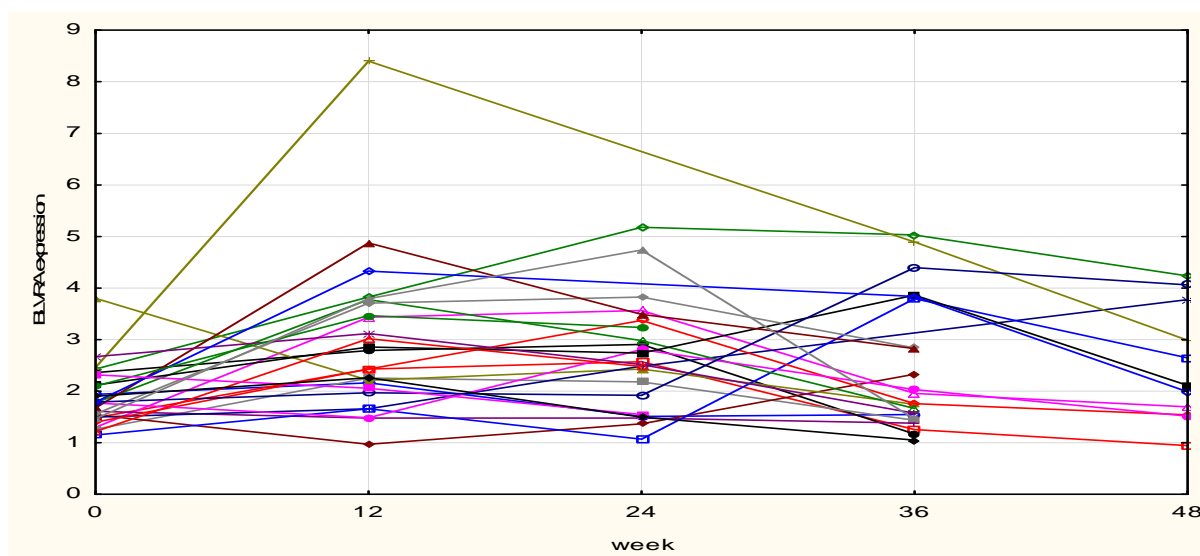


p: SVR vs. NVR

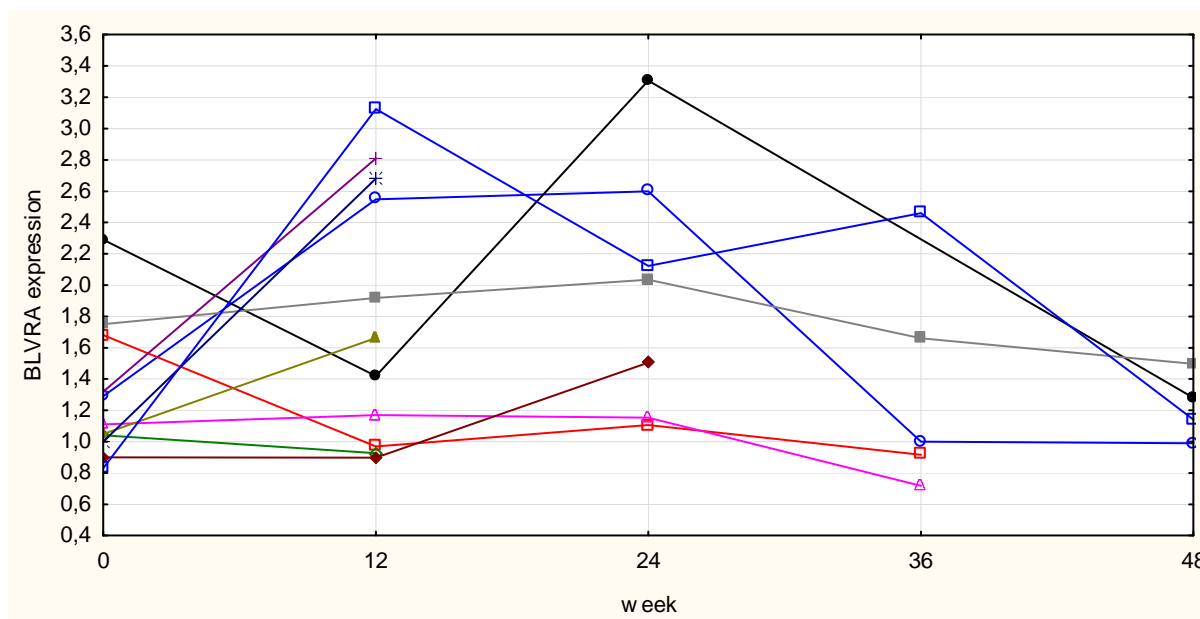
Expresi *BLVRA* během terapie jsme vyjádřili u každého pacienta individuálně. Skupinu pacientů jsme rozdělili na pacienty se SVR (Obrázek 19a), pacienty bez SVR (Obrázek 19b), pacienty s délkou terapie 24 týdnů (Obrázek 19c) a pacienty s délkou terapie 48 týdnů (Obrázek 19d)

**Obrázek 19: Individuální exprese *BLVRA* v PBL v průběhu terapie**

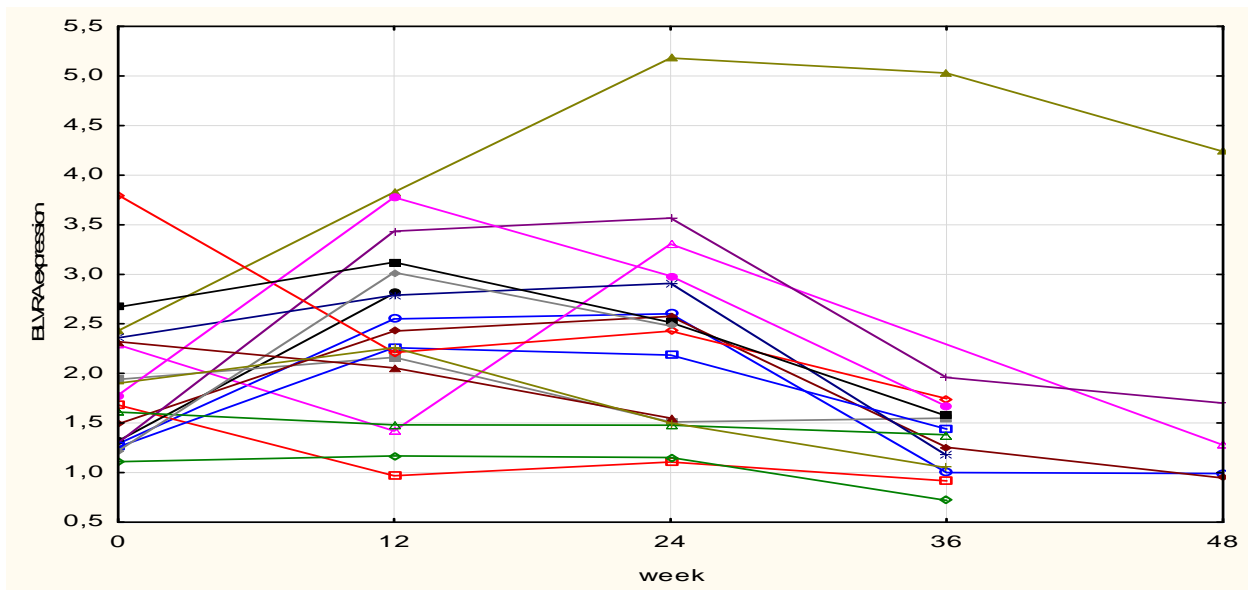
a) Pacienti se SVR (n=26)



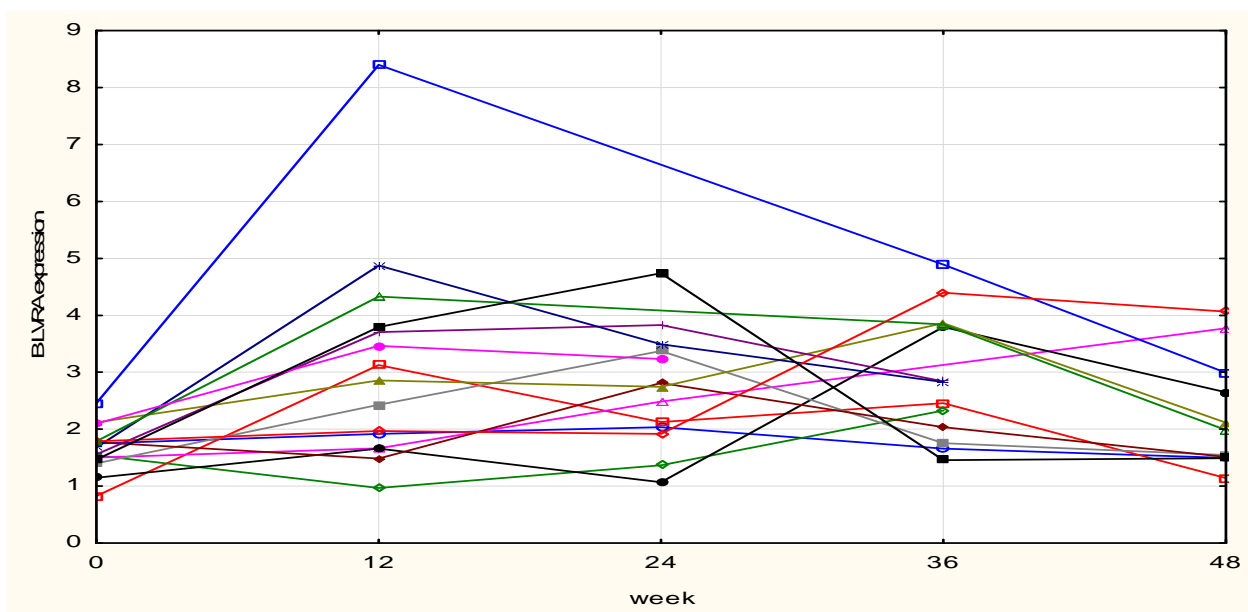
b) Pacienti bez SVR (n=11)



c) Pacienti s délkou terapie 24 týdnů (n=18)



d) Pacienti s délkou terapie 48 týdnů (n=15)



Při sledování dynamiky exprese *BLVRA* u jednotlivých pacientů v průběhu terapie je patrné její výrazné snížení po ukončení léčby. Expres *BLVRA* u pacientů se SVR po ukončení terapie (n=15) poklesla v porovnání s expresí *BLVRA* v týdnu 24 (median [IQ range] 1,38 [1,2-1,6] vs. 2,52 [1,5-2,8],  $p = 0,03$ ) na hladinu srovnatelnou s kontrolami (median [IQ range] 1,38 [1,2-1,6] vs. 1,28 [1-1,5],  $p = 0,43$ ). K snížení exprese *BLVRA* dochází

pravděpodobně v důsledku eliminace viru během léčby poklesem indukce endogenního interferonu a současně ukončením aplikace exogenního interferonu podávaného terapeuticky.

