



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Linda Piekuse

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

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – molekulārā bioloģija, infektoloģija

Rīga, 2014

Promocijas darbs izstrādāts: Rīgas Stradiņa universitātes
Molekulārās ģenētikas zinātniskajā laboratorijā

Darba zinātniskais vadītājs:

Dr. med. profesors **Jāzevs Keiiss**,
SIA RAKUS stacionārs “Latvijas Infektoloģijas centrs”, Latvija

Darba zinātniskā konsultante:

Dr. med. **Valentīna Sondore**,
SIA RAKUS stacionārs “Latvijas Infektoloģijas centrs”, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. med. profesore **Ludmila Viksna**,
Rīgas Stradiņa universitātes Infektoloģijas un dermatoloģijas katedra,
SIA RAKUS stacionārs “Latvijas Infektoloģijas centrs”, Latvija

Dr. habil. biol. **Pauls Pumpēns**,
APP Biomedicīnas Pētījumu un studiju centrs, Latvijas Universitātes
Bioloģijas fakultāte, Molekulārās bioloģijas katedra, Latvija

Dr. habil. med. profesors **Alvidas Laiškonis**,
Lietuvas Veselības zinātņu universitāte, Lietuva

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2014. gada 2. jūlijā plkst. 15.00
Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē
Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā
un RSU mājas lapā: www.rsu.lv



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



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

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. asociētā profesore **Angelika Krūmiņa**

SATURS

Darbā lietotie saīsinājumi	4
1. Ievads	5
1.1. Zinātniskā darba aktualitāte un novitāte	6
1.1.1. Akūts toksisks alkohola hepatīts	6
1.1.2. Hronisks C vīrushepatīts.....	7
1.2. Zinātniskā darbā izvirzītā hipotēze	9
1.3. Zinātniskā darba mērķis un uzdevumi	9
2. Materiāls un metodes.....	11
2.1. Materiāls	11
2.1.1. Akūta toksiska hepatīta pacienti un kontroles grupa	11
2.1.2. Hroniska VHC pacienti un kontroles grupa	12
2.2. Metodes	14
2.3. Datu statistiskā apstrāde	16
3. Rezultāti.....	19
3.1. Akūta toksiska hepatīta pacientu raksturojums.....	19
3.2. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā 21	
3.3. Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem ATH pacientiem	23
3.4. VHC pacientu raksturojums	24
3.5. Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu un kontroles grupā	28
3.6. Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem un klīniskajiem rādītājiem pirms antivirālās terapijas	30
4. Diskusija	32
4.1. Aknu bojājumu nosakošie klīniskie un bioķīmiskie rādītāji akūta toksiska alkohola hepatīta pacientiem	32
4.2. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientiem	34
4.3. Klīniskie un bioķīmiskie rādītāji, kas raksturo CHC pacientus	37
4.4. Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu grupā un to ietekme uz slimības gaitu	41
5. Secinājumi	48
Publikācijas un ziņojumi par pētījuma tēmu	49
Izmantotā literatūra	52

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

ALAT – alanīnaminotransferāze

ASAT – aspartātaminotransferāze

BETA – regresijas koeficients

BKUS – Bērnu Klīniskā universitātes slimnīca

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

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

GGT – gamma–glutamīltransferāze

GST – glutationa S transferāze

GSTA – glutationa S transferāze alfa klase

GSTM – glutationa S transferāze mi klase

GSTP – glutationa S transferāze pi klase

GSTT – glutationa S transferāze teta klase

HCV – hepatīta C vīruss

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

MTHFR – metilēntetrahidrofolāt reduktāze

OR – izredžu attiecība (*odds ratio*)

p – p vērtība

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

RAKUS – Rīgas Austrumu Klīniskā universitātes slimnīca

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

RNS – ribonukleīnskābe

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

VHC – C vīrushepatīts

χ^2 – Hī kvadrāts

1. IEVADS

1.1. Zinātniskā darba aktualitāte un novitāte

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

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

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

1.1.1. Akūts toksisks alkohola hepatīts

Akūta toksiska alkohola izraisīta hepatīta izpēte ir nozīmīga, jo ir saistīta ar augstu mirstību stacionārā ~65% [Mathurin, 2003]. Pašlaik ir zināmi vairāki riska faktori, kas ietekmē aknu bojājuma smaguma pakāpi akūta alkohola izraisīta toksiska hepatīta gadījumā, piemēram, lietotā alkohola daudzums, tā piedevas, uzturs vai tā trūkums, kā arī dzimums, smagāk tas izpaužas sievietēm [Stewart, 2001]. Akūtam toksiskam alkohola izraisītam hepatītam ir nozīmīga vieta saslimstības statistikā arī Latvijā. Analizējot mirstības rādītājus – mirušo skaitu uz 100 000 iedzīvotājiem, kuru nāves iemels bijis alkohols, gan ilgstošā tā lietošana, gan arī nejaušas saindēšanās gadījumos, ir vērojams pīķis 2006. gadā (471 mirušo 2006. gadā, salīdzinoši – 2005. gadā – 371, 2004. gadā – 338 (Centrālās statistikas pārvaldes dati)), ko ir izraisījusi plaša saindēšanās ar nelegālo alkoholu Austrumeiropā, tai skaitā arī Latvijā, kuru, iespējams, ir izraisījusi saindēšanās ar poliheksametilēnguanidīna hidrochlorīdu [Ostapenko, 2011], bet šis toksiskais piejaukums nelegālajam alkoholam Latvijā laboratoriski netika identificēts.

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

Alkohola metabolisms organismā ierosina daudzas bioķīmiskās reakcijas, kas izraisa alkoholiķiem raksturīgos audu bojājumus un slimības. To iemesls ir hipoksija aknu audos, dažādu toksisku savienojumu veidošanās, brīvo skābekļa radikāļu formēšanās un izmaiņas šūnas oksidēšanās –

reducēšanās statusā, kas rada oksidatīvo stresu šūnās un vēlāk rada to bojājumu [Zakhari, 2006]. Lai novērstu brīvo skābekļa radikāļu veidoto šūnas bojājumu, šūnās darbojas vairāki mehānismi – mehāniska un bioķīmiska aizsardzība. Mehānisko aizsardzību veido šūnu un organoīdu membrānas. Bet bioķīmisko aizsardzību veido reparācijas mehānismi, antioksidanti, enzīmi (superoksīdismutāze, katalāze, peroksīdāze u.c.) un mazmolekulāri antioksidanti (glutations, urīnskābe, bilirubīns, histidīna dipeptīds, lipoilskābe u.c.) [Kohen, 2002].

Akūta toksiska hepatīta klīniskā smaguma novērtēšanai Eiropā tiek izmantotas vairākas skalas, kas iekļauj bioķīmiskos rādītājus, piemēram, bilirubīna līmeni, protrombīna laika/ INR attiecību, kreatinīna/urīnvielas attiecību, leikocītu skaitu, albumīna līmeni, vecumu [Mathurin, 2012].

Ģenētisko faktoru analīzes rezultāti alkohola izraisīta aknu bojājuma gadījumā ir pretrunīgi [STICKEL, 2006], tāpēc darbā tika plānots izpētīt glutaciona metabolismā iesaistīto enzīmu kodējošo gēnu (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTA1*, *GSTP1*) polimorfismu, bilirubīna metabolismā iesaistīto enzīmu kodējošā gēna *UGT1A1*, homocisteīna vielmaiņā iesaistītā metilēntetrafolātreduktāzes (MTHFR) kodējošā gēna *MTHFR*, alkohola metabolismā iesaistītā acetaldehīddehidrogenāzes kodējošā *ALDH2* gēna un N-acetilēšanā iesaistītā kodējošā gēna (*NAT2*) polimorfismus saistībā ar akūtu toksisku alkohola izraisītu hepatītu.

1.1.2. Hronisks C vīrushepatīts

Pašlaik pasaulē varētu būt ~3% (~130–210 miljonu) iedzīvotāju, kuriem ir C vīrushepatīts (CVH). Latvijā plašākais populācijas pētījums, lai noskaidrotu CVH prevalenci Latvijā, tika veikts 2008. gadā. Tajā tika noskaidrots, ka hepatīta C vīrusa antivielas (anti-HCV) ir sastopamas 2,4%, bet

RNS 1,7% Latvijas iedzīvotāju – kas nozīmē, ka aptuvenam pacientu skaitam Latvijā vajadzētu būt 39 000 pacientu [Tolmane, 2012a; Tolmane, 2011].