### **Vliv ribavirinem indukované anémie na expresi BLVRA**

Vzhledem ke skutečnosti, že se SVR byla asociována kromě exprese BLVRA rovněž koncentrace hemoglobinu (Hb) v krvi, posuzovali jsme možný vliv hemolytické anémie indukované ribavirinem během protivirové terapie na expresi BLVRA. Pro hodnocení rozvoje anémie byly zvoleny hladiny Hb < 100 g/l a pokles koncentrace Hb > 30 g /l proti výchozím hodnotám ve 12. a 24. týdnu terapie. Pokles Hb > 30g/l vůči výchozím hodnotám byl pozorován u 62% pacientů ve 12. týdnu terapie a 50% pacientů ve 24. týdnu terapie. Hodnoty Hb <100 g/l dosahovalo 9% pacientů ve 12 týdnů a 28% pacientů ve 24. týdnu terapie. Exprese BLVRA se nelišila u pacientů s Hb<100 g/L v porovnání s pacienty s Hb >100 g/L ve 12. ani 24. týdnu terapie. Rovněž nebyl prokázán rozdíl v expresi BLVRA ve skupině pacientů s poklesem Hb>30g/l proti skupině s poklesem Hb <30 ve 12. ani 24. týdnu terapie (Tabulka 21). Lze tedy vyloučit souvislost anémie indukované terapií RBV se zvýšenou expresí BLVRA během terapie.

**Tabulka 21: Vliv ribavirinem indukované anémie na expresi BLVRA v PBL**

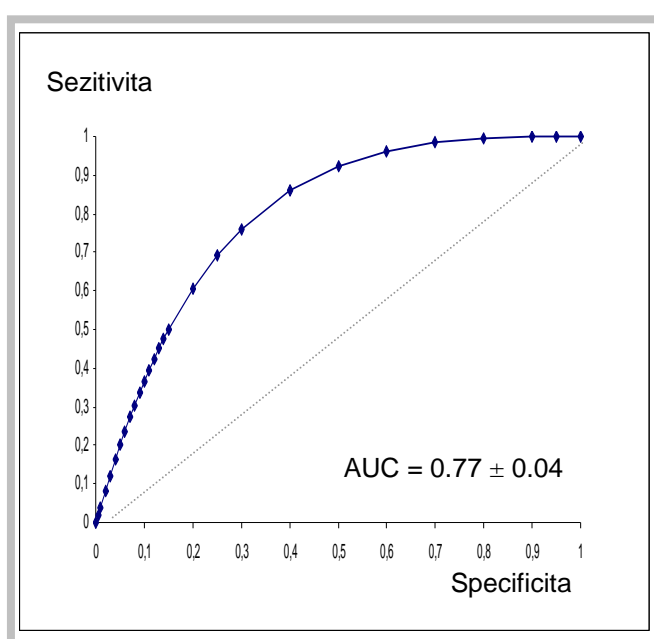
	Koncentrace Hb (g/l)			Pokles koncentrace Hb (g/l)		
	Hb <100	Hb >100	p	<30	>30	p
týden 12						
incidence (%)	8,6	91,4		38	62	
exprese BLVRA	2,6 ± 1,7	2,53 ± 0,9	0,85	2,1 ± 1,1	2,53 ± 0,9	0,31
týden 24						
incidence (%)	27,8	72,2		50	50	
exprese BLVRA	2,46 ± 1,6	2,82 ± 0,7	0,73	2,59 ± 1,2	2,72 ± 0,8	0,78

### 4.1.2.3 Predikce efektu protivirové terapie u pacientů s hepatitidou C

#### 4.1.2.3.1 ROC analýza

Pro posouzení predikčního efektu bazální exprese *BLVRA* jsme provedli ROC analýzu exprese *BLVRA* v PBL před zahájením protivirové terapie (Obrázek 20). Výsledek ROC analýzy (specifická vs. senzitivita) s AUC  $0,8 \pm 0,08$  splňovala podmínky dobrého testu.

Obrázek 20: ROC analýza exprese *BLVRA* v PBL



Kvalita testu dle AUC:  
0.5 – 0.75 použitelný  
**0.75 – 0.92 dobrý**  
0.92 – 0.97 velmi dobrý  
0.97 – 1.0 vynikající

Cut-off hodnota exprese *BLVRA* v PBL před zahájením terapie predikovala dosažení SVR se 76% senzitivitou a 70% specifickou (pozitivní prediktivní hodnotou 83% a negativní prediktivní hodnotou 61%).

#### 4.1.2.3.2 Multivariační logistická regrese

K testování potenciálních prediktorů SVR multivariační logistickou regresí jsme kromě exprese *BLVRA* zařadili rovněž genotyp *IL28B*, virémii, pohlaví, koncentraci Hb a trombocytů. Pacienti se zvýšenou bazální expresí *BLVRA* v PBMC měli 15x vyšší šanci dosáhnout SVR (Tabulka 22). Vyloučení *BLVRA* z multivariační analýzy nemělo žádný vliv na

predikční hodnoty testovaných analýz. Analýza je však limitovaná nízkým počtem pacientů, následkem kterého jsme pravděpodobně neprokázali korelaci významného prediktoru *IL28B* (rs12979860) se SVR. Pozorovali jsme však jasný trend asociace upregulované exprese *BLVRA* před zahájením terapie s CC genotypem *IL28B* v porovnání s pacienty bez CC genotypu ( $p=0,059$ ) a pacienty s TT genotypem ( $p=0,058$ ) *IL28B*.

**Tabulka 22: Multivariační logistická regrese potenciálních prediktorů SVR**

	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>P-VALUE</b>
Exprese <i>BLVRA</i> v PBL	<b>15</b>	<b>1,05 – 214,2</b>	<b>0,046</b>
<i>IL28B</i> (rs12979860)	3,05	0,39 – 24	0,29
HCV RNA	1,45	0,37 – 5,6	0,59
Fibróza	0,76	0,4 – 1,5	0,4
Pohlaví	1,81	0,13 – 2,5	0,66
Hemoglobin	0,94	0,88 – 1,01	0,09
Trombocyty	1,01	0,94 – 1,03	0,18

OR, odds ratio; CI, konfidenční interval.

## 4.2 Studie B-Polymorfismy *HMOX1* a *UGT1A1*

### 4.2.1 Polymorfismy *HMOX1* a *UGT1A1* ve vztahu k pokročilosti jaterního postižení

Vztah mezi výskytem jednotlivých alel promotoru *HMOX1* a *UGT1A1* a výskytem jaterní cirhózy ve skupině HCV pacientů ukazuje **Tabulka 23**.

**Tabulka 23. Vztah mezi jednotlivými alelami promotorů genů *HMOX1* a *UGT1A1* a jaterní cirhózou**

n=146	Cirhóza (%)		p <sup>1</sup>	
	Ano (n=25)	Ne (n=121)		
<b>Gen</b> <b><i>HMOX1</i></b>				
<b>Alela S<sup>2</sup></b>	40,7	46,0	39,7	0,66
<b>Alela M<sup>2</sup></b>	52,1	48,0	52,9	0,76
<b>Alela L<sup>2</sup></b>	7,2	6,0	7,4	1,00
<b>Gen</b> <b><i>UGT1A1</i></b>				
<b>Alela 6<sup>2</sup></b>	60,2	68,0	58,7	0,53
<b>Alela 7<sup>2</sup></b>	39,8	32,0	43,3	0,41

<sup>1</sup> Fisherův exaktní test (2-stranný)

<sup>2</sup> procentuální výskyt dané alely

Výskyt jednotlivých alel obou polymorfismů v našem souboru odpovídá výskytu v běžné populaci [226]. V našem souboru pacientů nebyla prokázána významná asociace mezi výskytem jednotlivých alel a přítomností či absencí jaterní cirhózy [227]. Podrobnější hodnocení, tedy výskyt jednotlivých alel obou polymorfismů, ve vztahu k jednotlivým stupňům jaterní fibrózy (tj. ke stadiu v histologickém hodnocení) ukazuje **Tabulka 24**.

**Tabulka 24: Vztah polymorfismů *HMOX1* a *UGT1A1* ke stagingu v histologickém hodnocení**

N=127 pacientů		Cirhóza (%)		p <sup>1</sup>	Staging (%)			p <sup>1</sup> S0 S2	p <sup>1</sup> S0 S3-4
		ANO (N=25)	NE (N=102)		S0-1 (N=43)	S2 (N=29)	S3-4 (N=30)		
<b>Gen <i>HMOX1</i></b>									
<b>Alela S<sup>2</sup></b>	41,7	46,0	39,7	0,32	37,2	43,1	43,3	0,46	0,14
<b>Alela M<sup>2</sup></b>	53,3	50,4	48,0	0,45	58,1	43,1	48,3	<b>0,044</b>	0,13
<b>Alela L<sup>2</sup></b>	7,9	6,0	7,4	1,00	4,7	13,0	8,3	<b>0,042</b>	1,00
<b>Gen <i>UGT1A1</i></b>									
<b>Alela 6<sup>2</sup></b>	60,2	68,0	58,3	0,48	64,6	65,1	58,4	0,63	0,42
<b>Alela 7<sup>2</sup></b>	39,0	30,0	40,0	0,60	35,4	34,9	51,6	0,57	0,64

<sup>1</sup> Fisherův exaktní test (dvoustranný)

<sup>2</sup> procentuální výskyt dané alely

V tomto hodnocení byla nalezena asociace mezi M a L alelou a nižším stupněm fibrózy S 0-1 proti S 2 (p= 0,044 a p=0,042). Tento vztah však nebyl potvrzen při hodnocení S 0-1 vs. S 3-4, jedná se tedy zřejmě o chybu vyplývající ze skladby vyšetřovaného souboru pacientů.

Z dostupné literatury se zdá, že čím vyšší je počet repeticí GT v promotoru genu *HMOX1*, tím nižší je transkripční aktivita [226]. Analýzu výskytu alely L ve vztahu ke stupni jaterního postižení nebylo možno provést pro minimální výskyt alely L v našem souboru. Zvolili jsme proto opačný přístup. Analyzovali jsme výskyt všech genotypů obsahujících alelu S (tedy S/S, S/M a S/L) vůči všem ostatním genotypům ve vztahu ke stagingu jaterní fibrózy.

**Tabulka 25** ukazuje hodnocení popsanych parametrů ve vztahu k přítomnosti či absenci jaterní cirhózy. Ani při tomto hodnocení nebyla prokázána žádná pozitivní asociace [227].



**Tabulka 25: Výskyt alely S v genu *HMOX1* a genotypu 7/7 *UGT1A1* ke stupni jaterní fibrózy**

n=146 pacientů	Cirhóza		p <sup>1</sup>
	Ano (n=28)	Ne (n=108)	
<b>Alela S v genu <i>HMOX1</i></b>			
Ano <sup>2</sup>	65,1	68,0	1.00
Ne <sup>2</sup>	34,9	32,0	
<b>Genotyp <i>UGT1A1</i> 7/7</b>			
Ano <sup>2</sup>	15,7	12,0	0.57
Ne <sup>2</sup>	84,3	88,0	

<sup>1</sup> Fisherův exaktní test (dvoustranný)

<sup>2</sup> procentuální výskyt dané alely

#### **4.2.2 Polymorfismy *HMOX1* a *UGT1A1* ve vztahu k účinku protivirové léčby**

Vztah studovaných polymorfismů, nízké výchozí virémie (HCV RNA < 800 000 IU/ml) a jednotlivých typů virologické odpovědi k SVR (kriterium vyléčení HCV infekce) ukazuje **Tabulka 26**. V tomto hodnocení byl pouze potvrzen vztah mezi virémií a dosažením RVR a SVR [228]. Neprokázáli jsme však vztah mezi výskytem jednotlivých alel *HMOX1* ani *UGT1A1* a výsledkem léčby ani typem virologické odpovědi [227].

**Tabulka 26: Vztah polymorfismů *HMOX* a *UGT1A1*, nízké virémie a typů virologické odpovědi k účinku protivirové terapie**

n=105	RVR	pEVR/cEVR	SVR
<b>Viremie &lt; 800 000 IU/ml<sup>1</sup></b>			
AUC (95% CI)	0,607 (0,529; 0,686)	0,556 (0,448; 0,663)	0,657 (0,477; 0,737)
P <sub>AUC</sub>	<b>0,008</b>	0,330	<b>0,045</b>
sensitivita/specifická (%)	48,8/72,6	37,8/73,3	50,3/71,1
<b><i>HMOX</i><sup>1</sup></b>			
<b>Alela S</b>			
AUC (95% CI)	0,524 (0,444; 0,603)	0,500 (0,388; 0,612)	0,558 (0,476; 0,639)
P <sub>AUC</sub>	0,561	1,000	0,165
sensitivita/specifická (%)	62,8/41,9	60,0/40,0	64,2/47,4
P <sub>VIR</sub>	0,100	0,407	0,984
<b>Alela M</b>			
AUC (95% CI)	0,511 (0,432; 0,591)	0,519 (0,408; 0,631)	0,557 (0,476; 0,638)
P <sub>AUC</sub>	0,783	0,733	0,170
sensitivita/specifická (%)	54,7/47,6	53,9/50,0	57,5/53,9
P <sub>VIR</sub>	0,065	0,615	0,995
<b>Alela L</b>			
AUC (95% CI)	0,512 (0,433; 0,592)	0,519 (0,405; 0,634)	0,501 (0,419; 0,582)
P <sub>AUC</sub>	0,759	0,733	0,987
sensitivita/specifická (%)	8,1/94,4	93,9/10,0	6,7/93,4
P <sub>VIR</sub>	<b>0,011</b>	0,546	0,130
<b><i>UGT1A1</i><sup>1</sup></b>			
<b>Alela 6 / 7</b>			
AUC (95% CI)	0,504 (0,425; 0,584)	0,525 (0,413; 0,637)	0,555 (0,473; 0,636)
P <sub>AUC</sub>	0,919	0,661	0,187
sensitivita/specifická (%)	39,5/38,7	61,7/56,7	64,9/53,9
P <sub>VIR</sub>	<b>0,034</b>	0,581	0,969

<sup>1</sup> P<sub>AUC</sub> je statistická významnost pro danou AUC; P<sub>VIR</sub> je statistická významnost pro srovnání mezi AUC pro virémií a AUC pro danou alelu.

## 5 Diskuse

### 5.1 Role *HMOX* a *BLVRA* v patogenezi jaterního poškození

V současné době nejsou mechanismy vedoucí k poškození hepatocytů a vzniku jaterního zánětu a fibrózy u chronické hepatitidy C plně objasněny. Dosud nelze ani predikovat u jednotlivých pacientů dostatečně přesně riziko rozvoje závažné jaterní fibrózy či jaterní cirhózy. Rozvoj fibrózy je dnes chápán jako komplexní proces, na kterém se spolupodílejí vlivy genetické, vlivy zevního prostředí a některé základní virologické a klinické parametry (genotyp HCV, délka trvání infekce, věk hostitele v okamžiku přenosu infekce apod.). K aktivaci fibrogenese přispívá kromě imunitní odpovědi rovněž oxidační stres [164].

Opakovaně byly vysloveny hypotézy, že v patogenezi poškození jaterní tkáně při HCV infekci hrají roli vysoce reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS), které vznikají v HCV infikovaných hepatocytech a infiltrují buňky imunitního systému [150,229,230]. HCV může rovněž snižovat expresi antioxidantních genů [174]. Nedávno bylo prokázáno, že zvýšená exprese *HMOX1* v jaterních myofibroblastech a v HSC má velký protifibrotický a protizánětlivý potenciál [188,231]. Overexprese nebo indukce *HMOX* *in vitro* u HCV infekce potlačuje replikaci viru a rovněž zvyšuje ochranu vůči oxidačnímu poškození [189]. V literatuře jsou dosud publikovány rozporuplné výsledky ohledně exprese *HMOX* v jaterní tkáni u HCV infekce. Abdalla et al. přinesli jako první údaje o expresi *HMOX1* v případech chronické hepatitidy C [190]. Exprese *HMOX1*, nikoliv však *HMOX2*, byla významně snížena v jaterní tkáni u HCV infikovaných osob. Stejných výsledků bylo dosaženo i v *in vitro* experimentech [190,191]. Ghaziani et al. naopak popsali indukci exprese *HMOX1* zapříčiněnou represí jejího regulátoru Bach1, v přítomnosti proteinů HCV *in vitro* [192].

Abdalla et al. nenalezli žádné rozdíly v expresi *HMOX1* u různých stádií jaterní fibrózy podle histologického hodnocení [190]. V roce 2013 byla publikována studie analyzující genovou

expresi pomocí microarrays s cílem nalézt potenciální biomarkery pro včasnou detekci HCC [251]. Mezi geny upregulovanými v jaterní tkáni u nálezu HCC podmíněného HCV infekcí byla rovněž *BLVRA* s více než dvojnásobným zvýšením v porovnání s normální jaterní tkání [251]. *BLVRA* byla recentně popsána jako modulátor signalizace insulinového receptoru [196]. Inzulinová rezistence související se zvýšeným oxidačním stresem predikuje rozvoj HCC u pacientů s chronickou HCV infekcí [252] a s inzulinovou rezistencí je rovněž asociovaná horší odpověď na protivirovou terapii [235].

Jedním z cílů naší studie bylo zjistit možnou asociaci mezi vývojem fibrózy a zánětu jaterní tkáně a expresí *HMOX1* a *BLVRA* v jaterní tkáni v závislosti na virologických a klinických parametrech u HCV infekce. Pro stanovení relativní exprese *HMOX1* a *BLVRA* v jaterní tkáni jsme zavedli RealTime PCR metodiku s použitím 2 referenčních genů (*HPRT*, *GAPDH*). Vzhledem k dobré korelaci obou referenčních genů jsme výsledné relativní exprese vyjádřili vztažené na *HPRT*, který měl srovnatelnou míru exprese se sledovanými geny. Expresi *HMOX1* a *BLVRA* jsme porovnali v jaterní tkáni pacientů s chronickou hepatitidou C a jaterní tkáni osob s jinými jaterními chorobami (např. prostou jaterní steatózou i nealkoholovou steatohepatitidou, akutní jaterní lézí, primární sklerotizující cholangitidou, alkoholovou jaterní cirhózou) a s osobami s normálním nálezem (minimálními změnami) v histologickém obraze. Na základě prokázaných změn exprese *HMOX1* v těchto vzorcích jsme usoudili, že pacienty s jinou etiologií jaterní léze než HCV nelze pro účely naší studie považovat za normální kontroly. Z toho důvodu jsme skupinu kontrol následně vymezili pouze na tkáňové vzorky s minimálními změnami či s normálním histologickým nálezem. Při porovnání s takto definovanými kontrolami jsme nezjistili žádný významný rozdíl v expresi *HMOX1* mezi skupinami, pravděpodobně v důsledku malého počtu kontrol (n=6) a velké variability exprese indukibilní *HMOX1*, zejména u HCV infikovaných pacientů (s SD až 80%). Neprokázáli jsme rovněž žádný vztah mezi expresí

*HMOX1*, *BLVRA* a virologickými parametry před léčbou. V jaterní tkáni pacientů s HCV jsme však našli zvýšenou expresi *BLVRA*, která korelovala s expresí v periferních leukocytech krve.

Dále jsme zjišťovali, zda genetická predispozice (polymorfismy v promotoru genu pro *HMOX1* a *UGT1A1*) může být asociována s průběhem HCV infekce nebo odpovědí na terapii a zda může být rizikovým faktorem pro rozvoj fibrózy/cirhózy u HCV infikovaných pacientů.

Polymorfismy promotoru genu pro *HMOX1* (rs1805173) a promotoru genu pro *UGT1A1* (rs81753472) byly vyšetřeny simultánní fragmentovou analýzou. Tato technika byla vyvinuta v naší laboratoři a byla recentně publikována [232]. Podle počtu (GT)<sub>n</sub> repetice byly jednotlivé alely promotoru *HMOX1* klasifikovány na krátkou (Short, S < 24 opakování), střední (Medium, M=24-28 opakování) a dlouhou (Long, L>29 opakování) [233]. U promotoru genu *UGT1A1* byl sledován výskyt repeticí (TA)<sub>n</sub> a asociace s různými parametry pro genotyp *UGT1A1* 7/7, který podmiňuje hyperbilirubinémii.

Ve vyšetřovaném souboru pacientů s chronickou HCV infekcí jsme neprokázali vliv sledovaných polymorfismů *HMOX1* a *UGT1A1* na histologickou aktivitu/staging jaterního postižení ani asociaci s virologickými parametry před léčbou nebo při protivirové terapii.

V našem souboru pacientů jsme rovněž neprokázali vztah mezi expresí *HMOX1*, počtem *HMOX1* pozitivních buněk v jaterní tkáni a aktivitou zánětlivého procesu (grading) a stupněm fibrózy (staging).

V naší studii jsme prokázali, že exprese *BLVRA* v jaterní tkáni koreluje s expresí *BLVRA* v periferních leukocytech krve. Dále nás proto zajímalo, zda exprese *BLVRA* v krvi může predikovat odpověď na protivirovou terapii.