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

3/4 CVH pacientu akūtā infekcijas periodā nav nekādu klīniski izteiktu hepatītam raksturīgu simptomu. Apmēram 80% slimnieku akūtais hepatīts pāriet hroniskā formā, kas var progresēt, 1/4 hronisko pacientu, CVH netiek ārstēts 15–20 gadu laikā attīstās aknu ciroze vai vēzis. Hronisks CVH raksturojas ar dažādas smaguma pakāpes aknu iekaisuma un fibrozes progresēšanu neatkarīgi no HCV genotipa un vīrusa slodzes [2011]. Kā riska faktori tiek minēts alkohola lietošana [Omielinski, 2011], cukura diabēts [White, 2008], lielāks vecums, kad notikusi inficēšanās, ko–infekcija ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV) vai citiem hepatotropiem vīrusiem. Atkarībā no dažādu faktoru kombinācijām un neārstētā gadījumā ~10–40% attīstās aknu ciroze [Afdhal, 2004], nāve no cirozes izraisītām komplikācijām ir ~4% gadā [Thompson Coon, 2007].

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

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

Latvijā, tāpat kā pasaulē, standarta antivirālā terapija sastāv no ribavirīna un pegilētā interferona 2a vai 2b kombinācijas. Antivirālo terapiju ietekmējošie faktori ir gan no vīrusa genotipa atkarīgi, gan pacienta ģenētiskiem marķieriem

(piemēram, *IL28B* [EASI, 2011; Ghany, 2011]), gan citiem pacienta faktoriem – svars [Bressler, 2003], alkohola lietošana [Anand, 2006], insulīna rezistence [Romero–Gomez, 2005], aknu bojājuma pakāpe un citi [Manns, 2006].

Hroniska CVH atbildes reakcija uz antivirālo terapiju ir atkarīga arī no aknu šūnu iekaisuma, kuru var ietekmēt gēnu polimorfismi, kas ir saistīti ar dažādu mikroelementu vielmaiņas izmaiņām, piemēram, dzelzs (tā metabolismu ietekmē gēns *HFE* [Pietrangelo, 2004]), vara (tā metabolismu ietekmē gēns *ATP7B* [Harris, 2000]), dažādu aknu enzīmu sintēzes izmaiņu (piemēram, alfa1–antitripsīna, kuru kodē gēns *SERPINA1* [Kidd, 1983]), glutationa S transferāzes (piemēram, *GSTT1* un *GSTM1*), mazmolekulārie antioksidanti (piemēram, bilirubīns un tā metabolismu ietekmējošais gēns *UGT1A1* [Bosma, 1995; Datta, 2012]), un receptori uz leukocītu virsmas, kas ietekmē imunitāti (piemēram, hemokīna CC receptors, kuru kodē gēns *CCR5* [Katsounas, 2012]). Pētījumā tika noteiktas šo gēnu polimorfismu ietekme uz hroniska CVH klīnisko gaitu.

1.2. Zinātniskā darbā izvirzītā hipotēze

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

1.3. Zinātniskā darba mērķis un uzdevumi

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

Darba mērķa sasniegšanai nepieciešams veikt sekojošus darba uzdevumus:

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

2. MATERIĀLS UN METODEDES

2.1. Materiāls

Pētījums tika veikts saistībā ar Helsinu deklarāciju un ar RSU Medicīnas ētikas komiteja un LR Centrālās Ētikas komiteja izsniegtajām atļaujām. Visi pētījumā iesaistītie cilvēki parakstīja informētās piekrišanas formas, kas tika apstiprinātas LR Centrālās Ētikas komitejā.

2.1.1. Akūta toksiska alkohola hepatīta pacienti un kontroles grupa

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

Pacientu iekļaušanas kritēriji:

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

Pacientu izslēgšanas kritēriji:

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

Akūta toksiska alkohola izraisīta hepatīta diagnoze tika uzstādīta, balstoties uz anamnētiskiem (alkohola lietošana) un klīniskiem un bioķīmisko izmeklējumu datiem. Pacientu grupā bija 35 (58%) vīrieši un 25 (42%) sievietes ar vidējo vecumu $46,50 \pm 10,03$ gadi. 19 no pacientiem mira no toksiskā bojājuma izraisītajām sekām (9 vīrieši un 10 sievietes). Pacientiem slimības kulminācijas periodā tika noteikti šādi bioķīmiskie rādītāji – kopējais

un tiešais bilirubīns, sārmainā fosfatāze, holesterīns, protrombīns, hialuronskābe, leukocītu un eritrocītu skaits, limfocītu un granulocītu procentuālais daudzums, retikulocītu daudzums, EGR, ALAT, ASAT, GGT, citohroma C un citokeratīna–18 līmenis.