## **5.2 Role BLVRA v predikci efektu protiviřové terapie**

Standardem léčby chronické hepatitidy C je v současné době stále kombinace peginterferonu a ribavirinu [234]. Výsledek léčby je ovlivněn jak virologickými faktory, tak faktory hostitelskými a její efekt je možné velmi obtížně predikovat před zahájením protiviřové léčby. Vzhledem k finanční náročnosti léčby a častým nežádoucím účinkům kombinované terapie PEG-IFN + RBV je žádoucí identifikovat markery, které by umožnily již před léčbou identifikovat pacienty s minimální či naopak nejvyšší pravděpodobností dosažení SVR (vyléčení HCV infekce). Přesné molekulární mechanismy nebo prediktivní faktory spojené se selháním protiviřové léčby dosud nebyly kompletně identifikovány.

Řada prací dostupných v literatuře se zabývala genovou expresí v jaterní biopsii a /nebo v krvi respondérů (osoby s dosaženou SVR) a nonrespondérů (osob bez SVR bez dalšího rozlišení typů odpovědi) (viz přehledové review [235]). Popsány byly také asociace polymorfismů různých genů s odpovědí na léčbu. Dosud nejsilnějším prediktivním faktorem efektu léčby před zahájením protiviřové léčby jsou SNP v genu *IL28B* [99,236,237]. Asociace genotypu CC *IL28B* (rs12979860) s dosažením SVR představuje dosud nejpřesnější prediktivní faktor efektu léčby u genotypu 1 [99,236,238]. Stejný trend jsme prokázali v našem souboru pacientů jak u genotypu 1 ( $p=0.16$ ), tak i u ostatních genotypů ( $p=0.11$ ). Multivariační analýzou neprokázaná statistická významnost je pravděpodobně způsobená malým souborem pacientů. Prevalence CC a non CC genotypů *IL28B* v našem souboru byla ve shodě s prevalencí CC a non CC genotypů u pacientů popsanou v ČR v roce 2012 na mnohem větším souboru pacientů [239]. Navíc jsme pozorovali jasný trend asociace upregulované exprese *BLVRA* s příznivým genotypem CC v porovnání s non CC genotypy ( $p=0,059$ ) a TT genotypy *IL28B* ( $p=0,058$ ).

Slibným markerem predikce efektu protiviřové terapie by se mohly stát rovněž enzymy katabolické dráhy hemu. Zhu se spolupracovníky [189] nedávno popsali

mechanismus protivirového účinku *HMOX1*. V nádorových buněčných liniích Huh-7,5 s JFH1 infekčním klonem prokázali, že přímý produkt aktivity *HMOX1*, biliverdin, již při biologických koncentracích inhibuje virovou replikaci mechanismem inhibice NS3/4A proteázy [189]. HCV je primárně hepatotropním virem, místem jeho replikace jsou také PBMC [240,241,242]. Proto jsme se v naší studii zaměřili zejména na stanovení exprese/aktivity *HMOX* v PBL/PBMC. Analýza genové exprese v PBMC znamená pro pacienta významně menší zátěž v porovnání s invazivní analýzou jaterní biopsie.

Předpokládali jsme, že exprese *HMOX1* a aktivita *HMOX* v PBMC by mohla reflektovat expresi *HMOX1* v jaterní tkáni. Pro účely této studie jsme zavedli stanovení aktivity *HMOX* v PBMC novou vysoce citlivou metodu, která dosud nebyla k dispozici. Nalezli jsme významně sníženou aktivitu *HMOX* v PBMC u HCV infikovaných pacientů před zahájením protivirové terapie v porovnání se zdravými kontrolami. Na stanovení exprese *HMOX* jsme použili metodiku totožnou se stanovením v jaterní tkáni (s *HPRT* jako referenčním genem). Expresi *HMOX1* jsme však překvapivě mezi oběma skupinami našli bez významných rozdílů. Aktivita a exprese u *HMOX* korelovala pouze u kontrolních vzorků, u HCV infekce nebyl mezi expresí a aktivitou enzymu žádný významný vztah. Z důvodu chybějící korelace u HCV infikovaných pacientů jsme se rozhodli retrospektivně stanovit rovněž expresi *HMOX2*, která byla snižena u HCV pacientů v porovnání s kontrolami. Korelace mezi aktivitou *HMOX* a expresí *HMOX2* byla stejně jako u *HMOX1* prokázána pouze u kontrolních vzorků, nikoliv u HCV pacientů. Ve vzorcích jaterní tkáně i v PBL jsme stanovili HCV RNA. 100% pacientů před zahájením terapie mělo infikované periferní leukocyty, u 93% pacientů před zahájením léčby jsme prokázali stanovením HCV RNA negativní polaritu aktivní virovou replikaci v PBL (88% respondérů, 100% nonrespondérů). Ve 24. týdnu léčby byla u všech sledovaných pacientů HCV RNA v PBL pod mezí detekce.

Od 36. týdne po zahájení terapie byla HCV RNA pozitivní i negativní polarity detekována pouze u nonrespondérů.

V PBMC infikovaných virem jsme nenalezli souvislost mezi HCV RNA a aktivitou HMOX. V PBMC ani v jaterní tkáni jsme rovněž neprokázali asociaci mezi HCV RNA a expresí *HMOX1/HMOX2/BLVRA*. V porovnání s kontrolami jsme u HCV infikovaných pacientů prokázali zvýšenou bazální expresi *BLVRA*, která se dále zvyšovala v průběhu protivirové terapie. Proti kontrolám byla bazální exprese *BLVRA* zvýšená pouze u pacientů s HCV infekcí, kteří dosáhli SVR, avšak nikoliv u nonrespondérů.

Expese *BLVRA* v PBL korelovala s expresí v jaterní tkáni a byla rovněž asociovaná se SVR. Tyto nálezy byly v rozporu s naším původním očekáváním. Vzhledem k protivirovým účinkům biliverdinu jsme předpokládali sníženou expresi *BLVRA* u respondérů. Zjištěná overexpese *BLVRA* u HCV infikovaných pacientů před a během protivirové léčby je patrně způsobena regulací interferonem  $\alpha$ . Indukce *BLVRA* interferonem  $\alpha$  byla popsána v PBMC neinfikovaných šimpanzů [243]. Naše výsledky prokazující asociaci *BLVRA* v PBL s odpovědí na léčbu jsou v souladu s popsanou indukcí IFN-stimulovaných genů (ISGs) pozorovaných v PBMC respondérů [244]. Naše data v souladu s těmito prezentovanými skutečnostmi naznačují, že 1) pacienti se SVR mají zvýšenou expresi *BLVRA* před zahájením protivirové terapie (pravděpodobně následkem interferonu indukovaného při HCV infekci; 2) pacienti se SVR i NVR mají další nárůst exprese *BLVRA* během protivirové terapie v porovnání s bazálními hladinami (pravděpodobně v důsledku terapeuticky podávaného interferonu; 3) pacienti se SVR po ukončení terapie mají sníženou expresi *BLVRA* srovnatelnou s hladinami neinfikovaných kontrol pravděpodobně díky poklesu produkce exogenních (terapie) i endogenních (nepřítomnost viru) interferonů. Rovněž jsme prokázali, že expese *BLVRA* u HCV infekce je nezávislá na ribavirinem indukované hemolýze vznikající v důsledku terapie. Naše data však neprokazují, zda je expese *BLVRA* aktivně



zahrnutá v mechanismu protivirové odpovědi, nebo zda je jen vedlejším markerem odpovědi na terapii.

Naše výsledky prokázaly, že pacienti s chronickou HCV infekcí mají významně zvýšenou expresi *BLVRA* v krvi, která koreluje s expresí v jaterní tkáni. Bazální exprese *BLVRA* je silně asociovaná s odpovědí na protivirovou terapii. Neschopnost indukovat *BLVRA* by mohla být prediktorem neodpovídavosti na standardní protivirovou terapii. Výsledky je nutné ověřit v rozsáhlejší prospektivní studii.

V průběhu roku 2011 schválily FDA (*Food and Drug administration*) a EMA (*European Medicines Agency*) k užití v indikaci chronické HCV infekce vyvolané genotypem HCV 1 preparáty ze skupiny přímo působících antivirotik (*Directly Acting Antivirals, DAA*), boceprevir a telaprevir, proteázové inhibitory první generace. Nová terapeutika jsou schválena pro použití v léčbě chronické hepatitidy C rovněž v České republice. V roce 2012 byl vypracován Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C ([www.ces-hep.cz](http://www.ces-hep.cz)), v němž je v něm trojkombinační léčba boceprevirem či telaprevirem v kombinaci s pegylovaným interferonem a ribavirinem (PEG INF+RBV) doporučována jako postup druhé volby, tj. pro osoby s anamnézou neúspěšné léčby. Terapie s boceprevirem vede k dosažení SVR i u pacientů, kteří jsou nonrespondéry na standardní dvojkombinaci až v 38% případů [245,246]. V nejbližším období je možno očekávat, že bude trojkombinace doporučena jako postup první volby pro pacienty s chronickou HCV infekcí.

Nyní jsme zahájili prospektivní studii zaměřenou na expresi *BLVRA/BLVRB* v krvi u kombinované terapie peginterferon + ribavirin + boceprevir.

## 6 Závěr

### 6.1 Studie A – Exprese HMOX a BLVRA

**1. Charakterizovat expresi HMOX v PBMC a aktivitu HMOX v PBL u pacientů s chronickou hepatitidou C před zahájením protivirové terapie v porovnání se skupinou zdravých kontrol. Objasnit vztah mezi expresí a aktivitou HMOX a základními klinickými a virologickými charakteristikami HCV infekce. Charakterizovat změny aktivity a exprese HMOX během protivirové terapie v týdnech 12, 24, 36 a 48 od zahájení terapie a nalézt případnou asociaci s efektem protivirové terapie.**

Tato studie poprvé popsala expresi HMOX v PBL u chronické HCV infekce. Pacienti před zahájením protivirové terapie vykazovali sníženou aktivitu HMOX1 v porovnání se zdravými kontrolami. Aktivita HMOX korelovala s expresí HMOX1 pouze u kontrol, nikoli u HCV infikovaných pacientů. Před zahájením protivirové terapie jsme v PBL pacientů prokázali nevýrazné, ale signifikantní snížení exprese HMOX2 v porovnání se zdravými kontrolami. Exprese HMOX1 ani HMOX2 během protivirové terapie se nelišila u pacientů na léčbu odpovídajících (SVR) a rezistentních (NVR).

**2. Charakterizovat expresi BLVRA v PBL u pacientů s chronickou hepatitidou C v porovnání se skupinou zdravých kontrol. Charakterizovat změny exprese BLVRA během protivirové terapie v týdnech 12, 24, 36 a 48 od zahájení terapie s cílem nalézt případnou asociaci s efektem protivirové terapie.**

Podarilo se nám prokázat, že bazální exprese BLVRA v PBL koreluje s odpovědí na terapii a je zvýšená u pacientů na léčbu odpovídajících (SVR) v porovnání se zdravými kontrolami a rovněž v porovnání s pacienty na terapii rezistentními (NVR). V průběhu protivirové terapie dochází k další upregulaci BLVRA s významnými rozdíly mezi SVR a NVR.

**3. Charakterizovat expresi *HMOX* a *BLVRA* v jaterní tkáni pacientů s chronickou hepatitidou C ve srovnání s expresí v PBL.**

Tato studie poprvé popsala vztah exprese *HMOX* a *BLVRA* mezi jaterní tkání a PBL u HCV infikovaných pacientů a potvrdila korelaci exprese *BLVRA* mezi jaterní tkání a PBL.

U exprese *HMOX* tento vztah prokázán nebyl pravděpodobně v důsledku zjištěné vysoké variability exprese inducibilní *HMOX1* v jaterní tkáni i PBL.

## **6.2 Studie B – Polymorfismy *HMOX1* a *UGT1A1***

**1. Studovat varianty polymorfismu promotoru genu pro *HMOX1* u pacientů s chronickou HCV infekcí a objasnit jejich možnou asociaci s progresí jaterního poškození a rovněž s odpovědí na terapii u HCV infikovaných pacientů.**

Tato studie nepotvrdila asociaci polymorfismu rs 1805173 promotoru genu pro *HMOX1* s rozvojem jaterního poškození ani s virologickými parametry před zahájením a během terapie a s virologickou odpovědí.

**2. Studovat varianty polymorfismu promotoru genu pro *UGT1A1* u pacientů s chronickou HCV infekcí. Zjistit, zda genetická predispozice (nepřítomnost polymorfismu *UGT1A1\*28*) může být asociována s HCV infekcí, jejím průběhem, odpovědí na terapii a zda může být rizikovým faktorem pro rozvoj fibrózy/cirhózy u HCV infikovaných pacientů.**

Tato studie nepotvrdila význam polymorfismu rs 81753472 promotoru genu pro *UGT1A1* pro průběh infekce HCV a efekt protivirové léčby.

## 7 Literatura

1. Alberti A, Chemello L, Benvegna L (1999) Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 31 Suppl 1: 17-24.
2. Seeff LB (1997) Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 26: 21S-28S.
3. Roche B, Samuel D (2012) Hepatitis C virus treatment pre- and post-liver transplantation. *Liver Int* 32 Suppl 1: 120-128.
4. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, et al. (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958-965.
5. Pawlotsky JM (2004) Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 12: 96-102.
6. Houghton M, editor (1996) *Hepatitis C viruses*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1035-1058 p.
7. Pybus OG, Barnes E, Taggart R, Lemey P, Markov PV, et al. (2009) Genetic history of hepatitis C virus in East Asia. *J Virol* 83: 1071-1082.
8. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, et al. (1997) The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 78 ( Pt 2): 321-328.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV (2001) Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. 1975. *Rev Med Virol* 11: 3-8; discussion 8-9.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, et al. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.
11. Westaway EG (1987) Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res* 33: 45-90.
12. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, et al. (1998) Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol* 143: 2493-2503.
13. Choi J, Ou JH (2006) Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G847-851.
14. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, et al. (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-973.
15. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, et al. (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66: 3225-3229.
16. World Health Organization: Hepatitis C. World Health Organization Fact sheet 164 (Revised June 2011). Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
17. Nemecek V, Strunecky O (2009) Genotypic heterogeneity of hepatitis C virus (HCV) from blood donors in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 58: 63-72.
18. Nemecek V, Castkova J, Fritz P, Linhartova A, Svandova E, et al. (2003) The 2001 serological survey in the Czech Republic-viral hepatitis. *Cent Eur J Public Health* 11 Suppl: S54-61.
19. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, et al. (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2451-2455.
20. Lindenbach BD, Rice CM (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436: 933-938.
21. Bukh J, Purcell RH, Miller RH (1992) Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4942-4946.

22. Brown EA, Zhang H, Ping LH, Lemon SM (1992) Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 20: 5041-5045.
23. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66: 1476-1483.
24. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70: 3363-3371.
25. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K (1996) Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70: 3307-3312.
26. Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J (1999) In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2291-2295.
27. Dubuisson J (2007) Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13: 2406-2415.
28. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63: 71-180.
29. Waris G, Tardif KD, Siddiqui A (2002) Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem Pharmacol* 64: 1425-1430.
30. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, et al. (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230: 217-227.
31. Gonzalez ME, Carrasco L (2003) Viroporins. *FEBS Lett* 552: 28-34.
32. Welsch C, Jesudian A, Zeuzem S, Jacobson I New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* 61 Suppl 1: i36-46.
33. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, et al. (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327: 198-201.
34. Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH (2002) Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* 36: S121-127.
35. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, et al. (1986) Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 315: 1575-1578.
36. Reichard O, Andersson J, Schvarcz R, Weiland O (1991) Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet* 337: 1058-1061.
37. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, et al. (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339: 1485-1492.
38. Lohr HF, Schmitz D, Arenz M, Weyer S, Gerken G, et al. (1999) The viral clearance in interferon-treated chronic hepatitis C is associated with increased cytotoxic T cell frequencies. *J Hepatol* 31: 407-415.
39. Malinoski F, Stollar V (1981) Inhibitors of IMP dehydrogenase prevent sindbis virus replication and reduce GTP levels in *Aedes albopictus* cells. *Virology* 110: 281-289.
40. Zhou S, Liu R, Baroudy BM, Malcolm BA, Reyes GR (2003) The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* 310: 333-342.
41. Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, et al. (1999) Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol* 30: 376-382.

42. Feld JJ, Nanda S, Huang Y, Chen W, Cam M, et al. (2007) Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* 46: 1548-1563.
43. Zhang Y, Jamaluddin M, Wang S, Tian B, Garofalo RP, et al. (2003) Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the interferon-stimulated response element in respiratory syncytial virus-infected epithelial cells. *J Virol* 77: 5933-5947.
44. Feld JJ, Lutchman GA, Heller T, Hara K, Pfeiffer JK, et al. (2010) Ribavirin improves early responses to peginterferon through improved interferon signaling. *Gastroenterology* 139: 154-162 e154.
45. Thomas E, Feld JJ, Li Q, Hu Z, Fried MW, et al. Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. *Hepatology* 53: 32-41.
46. Husa P, Plisek S, Sperl J, Urbanek P, Galsky J, et al. (2009) [Recommendations of the Society of Infectious Medicine, the Czech Hepatologic Society of the J.E. Purkinje Medical Society. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 15: 65-76.
47. Fanning L, Kenny E, Sheehan M, Cannon B, Whelton M, et al. (1999) Viral load and clinicopathological features of chronic hepatitis C (1b) in a homogeneous patient population. *Hepatology* 29: 904-907.
48. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, et al. (2001) Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol* 34: 730-739.
49. Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, et al. (2007) Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 357: 124-134.
50. Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, et al. (2004) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 40: 993-999.
51. Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, et al. (2006) Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 130: 1086-1097.
52. Jacobson IM, Brown RS, Jr., Freilich B, Afdhal N, Kwo PY, et al. (2007) Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology* 46: 971-981.
53. Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, et al. (2005) Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 43: 425-433.
54. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, et al. (2004) Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140: 346-355.
55. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, et al. (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982.
56. Alfaleh FZ, Hadad Q, Khuroo MS, Aljumah A, Algamedi A, et al. (2004) Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C in Saudi patients commonly infected with genotype 4. *Liver Int* 24: 568-574.
57. Hasan F, Asker H, Al-Khaldi J, Siddique I, Al-Ajmi M, et al. (2004) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C genotype 4. *Am J Gastroenterol* 99: 1733-1737.

58. Khuroo MS, Dahab ST (2004) Meta-analysis: a randomized trial of peginterferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C genotype 4. *Aliment Pharmacol Ther* 20: 931-938.
59. Lam KD, Trinh HN, Do ST, Nguyen TT, Garcia RT, et al. (2010) Randomized controlled trial of pegylated interferon-alfa 2a and ribavirin in treatment-naive chronic hepatitis C genotype 6. *Hepatology* 52: 1573-1580.
60. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, et al. (1996) Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334: 77-81.
61. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, et al. (1999) Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 30: 1004-1013.
62. Pascu M, Martus P, Hohne M, Wiedenmann B, Hopf U, et al. (2004) Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut* 53: 1345-1351.
63. Salmeron J, Casado J, Rueda PM, Lafuente V, Diago M, et al. (2008) Quasispecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon-ribavirin. *J Clin Virol* 41: 264-269.
64. Farci P, Strazzeri R, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, et al. (2002) Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3081-3086.
65. Moribe T, Hayashi N, Kanazawa Y, Mita E, Fusamoto H, et al. (1995) Hepatitis C viral complexity detected by single-strand conformation polymorphism and response to interferon therapy. *Gastroenterology* 108: 789-795.
66. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, et al. (2000) The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288: 339-344.
67. Poynard T, McHutchison J, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J (2000) Is an "a la carte" combination interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C? The ALGOVIRC Project Group. *Hepatology* 31: 211-218.
68. Bissell DM (1999) Sex and hepatic fibrosis. *Hepatology* 29: 988-989.
69. Urbanek P (2004) Infekce virem hepatitidy C: Galén.
70. Ortiz V, Berenguer M, Rayon JM, Carrasco D, Berenguer J (2002) Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol* 97: 2408-2414.
71. Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J (2003) High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* 38: 639-644.
72. Reddy KR, Hoofnagle JH, Tong MJ, Lee WM, Pockros P, et al. (1999) Racial differences in responses to therapy with interferon in chronic hepatitis C. Consensus Interferon Study Group. *Hepatology* 30: 787-793.
73. McHutchison JG, Poynard T, Pianko S, Gordon SC, Reid AE, et al. (2000) The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. The International Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 119: 1317-1323.
74. Brau N, Bini EJ, Currie S, Shen H, Schmidt WN, et al. (2006) Black patients with chronic hepatitis C have a lower sustained viral response rate than non-Blacks with genotype 1, but the same with genotypes 2/3, and this is not explained by more frequent dose reductions of interferon and ribavirin\*. *J Viral Hepat* 13: 242-249.