No visiem pētījumā iekļautajiem 12 pacienti bija pēc masīvas saindēšanās gadījuma Preiļu rajonā, kur tika identificēta vienas izcelsmes nelegālā alkohola iegūšanas vieta (divi no pacientiem mira), un, iespējams, toksisko hepatītu izraisīja nelegālajam alkoholam poliheksametilēnguanidīna hidrohlorīda [Ostapenko, 2011] piemaisījums, kas Latvijā netika laboratoriski pierādīts.

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

2.1.2. Hroniska CVH pacienti un kontroles grupa

Pacientu iekļaušanas kritēriji:

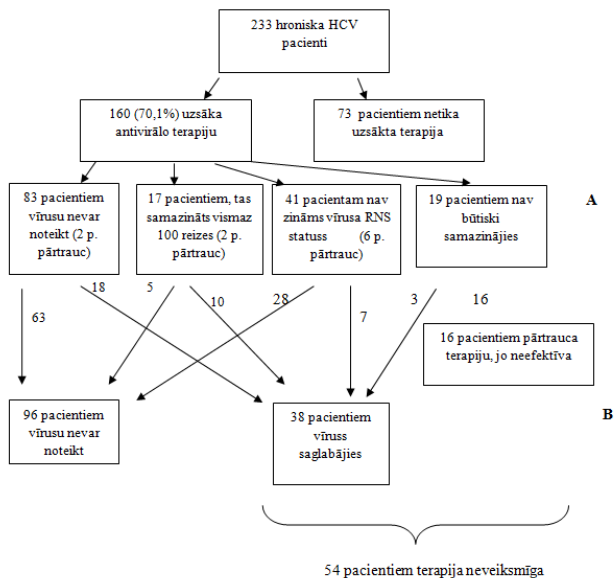
- vismaz 6 mēnešus ir bijusi pozitīva HCV–RNS, un anti HCV, kas noteikta SIA RAKUS stacionārā Latvijas Infektoloģijas centrā;
- ir pieejami bioķīmiskie un morfoloģiskie dati pirms terapijas vai diagnozes uzstādīšanas brīdī;
- ja pacients ir saņēmis antivirālo terapiju SIA RAKUS stacionārā Latvijas Infektoloģijas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

Pacientu izslēgšanas kritēriji:

- Netiek dota piekrišana dalībai pētījumā.

Kopā pētījumā tika iekļauti 233 pacienti, kuriem ir konstatēts HCV–RNS (125 (53,6%) vīrieši un 108 sievietes (46,4%)). Pacientiem diagnoze tika apstiprināta, nosakot HCV–RNS SIA RAKUS stacionārā Latvijas Infektoloģijas centrā. Diagnoze pacientiem tika uzstādīta laikā no 1992.–2009. Antivirālā terapija tika uzsākta 162 pacientiem laikā no 2001.–2013. gadam.

No visiem pacientiem 160 (70,1%) uzsāka kombinēto antivirālo terapiju – septiņi no pacientiem saņēma realdironu kopā ar ribavirīnu, un pārējie pegilēto interferonu ar ribavirīnu. Pacientu raksturojums ir attēlots 2.1. attēlā.



2.1.att. Hroniska CVH pacientu raksturojums

A – trešais mēnesis pēc antivirālās terapijas uzsākšanas,

B – antivirālās terapijas iznākums (noteikts 6 mēnešus pēc terapijas beigām)

Pacientus raksturojošie bioķīmiskie rādītāji tika iegūti no ambulatorajām kartēm: pirms terapijas tika ņemts vērā vīrusa genotips, vīrusa

slodze – noteikts HCV–RNS līmenis, ALAT, ASAT, GGT, dzelzs, ferritīna, hialuronskābes, citokeratīna, citohroma C, leikocītu un eritrocītu skaits, neitrofilu procentuālā daļa, hemoglobīns, morfoloģiskie izmeklējumi, nosakot Knodeļa histoloģiskās aktivitātes indeksu (HAI), izvērtējot periportālo, intralobulāro un portālo infiltrāciju, kā arī fibrozes izteiktību.

Pacientiem, kuriem tika uzsākta terapija, trešajā mēnesī pēc terapijas uzsākšanas un sešus mēnešus pēc terapijas beigšanas tika noteikts HCV–RNS kvalitatīvi vai kvantitatīvi (vīrusa slodze netika noteikta pacientiem ar vīrusa genotipu 3), ALAT līmenis, leikocītu skaits, neitrofilu procentuālā daļa, hemoglobīna līmenis un eritrocītu skaits.

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

2.2. Metodes

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

Akūta toksiska hepatīta pacientu analīzei tika izvēlēti funkcionāli polimorfismi, kas raksturīgi Eiropas populācijas iedzīvotājiem gan etanola metabolismā tieši iesaistītajos gēnos (*ALDH2*), gan arī gēnos, kas ietekmē oksidatīvo stresu šūnā (*GST*, *NAT2*, *UGT1A1*, *MTHFR*). Noteicošais faktors polimorfisma izvēlē bija pierādīts efekts uz gēnu ekspresiju un enzīma aktivitātes izmaiņām vai samazinājumu. Izvēlētos marķierus, to funkcionālo aktivitāti un analīzei izmantotās metodes skatīt 2.1. tabulā.

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

Gēns	Rs# (dbSNP)	Alēles funkcionālā aktivitāte salīdzinot ar normas variantu	Metode
<i>ALDH2</i>	rs671	Nulles aktivitāte [Crabb, 1989]	PCR-RFLP, izmantojot <i>AcuI</i> [Wang, 2002]
<i>UGT1A1</i>	rs8175347	Samazināta aktivitāte [Bosma, 1995]	Fluorescenta PCR, fragmentu analīze, izmantojot ABI Prism 310 ģenētisko analizatoru [Lin, 2006]
<i>GSTA1</i>	rs3957356	Samazināta aktivitāte [Coles, 2001]	PCR-RFLP, izmantojot <i>EamI</i> [Ping, 2006]
<i>GSTP1</i>	rs1695	Samazināta aktivitāte [Johansson, 1998]	PCR-RFLP izmantojot <i>Alw26I</i> [Harries, 1997]
<i>GSTT1</i>	Gēna delēcija	Nav aktīva enzīma [Pemble, 1994]	Multiplex PCR [Kondo, 2009]
<i>GSTM1</i>	Gēna delēcija	Nav aktīva enzīma [Seidegard, 1988]	Multiplex PCR [Kondo, 2009]
<i>MTHFR</i>	rs1801133	Samazināta aktivitāte [Frosst, 1995]	PCR-RFLP, izmantojot <i>HinfI</i> [Safarinejad, 2012]
<i>NAT2</i>	rs1799929 ^b	Normāla aktivitāte [Safarinejad, 2012; Leff, 1999]	PCR-RFLP, izmantojot <i>TaqI</i> [Gelatti, 2005]
	rs1799930	Samazināta aktivitāte [Garcia-Closas, 2011]	PCR-RFLP, izmantojot <i>KpnI</i> [Gelatti, 2005]
	rs1799931	Samazināta aktivitāte [Garcia-Closas, 2011]	PCR-RFLP, izmantojot <i>BamHI</i> [Gelatti, 2005]

^a nosaukums, kas tiek lietots saskaņā ar Cilvēka Ģenoma organizācijas nomenklatūru (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/), un references ģēnu secība no NCBI datubāzes (www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq).

^b SNP ir NAT2*5 haplotipa sastāvā, bet nav galvenais to veidojošais SNP

Hroniska CVH pacientiem tika analizēti molekulārie marķieri, kas nosaka monogēno aknu slimību attīstību (ģēnos *SERPINA1* (alfa 1–antitripsīna nepietiekamība), *UGT1A1* (Žilbēra sindroms), *HFE* (hereditārā hemohromatoze), *ATP7B* (Vilsona slimība), kā arī ģēnos, kas varētu ietekmēt iekaisuma procesus aknu šūnā un kuri nav iepriekš pētīti Latvijas populācijā

(*GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipi, marķieri *GSTAI*, *GSTP1*, *CCR5* gēnos). Izvēlētos marķierus, to funkcionālo aktivitāti un analīzei izmantotās metodes skatīt 2.2. tabulā.