75. Jeffers LJ, Cassidy W, Howell CD, Hu S, Reddy KR (2004) Peginterferon alfa-2a (40 kd) and ribavirin for black American patients with chronic HCV genotype 1. *Hepatology* 39: 1702-1708.
76. Muir AJ, Bornstein JD, Killenberg PG (2004) Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites. *N Engl J Med* 350: 2265-2271.
77. Conjeevaram HS, Fried MW, Jeffers LJ, Terrault NA, Wiley-Lucas TE, et al. (2006) Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. *Gastroenterology* 131: 470-477.
78. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, et al. (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116: 1413-1419.
79. Everson GT, Hoefs JC, Seeff LB, Bonkovsky HL, Naishadham D, et al. (2006) Impact of disease severity on outcome of antiviral therapy for chronic hepatitis C: Lessons from the HALT-C trial. *Hepatology* 44: 1675-1684.
80. Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, et al. (2003) Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 38: 75-85.
81. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Male PJ, et al. (2000) Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 33: 106-115.
82. Hui JM, Kench J, Farrell GC, Lin R, Samarasinghe D, et al. (2002) Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol* 17: 873-881.
83. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, et al. (2001) Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 33: 1358-1364.
84. Persico M, Persico E, Suozzo R, Conte S, De Seta M, et al. (2000) Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 118: 760-764.
85. Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, et al. (2003) Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 37: 600-609.
86. von Wagner M, Huber M, Berg T, Hinrichsen H, Rasenack J, et al. (2005) Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 129: 522-527.
87. Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL (1997) Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology* 25: 759-768.
88. Van Thiel DH, Friedlander L, Fagioli S, Wright HI, Irish W, et al. (1994) Response to interferon alpha therapy is influenced by the iron content of the liver. *J Hepatol* 20: 410-415.
89. Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Chopra S, Flamm S, Reddy RK, et al. (2000) Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* 32: 135-138.
90. Poynard T, Bedossa P, Opolon P (1997) Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 349: 825-832.



91. Hofer H, Osterreicher C, Jessner W, Penz M, Steindl-Munda P, et al. (2004) Hepatic iron concentration does not predict response to standard and pegylated-IFN/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 40: 1018-1022.
92. Jorquera F, Monte MJ, Guerra J, Sanchez-Campos S, Merayo JA, et al. (2005) Usefulness of combined measurement of serum bile acids and ferritin as additional prognostic markers to predict failure to reach sustained response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 547-554.
93. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, et al. (2004) Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 126: 840-848.
94. Lecube A, Hernandez C, Simo R, Esteban JI, Genesca J (2007) Glucose abnormalities are an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 102: 2189-2195.
95. Romero-Gomez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ, Salmeron J, Diago M, et al. (2005) Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 128: 636-641.
96. Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, Hoofnagle JH, Zacks S, et al. (2007) Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 45: 80-87.
97. D'Souza R, Sabin CA, Foster GR (2005) Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol* 100: 1509-1515.
98. Romero-Gomez M, Fernandez-Rodriguez CM, Andrade RJ, Diago M, Alonso S, et al. (2008) Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 48: 721-727.
99. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, et al. (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461: 399-401.
100. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, et al. (2009) Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461: 798-801.
101. Bonkovsky HL, Naishadham D, Lambrecht RW, Chung RT, Hoefs JC, et al. (2006) Roles of iron and HFE mutations on severity and response to therapy during retreatment of advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 131: 1440-1451.
102. Distanto S, Bjoro K, Hellum KB, Myrvang B, Berg JP, et al. (2002) Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection. *Liver* 22: 269-275.
103. Lebray P, Zylberberg H, Hue S, Poulet B, Carnot F, et al. (2004) Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 11: 175-182.
104. Olynyk JK, Reddy KR, Di Bisceglie AM, Jeffers LJ, Parker TI, et al. (1995) Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 108: 1104-1109.
105. Kageyama F, Kobayashi Y, Murohisa G, Shimizu E, Suzuki F, et al. (1998) Failure to respond to interferon-alpha 2a therapy is associated with increased hepatic iron levels in patients with chronic hepatitis C. *Biol Trace Elem Res* 64: 185-196.
106. Kaserer K, Exner M, Mosberger I, Penner E, Wrba F (1998) Characterization of the inflammatory infiltrate in autoimmune cholangitis. A morphological and immunohistochemical study. *Virchows Arch* 432: 217-222.
107. Piperno A, Sampietro M, D'Alba R, Roffi L, Fargion S, et al. (1996) Iron stores, response to alpha-interferon therapy, and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver* 16: 248-254.

108. Fargion S, Fracanzani AL, Sampietro M, Molteni V, Boldorini R, et al. (1997) Liver iron influences the response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9: 497-503.
109. Barbaro G, Di Lorenzo G, Ribersani M, Soldini M, Giancaspro G, et al. (1999) Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. *J Hepatol* 30: 774-782.
110. Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Murakami T, Ono K, et al. (1996) Hepatic iron contents and response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. Relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 41: 989-994.
111. Fracanzani AL, Conte D, Fraquelli M, Taioli E, Mattioli M, et al. (2001) Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease. *Hepatology* 33: 647-651.
112. Pietrangelo A (1998) Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *J Hepatol* 28 Suppl 1: 8-13.
113. Smith BC, Gorve J, Guzail MA, Day CP, Daly AK, et al. (1998) Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 27: 1695-1699.
114. Lopez-Rodriguez R, Trapero-Marugan M, Borque MJ, Roman M, Hernandez-Bartolome A, et al. Genetic variants of interferon-stimulated genes and IL-28B as host prognostic factors of response to combination treatment for chronic hepatitis C. *Clin Pharmacol Ther* 90: 712-721.
115. Sawhney R, Visvanathan K Polymorphisms of toll-like receptors and their pathways in viral hepatitis. *Antivir Ther* 16: 443-458.
116. Quaranta MG, Mattioli B, Vella S Glances in Immunology of HIV and HCV Infection. *Adv Virol* 2012: 434036.
117. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, et al. (2005) Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 128: 1437-1444.
118. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, et al. (2008) Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7034-7039.
119. McGilvray I, Feld JJ, Chen L, Pattullo V, Guindi M, et al. (2012) Hepatic cell-type specific gene expression better predicts HCV treatment outcome than IL28B genotype. *Gastroenterology* 142: 1122-1131 e1121.
120. Sixtos-Alonso MS, Sanchez-Munoz F, Sanchez-Avila JF, Martinez RA, Dominguez Lopez A, et al. IFN-stimulated gene expression is a useful potential molecular marker of response to antiviral treatment with Peg-IFNalpha 2b and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Arch Med Res* 42: 28-33.
121. Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, Realdon S, Ferrari A, et al. (2004) PKR gene expression and response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 9: 763-770.
122. Taylor MW, Tsukahara T, Brodsky L, Schaley J, Sanda C, et al. (2007) Changes in gene expression during pegylated interferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C virus distinguish responders from nonresponders to antiviral therapy. *J Virol* 81: 3391-3401.
123. Huang C, Chen H, Cassidy W, Howell CD (2008) Peripheral blood gene expression profile associated with sustained virologic response after peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis-C genotype 1. *J Natl Med Assoc* 100: 1425-1433.

124. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, et al. (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282: 103-107.
125. Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Neumann AU, et al. (2001) Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha2a. *Gastroenterology* 120: 1438-1447.
126. Abe H, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T, Tsuge M, et al. IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. *J Hepatol* 54: 1094-1101.
127. Tsai JF, Jeng JE, Ho MS, Chang WY, Lin ZY, et al. (1996) Independent and additive effect modification of hepatitis C and B viruses infection on the development of chronic hepatitis. *J Hepatol* 24: 271-276.
128. Pontisso P, Gerotto M, Benvegno L, Chemello L, Alberti A (1998) Coinfection by hepatitis B virus and hepatitis C virus. *Antivir Ther* 3: 137-142.
129. Monga HK, Rodriguez-Barradas MC, Breaux K, Khattak K, Troisi CL, et al. (2001) Hepatitis C virus infection-related morbidity and mortality among patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 33: 240-247.
130. Sherman KE, Shire NJ, Rouster SD, Peters MG, James Koziel M, et al. (2005) Viral kinetics in hepatitis C or hepatitis C/human immunodeficiency virus-infected patients. *Gastroenterology* 128: 313-327.
131. Aster V, Machala L, Rozsypal H, Jilich D, Staňková M (2008) Problematika virových hepatitid u HIV infikovaných osob. *Prakt Léč* 88: 637-642.
132. Corrao G, Arico S (1998) Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. *Hepatology* 27: 914-919.
133. Frieden TR, Ozick L, McCord C, Nainan OV, Workman S, et al. (1999) Chronic liver disease in central Harlem: the role of alcohol and viral hepatitis. *Hepatology* 29: 883-888.
134. Everhart J, Herion D (2000) *Hepatitis C virus and alcohol.*; Liang TJ, Hoofnagle HJ, editors. San Diego: Academic Press.
135. Romero-Gomez M, Grande L, Nogales MC, Fernandez M, Chavez M, et al. (2001) Intrahepatic hepatitis C virus replication is increased in patients with regular alcohol consumption. *Dig Liver Dis* 33: 698-702.
136. Sherman KE, Rouster SD, Mendenhall C, Thee D (1999) Hepatitis cRNA quasispecies complexity in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 30: 265-270.
137. Mukaiya M, Nishi M, Miyake H, Hirata K (1998) Chronic liver diseases for the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. Etiologic association of alcohol consumption, cigarette smoking and the development of chronic liver diseases. *Hepatogastroenterology* 45: 2328-2332.
138. Corrao G, Lepore AR, Torchio P, Valenti M, Galatola G, et al. (1994) The effect of drinking coffee and smoking cigarettes on the risk of cirrhosis associated with alcohol consumption. A case-control study. Provincial Group for the Study of Chronic Liver Disease. *Eur J Epidemiol* 10: 657-664.
139. Pessione F, Degos F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, et al. (1998) Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 27: 1717-1722.
140. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, et al. (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 266: 24398-24403.