2.2.tabula

Hroniska CVH pacientu analīzei izvēlētie ģenētiskie marķieri

Gēns	Rs# (dbSNP)	Alēles funkcionālā aktivitāte salīdzinot ar normas variantu	Metode
<i>UGT1A1</i>	rs8175347	Samazināta aktivitāte [Bosma, 1995]	Fluorescenta PCR, fragmentu analīze izmantojot ABI PRISM 310 ģenētisko analizatoru [Lin, 2006]
<i>GSTT1</i>	Gēna delēcija	Nav aktīva enzīma [Pemble, 1994]	Multiplex PCR [Kondo, 2009]
<i>GSTM1</i>	Gēna delēcija	Nav aktīva enzīma [Seidegard, 1988]	Multiplex PCR [Kondo, 2009]
<i>CCR5</i>	rs333	Samazināta aktivitāte [Samson, 1996]	PCR [Samson, 1996]
<i>ATP7B</i>	rs76151636	Samazināta aktivitāte [Thomas, 1995]	Bi Pasa PCR [Krumina, 2008]
<i>SERPINA 1</i>	rs28929474	Samazināta aktivitāte [Sambrook, 2006]	Bi Pasa PCR [Rieger, 1999]
	rs17580	Samazināta aktivitāte [Curiel, 1989]	Bi Pasa PCR [Rieger, 1999]
HFE	rs1800562	Samazināta aktivitāte [Feder, 1998]	PCR–RFLP, izmantojot restriktāzi – <i>RsaI</i> [Mura, 1997]
	rs1799945	Samazināta aktivitāte [Thomas, 1995]	PCR–RFLP, izmantojot restriktāzi – <i>MboI</i> [Wang, 2011]

2.3. Datu statistiskā apstrāde

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

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

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

Datu apstrādei tika izmantota PLINK datu statistiskās apstrādes programma [Purcell, 2007]. Lai izvērtētu alēļu asociāciju ar klīnisko fenotipu, tika izmantots hī kvadrāta (χ^2) tests, par ticamu uzskatot, ja $p < 0,05$, nosakot arī izredžu attiecību (OR – *odds ratio*) un 95% ticamības intervālu (CI 95%). Tā kā atsevišķi ģenētiskie marķieri atradās vienā hromosomā, tad tika veikta arī haplotipu analīze, haplotipu biežumu salīdzinājumam izmantojot Hī kvadrāta testu, par ticamu uzskatot, ja $p < 0,05$.

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

Bioķīmisko un klīnisko datu statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot datorprogrammas SPSS v.15.0. Pacientu parametru raksturošanai izmantotas vispārpieņemtās aprakstošās statistikas metodes, tika izvērtēti vidējās vērtības

(*mean*) un standartnovirze. Rādītāju atšķirības nozīme ir izvērtēta ar 5% statistiskās kļūdas varbūtību, tādējādi, ja testu rezultātos p vērtība bija mazāka vai vienāda ar 0,05, atšķirības starp pētījuma grupām tika atzītas par statistiski nozīmīgajām.

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

3. REZULTĀTI

3.1. Akūta toksiska hepatīta pacientu raksturojums

Pētījumā tika iekļauts 61 pacients (35 vīrieši (58%) un 25 sievietes (42%)) ar akūta toksiska hepatīta diagnozi, kuri bija stacionēti SIA RAKUS stacionārā „Latvijas Infektoloģijas centrs. 19 pacienti (deviņi vīrieši un desmit sievietes) stacionārā nomira no izraisītā aknu bojājuma. Pacientu hospitalizēšanas laiks bija no 2 nedēļām līdz 3 mēnešiem. Kontroles grupā bija 122 indivīdi (71 (58%) vīrieši un 51 (42%) sievietes) vecumā no 21–25 gadiem (vidējais vecums $22,3 \pm 3,1$ gadi).

3.1. tabula.