141. Halliwell J, Gutteridge JMC, (2007) Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death.; Halliwell J, Gutteridge JMC, editors. New York: Oxford University Press.
142. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 28: 1456-1462.
143. Hodgson JM, Watts GF (2003) Can coenzyme Q10 improve vascular function and blood pressure? Potential for effective therapeutic reduction in vascular oxidative stress. *Biofactors* 18: 129-136.
144. Heller R, Unbehaun A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, et al. (2001) L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 276: 40-47.
145. Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM, et al. (2006) Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 80: 7199-7207.
146. Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG (1994) Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5987-5991.
147. Buettner GR, Jurkiewicz BA (1996) Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 145: 532-541.
148. Štípek S., al. (2000) Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha: Grada.
149. McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108: 652-659.
150. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, et al. (2002) Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122: 366-375.
151. Mottola G, Cardinali G, Ceccacci A, Trozzi C, Bartholomew L, et al. (2002) Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* 293: 31-43.
152. Pahl HL (1999) Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol Rev* 79: 683-701.
153. Murphy AN, Bredesen DE, Cortopassi G, Wang E, Fiskum G (1996) Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9893-9898.
154. Tardif KD, Waris G, Siddiqui A (2005) Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol* 13: 159-163.
155. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A (2001) Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9599-9604.
156. Abdalla MY, Ahmad IM, Spitz DR, Schmidt WN, Britigan BE (2005) Hepatitis C virus-core and non structural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. *J Med Virol* 76: 489-497.
157. Mahmood S, Kawanaka M, Kamei A, Izumi A, Nakata K, et al. (2004) Immunohistochemical evaluation of oxidative stress markers in chronic hepatitis C. *Antioxid Redox Signal* 6: 19-24.
158. Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Beraud M, et al. (2001) Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 276: 23077-23083.
159. Thoren F, Romero A, Lindh M, Dahlgren C, Hellstrand K (2004) A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in

- lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *J Leukoc Biol* 76: 1180-1186.
160. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, et al. (2001) Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 61: 4365-4370.
161. Forman HJ, Torres M, Fukuto J (2003) *Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles*. Boston: Kluwer Academic.
162. Naas T, Ghorbani M, Alvarez-Maya I, Lapner M, Kothary R, et al. (2005) Characterization of liver histopathology in a transgenic mouse model expressing genotype 1a hepatitis C virus core and envelope proteins 1 and 2. *J Gen Virol* 86: 2185-2196.
163. Korenaga M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, et al. (2005) Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 280: 37481-37488.
164. Rockey DC (2000) The cell and molecular biology of hepatic fibrogenesis. Clinical and therapeutic implications. *Clin Liver Dis* 4: 319-355.
165. Lonardo A, Adinolfi LE, Loria P, Carulli N, Ruggiero G, et al. (2004) Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology* 126: 586-597.
166. Poli G (2000) Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 21: 49-98.
167. Waris G, Siddiqui A (2005) Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J Virol* 79: 9725-9734.
168. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, et al. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98: 295-303.
169. Choi J, Lee KJ, Zheng Y, Yamaga AK, Lai MM, et al. (2004) Reactive oxygen species suppress hepatitis C virus RNA replication in human hepatoma cells. *Hepatology* 39: 81-89.
170. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Lee KJ, Levine AM, et al. (2004) Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *J Virol* 78: 8835-8843.
171. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID (2005) The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 7: 1040-1052.
172. Knobler H, Schattner A (2005) TNF- $\alpha$ , chronic hepatitis C and diabetes: a novel triad. *QJM* 98: 1-6.
173. Melhem A, Stern M, Shibolet O, Israeli E, Ackerman Z, et al. (2005) Treatment of chronic hepatitis C virus infection via antioxidants: results of a phase I clinical trial. *J Clin Gastroenterol* 39: 737-742.
174. Ko WS, Guo CH, Yeh MS, Lin LY, Hsu GS, et al. (2005) Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 11: 4697-4702.
175. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61: 748-755.
176. Maines MD (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554.
177. Exner M, Hermann M, Hofbauer R, Hartmann B, Kapiotis S, et al. (2004) Thiocyanate catalyzes myeloperoxidase-initiated lipid oxidation in LDL. *Free Radic Biol Med* 37: 146-155.

178. Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA (1996) Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2: 87-90.
179. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259: 381-384.
180. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH (2002) Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16093-16098.
181. Vitek L, Schwertner HA (2007) The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 43: 1-57.
182. Vitek L, Ostrow JD (2009) Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects. *Curr Pharm Des* 15: 2869-2883.
183. Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W (2003) Antiapoptotic action of carbon monoxide on cultured vascular smooth muscle cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 572-575.
184. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM (2002) Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235: 249-263.
185. Motterlini R, Gonzales A, Foresti R, Clark JE, Green CJ, et al. (1998) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ Res* 83: 568-577.
186. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, et al. (1998) Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 101: 604-612.
187. Li L, Grenard P, Nhieu JT, Julien B, Mallat A, et al. (2003) Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology* 125: 460-469.
188. Yachie A, Toma T, Mizuno K, Okamoto H, Shimura S, et al. (2003) Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 550-556.
189. Zhu Z, Wilson AT, Mathahs MM, Wen F, Brown KE, et al. (2008) Heme oxygenase-1 suppresses hepatitis C virus replication and increases resistance of hepatocytes to oxidant injury. *Hepatology* 48: 1430-1439.
190. Abdalla MY, Britigan BE, Wen F, Icardi M, McCormick ML, et al. (2004) Down-regulation of heme oxygenase-1 by hepatitis C virus infection in vivo and by the in vitro expression of hepatitis C core protein. *J Infect Dis* 190: 1109-1118.
191. Wen F, Brown KE, Britigan BE, Schmidt WN (2008) Hepatitis C core protein inhibits induction of heme oxygenase-1 and sensitizes hepatocytes to cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 24: 175-188.
192. Ghaziani T, Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, Pietschmann T, et al. (2006) HCV proteins increase expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and decrease expression of Bach1 in human hepatoma cells. *J Hepatol* 45: 5-12.
193. Lin JP, Vitek L, Schwertner HA Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease. *Clin Chem* 56: 1535-1543.
194. Yamaguchi T, Komoda Y, Nakajima H (1994) Biliverdin-IX alpha reductase and biliverdin-IX beta reductase from human liver. Purification and characterization. *J Biol Chem* 269: 24343-24348.
195. Pereira PJ, Macedo-Ribeiro S, Parraga A, Perez-Luque R, Cunningham O, et al. (2001) Structure of human biliverdin IXbeta reductase, an early fetal bilirubin IXbeta producing enzyme. *Nat Struct Biol* 8: 215-220.

196. Maines MD (2010) Potential application of biliverdin reductase and its fragments to modulate insulin/IGF-1/MAPK/PI3-K signaling pathways in therapeutic settings. *Curr Drug Targets* 11: 1586-1594.
197. Maines MD, Mayer RD, Erturk E, Huang TJ, Disantagnese A (1999) The oxidoreductase, biliverdin reductase, is induced in human renal carcinoma--pH and cofactor-specific increase in activity. *J Urol* 162: 1467-1472.
198. Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal-Somme J, Soler P, et al. (2010) Induction of heme oxygenase-1, biliverdin reductase and H-ferritin in lung macrophage in smokers with primary spontaneous pneumothorax: role of HIF-1alpha. *PLoS One* 5: e10886.
199. Mueller C, Zhou W, Vanmeter A, Heiby M, Magaki S, et al. (2010) The heme degradation pathway is a promising serum biomarker source for the early detection of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19: 1081-1091.
200. Miralem T, Hu Z, Torno MD, Lelli KM, Maines MD (2005) Small interference RNA-mediated gene silencing of human biliverdin reductase, but not that of heme oxygenase-1, attenuates arsenite-mediated induction of the oxygenase and increases apoptosis in 293A kidney cells. *J Biol Chem* 280: 17084-17092.
201. Florczyk UM, Jozkowicz A, Dulak J (2008) Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacol Rep* 60: 38-48.
202. Tudor C, Lerner-Marmarosh N, Engelborghs Y, Gibbs PE, Maines MD (2008) Biliverdin reductase is a transporter of haem into the nucleus and is essential for regulation of HO-1 gene expression by haematin. *Biochem J* 413: 405-416.
203. Ahmad Z, Salim M, Maines MD (2002) Human biliverdin reductase is a leucine zipper-like DNA-binding protein and functions in transcriptional activation of heme oxygenase-1 by oxidative stress. *J Biol Chem* 277: 9226-9232.
204. Kravets A, Hu Z, Miralem T, Torno MD, Maines MD (2004) Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 279: 19916-19923.
205. Ding B, Gibbs PE, Brookes PS, Maines MD (2011) The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters beta-adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *FASEB J* 25: 301-313.
206. Pawson T, Scott JD (2005) Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30: 286-290.
207. Kapitulnik J, Maines MD (2009) Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends Pharmacol Sci* 30: 129-137.
208. Qadri I, Iwahashi M, Capasso JM, Hopken MW, Flores S, et al. (2004) Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. *Biochem J* 378: 919-928.
209. Lin R, Wang Y, Fu W, Zhang D, Zheng H, et al. (2009) Common variants of four bilirubin metabolism genes and their association with serum bilirubin and coronary artery disease in Chinese Han population. *Pharmacogenet Genomics* 19: 310-318.
210. Goswami R, Sutton BS, Rouf C, Nelson S, Haynes C, et al. (2008) Biliverdin Reductase Genetic Polymorphisms are Associated with Early-Onset Coronary Artery Disease In Two Datasets. *Circulation* 118: S389-S390.
211. Lin R, Wang X, Wang Y, Zhang F, Fu W, et al. (2009) Association of polymorphisms in four bilirubin metabolism genes with serum bilirubin in three Asian populations. *Hum Mutat* 30: 609-615.

212. Gafvels M, Holmstrom P, Somell A, Sjovald F, Svensson JO, et al. (2009) A novel mutation in the biliverdin reductase-A gene combined with liver cirrhosis results in hyperbiliriverdinaemia (green jaundice). *Liver Int* 29: 1116-1124.
213. Nytofte NS, Serrano MA, Monte MJ, Gonzalez-Sanchez E, Tumer Z, et al. (2011) A homozygous nonsense mutation (c.214C->A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis. *J Med Genet* 48: 219-225.
214. Maines MD (2005) New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiology (Bethesda)* 20: 382-389.
215. Nakagami T, Taji S, Takahashi M, Yamanishi K (1992) Antiviral activity of a bile pigment, biliverdin, against human herpesvirus 6 (HHV-6) in vitro. *Microbiol Immunol* 36: 381-390.
216. Mori M, Yamaguchi K, Honda S, Nagasaki K, Ueda M, et al. (1991) Cancer cachexia syndrome developed in nude mice bearing melanoma cells producing leukemia-inhibitory factor. *Cancer Res* 51: 6656-6659.
217. Lehmann E, El-Tantawy WH, Ocker M, Bartenschlager R, Lohmann V, et al. (2010) The heme oxygenase 1 product biliverdin interferes with hepatitis C virus replication by increasing antiviral interferon response. *Hepatology* 51: 398-404.
218. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB (2009) Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49: 1335-1374.
219. Urbanek P, Husa P, Galsky J, Sperl J, Kumpel P, et al. (2008) [Standard diagnostic and therapeutic approach to the chronic infection with hepatitis C (HCV) virus]. *Cas Lek Cesk* 147: I-XII.
220. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, et al. (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 22: 696-699.
221. Vreman HJ, Stevenson DK (1988) Detection of heme oxygenase activity by measurement of CO In: Maines MD, Costa LG, Reed DJ, Sassa S, Sipes IG, editors. *Current Protocols in Toxicology* New York: John Wiley&Sons. pp. Unit 9.2.1-9.2.10.
222. Carriere M, Pene V, Breiman A, Conti F, Chouzenoux S, et al. (2007) A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication. *J Med Virol* 79: 155-160.
223. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
224. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
225. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL (1988) Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44: 837-845.
226. Jiraskova A, Novotny J, Novotny L, Vodicka P, Pardini B, et al. Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 131: 1549-1555.
227. Urbanek P (2011) Závěrečná zpráva o řešení grantového projektu IGA MZ ČR NR 9412-3/2007.
228. Urbanek P, Subhanova I, Janousova E, Dusek L, Marecek Z, et al. (2009) [Efficacy of combination treatment with pegylated interferon plus ribavirin in patients chronically infected with HCV]. *Vnitr Lek* 55: 474-479.
229. Peterhans E (1997) Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. *Biol Trace Elem Res* 56: 107-116.



230. Lieber CS (1997) Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 38: 601-628.
231. Tsui TY, Lau CK, Ma J, Wu X, Wang YQ, et al. (2005) rAAV-mediated stable expression of heme oxygenase-1 in stellate cells: a new approach to attenuate liver fibrosis in rats. *Hepatology* 42: 335-342.
232. Jiraskova A, Lenicek M, Vitek L Simultaneous genotyping of microsatellite variations in HMOX1 and UGT1A1 genes using multicolored capillary electrophoresis. *Clin Biochem* 43: 697-699.
233. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, et al. (2000) Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 66: 187-195.
234. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 55: 245-264.
235. Asselah T, Bieche I, Sabbagh A, Bedossa P, Moreau R, et al. (2009) Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut* 58: 846-858.
236. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, et al. (2010) Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 139: 120-129
237. Fattovich G, Covolo L, Bibert S, Askarieh G, Lagging M, et al. IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 33: 1162-1172.
238. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, et al. (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41: 1100-1104.
239. Frankova S, Bartakova R, Hejda V, Urbanek P, Husova L, et al. (2012) IL28 rs 12979860 CC genotype slows progression of liver disease in HCV infected patients. *Gastroenterologie a Hepatologie* 66: S17.
240. Schmitz G, Dotzauer A (1998) Proof of hepatitis A virus negative-sense RNA by RNA/DNA-hybrid detection: a method for specific detection of both viral negative- and positive-strand RNA species. *Nucleic Acids Res* 26: 5230-5232.
241. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Wang TH, Chen DS (1997) Positive and negative strand of hepatitis C virus RNA sequences in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C: no correlation with viral genotypes 1b, 2a, and 2b. *J Med Virol* 52: 270-274.
242. Pal S, Sullivan DG, Kim S, Lai KK, Kae J, et al. (2006) Productive replication of hepatitis C virus in perihepatic lymph nodes in vivo: implications of HCV lymphotropism. *Gastroenterology* 130: 1107-1116.
243. Lanford RE, Guerra B, Lee H, Chavez D, Brasky KM, et al. (2006) Genomic response to interferon-alpha in chimpanzees: implications of rapid downregulation for hepatitis C kinetics. *Hepatology* 43: 961-972.
244. He XS, Ji X, Hale MB, Cheung R, Ahmed A, et al. (2006) Global transcriptional response to interferon is a determinant of HCV treatment outcome and is modified by race. *Hepatology* 44: 352-359.
245. Kwo PY (2013) Boceprevir and treatment of chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis* 17: 63-72.
246. Maddur H, Kwo PY (2011) Boceprevir. *Hepatology* 54: 2254-2257.
247. Niepmann N (2009) Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1789: 529-541.

248. Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007) *Nature Reviews Microbiology* 5:453-463.
249. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Izawa Y, Kanematsu Y et al. (2004)  
Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol Sin* 25: 977-985.
250. Leininger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL (2006) Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol* 2: 620-8.
251. De Giorgi V, Buonaguro L, Worschech A, Tornesello ML, Izzo F, et al. (2013)  
Molecular Signatures Associated with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma and Liver Metastasis. *PLoS ONE* 8(2): e56153.

## 8 Přílohy

### Příloha 1

Subhanova I, Muchova L, Lenicek M, Vreman HJ, Luksan O, Kubickova K, Kreidlova M, Zima T, Vitek L, Urbanek P. *Expression of biliverdin reductase in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response in HCV-infected patients.*

**PLOS ONE 2013**;8(3): e57555.

### Příloha 2

Urbanek P, Lenicek M, Muchova L, Subhanova I, Dusek L, Kasprikova N, Hrabal P, Bruha R, Vitek L: No association of promoter variations in *HMOX1* and *UGT1A1* genes with liver injury in chronic hepatitis C.

**Annals of Hepatology 2011**;10(4): 445-451.

### Příloha 3:

Subhanova I, Vitek L, Muchova L, Lenicek M, Luksan O, Zima T, Vitek L, Urbanek P: Biliverdin reductase A expression in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response to antiviral therapy in chronic hepatitis C patients.

**The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American association for the Study of Liver Diseases.**

Nov 9-13, 2012, Boston, USA.

## 8.1 Příloha 1

Subhanova I, Muchova L, Lenicek M, Vreman HJ, Luksan O, Kubickova K, Kreidlova M, Zima T, Vitek L, Urbanek P. *Expression of biliverdin reductase A in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response in HCV-infected patients.*

**PLOS ONE 2013;8(3): e57555.**

## 8.2 Příloha 2

Urbánek P, Leníček M, Muchová L, Subhanová I, Dušek L, Kaspříkova N, Hrabal P, Brůha R, Víttek L: No association of promoter variations in *HMOX1* and *UGT1A1* genes with liver injury in chronic hepatitis C.

**Annals of Hepatology** 2011;10(4): 445-451.

### **8.3 Příloha 3**

Subhanová I, Vitek L, Muchová L, Leníček M, Lukšan O, Zima T, Vitek L, Urbánek P:  
Biliverdin reductase A expression in peripheral blood leukocytes is associated with treatment  
response to antiviral therapy in chronic hepatitis C patients.

**The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American association for the Study of Liver Diseases.**

Nov 9-13, 2012, Boston, USA.

## 9 Seznam publikovaných prací

### 9.1 Publikace týkající se tématu dizertační práce

#### 9.1.1 Práce v časopisech s IF

Subhanová I, Muchová L, Leníček M, Vreman HJ, Lukšan O, Kubíčková K, Kreidlová M, Zima T, Vítek L, Urbánek P. Expression of biliverdin reductase A in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response in HCV-infected patients.

**PLOS ONE 2013**;8(3) e57555.

**IF 4,09**

Urbánek P, Leníček M, Muchová L, Subhanová I, Dušek L, Kaspříková N, Hrabal P, Brůha R, Vítek L: No association of promoter variations in *HMOX1* and *UGT1A1* genes with liver injury in chronic hepatitis C.

**Annals of Hepatology 2011**;10(4): 445-451.

**IF 1,81**

#### 9.1.2 Práce v časopisech bez IF

Urbánek P, Subhanová I, Janoušová E, Dušek L, Mareček Z, Brůha R, Petrtýl J, Brodanová M: Účinnost terapie pegylovaným interferonem a ribavirinem u pacientů s chronickou HCV infekcí.

**Vnitř. Lék. 2009**;55(5): 474-479.

Friedecký B, Novotný D, Pavlík E, Plíšková L, Riedlová P, Subhanová I, Zima T, Žůrek D: Validace a verifikace molekulárně biologických metod založených na analýze extrahumánního genomu.

**Klinická biochemie a metabolismus 2006**;2: 118-124.

#### 9.1.3 Abstrakta v časopisech s IF

Subhanová I, Vítek L, Muchová L, Leníček M, Lukšan O, Zima T, Vítek L, Urbánek P: Biliverdin reductase A expression in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response to antiviral therapy in chronic hepatitis C patients.

**Hepatology 2012**;56(4S): 695-696.

Subhanová I, Muchová L, Leníček M, Víték L, Vreman HJ, Lukšan O, Zima T, Urbánek P. Heme oxygenase in peripheral blood mononuclear cells in HCV infected patients. **FEBS Journal** 2009;276 (S1): 268-269.

#### **9.1.4 Abstrakta v časopisech bez IF**

Subhanová, I, Muchová L, Leníček M, Víték L, Lukšan O, Zima T, Urbánek P: Může biliverinreduktáza predikovat odpovědávost HCV infikovaných pacientů na antivirovou terapii?

**Čes Slov Gastroenterol a Hepat** 2010;64:524.

Urbánek P, Kreidlová M, Dušek L, Mareček Z, Brůha R, Subhanová I, Petrály J: Rozvoj anemie koreluje s výsledkem léčby chronické HCV infekce.

**Čes Slov Gastroenterol a Hepat** 2010;64:526.

Subhanová I, Muchová L, Leníček M, Víték L, Vreman H.J, Lukšan O, Zima T, Urbánek P: Modulace exprese a aktivity hemoxygenázy u HCV infekce.

**Čes Slov Gastroenterol Hepat** 2009;63:144.

Subhanová I, Muchová L, Leníček M, Víték L, Zima T, Urbánek P: Aktivita hemoxygenázy v mononukleárech periferní krve u nemocných s HCV infekcí.

**Čes a Slov Gastroent a Hepatol** 2008;62(2):115.

## **9.2 Publikace týkající se jiných témat**

### **9.2.1 Práce v časopisech s IF**

Šperl J, Procházková J, Martásek P, Subhanová I, Fraňková S, Trunečka P, Jirsa M: N-acetyl Cysteine Averted Liver Transplantation in a Patient with Liver Failur Caused by Erythropoietic Protoporphyrria.

**Liver Transplantation** 2009;15(3): 352-354.

**IF 3,4**



Šperl J, Petrášek J, Fraňková S, Farrag S.M, Subhanová I, Vítek L, Jirsa M, Špičák J, Martásek P: Improvement of Liver Dysfunction after Treatment with N-acetyl cysteine in Patient with Erythropoetic Protoporphyrria.

**Journal of Hepatology** 2008;48: S333.

**IF 6,6**

Hřebíček M, Jirásek T, Hartmannová H, Nosková L, Stránecký V, Ivánek R, Kmoch S, Cebecauerová D, Vítek L, Mikulecký M, Subhanová I, Hozák P, Jirsa M: Rotor - type hyperbilirubinaemia has no defect in the canalicular bilirubin export pump.

**Liver International** 2007;27(4): 485-491.

**IF 3,8**

Cebecauerová D, Jirásek T, Budišová L, Mandys V, Volf V, Novotná Z, Subhanová I, Hřebíček M, Elleder M, Jirsa M: Dual Hereditary Jaundice: Simultaneous Occurrence of Mutations Causing Gilbert's and Dubin-Johnson Syndrome.

**Gastroenterology** 2005;129(1): 315-320.

**IF 13,0**