Bioķīmisko rādītāju raksturojums akūto toksisko pacientu grupā

Rādītājs	Pacientiem kopā		Vīrieši		Sievietes		P vērt.
	Vid.	SD	Vid.	SD	Vid.	SD	
Bilirubīns (μmol/l)	432,12	199,5	446,41	211,8	407,44	179,4	0,51
Tiesais bilirubīns (μmol/l)	315,35	183,9	336,68	201,9	278,61	145,6	0,29
Sārmainā fosfatāze(U/l)	673,84	776,6	761	827,3	521,31	676,6	0,33
Holesterīns (mmol/l)	6,29	5,9	7,84	6,3	3,75	3,9	0,02
Protrombīns %	61,82	34,8	73,07	35,5	43,28	24,8	0,00
Hialuronskābe (ng/ml)	566,28	459,6	581,5	424,3	554,1	508,5	0,90
Leikocīti (*10 ⁹ /l)	4,62	12,7	3,98	13,7	5,57	11,3	0,65
Limfocīti (%)	18,67	11,3	19,44	12,3	17,37	9,5	0,64
Granulocīti (%)	63,53	13,0	62,44	15,2	65,38	8,3	0,48
Eritrocīti (*10 ¹² /l)	3,05	0,88	3,35	0,8	2,54	0,8	0,00
Hemoglobīns (g/l)	120,09	110,2	125,12	127,3	112,43	79,6	0,68
Retikulocīti (‰)	24,77	13,6	21,85	13,1	28,78	13,5	0,09
EGR (mm/h)	57,48	32,8	57,93	31,4	56,76	35,8	0,91
ALAT (U/l)	81,58	142,9	75,58	53,3	91,37	225,3	0,70
ASAT (U/l)	138,08	121,7	121,58	71,3	165	174,9	0,22
GGT (U/l)	497,96	662,8	644,48	773,9	265,24	337,0	0,06
Citohroms C (ng/l)	0,88	1,9	1,13	2,3	0,60	1,5	0,39
Citokeratīns-18 (U/l)	1125,9	499,8	1088,8	504,2	1172,2	503,3	0,58

Salīdzinot bioķīmiskos rādītājus, kas tika noteikti slimības kulminācijas periodā, starp sievietēm un vīriešiem, statistiski ticamas atšķirības tika atrastas holesterīna, protrombīna līmeņa un eritrocītu skaita līmeņos (statistiski ticami augstāki rādītāji bija vīriešiem, $p < 0,05$) (rezultātus skatīt 3.1. tabulā).

Pacientu vidējais vecums bija $46,5 \pm 10,0$ gadi. Salīdzinot vecumu starp letālajiem un neletālajiem gadījumiem, netika atrasta statistiski ticama atšķirība (attiecīgi $43,9 \pm 10,9$ un $47,6 \pm 9,5$ gadi, $p = 0,183$, CI 95% 9,27–1,81) (pacientu bioķīmisko rādītāju starp abām grupām salīdzinājums attēlots 3.2. tabulā – statistiski ticami atšķīrās tikai protrombīna, limfocītu un citohroma C līmenis, kas bija augstāki izdzīvojušajiem pacientiem ($p \leq 0,05$)).

3.2. tabula

Akūtu toksisku hepatītu pacientu salīdzinājums

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

3.2. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientu grupā

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

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

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

Atsevišķi analizējot GST kodējošo gēnu marķierus, statistiski ticamas atšķirības tika atrastas kombinācijās starp *GSTT1* un *GSTMI* nulles /nenulles genotipiem (statistiski biežāk abi nenulles genotipi bija sastopami pacientu grupā ($p = 0,004$)). Analizējot GSTs četrus marķierus kopā, statistiski ticami biežāk kontroles grupā bija marķieru kombinācija, kas nosaka *GSTT1* nulles aktivitāti, *GSTMI*, *GSTAI* un *GSTPI* normālu aktivitāti. Rezultāti attēloti 3.3. tabulā. Pārbaudot, vai nav asociācijas starp smagāku toksiskā hepatīta izpausmi, tika salīdzināti alēļu biežumi 2 grupās – pacientiem ar letālo iznākumu un pacientiem, kuri atlabā. Statistiski ticama asociācija tika atrasta ar rs1799930 ($MAF_{\text{mirušajiem pacientiem}} = 0,395$ un $MAF_{\text{atlabušajiem pacientiem}} = 0,218$, $p = 0,045$, OR 2,340, CI 95% 1,006–5,441). Visu ģenētisko marķieru analīzes rezultāti attēloti 3.4. tabulā

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

Analizēto gēnu (marķieru) secība kombinācijā	Alēļu kombinācija	Biežums kontroles grupa	Biežums pacientu grupā	χ^2	P vērtība
<i>GSTT1/ GSTM1</i>	T0M1	0,133	0,067	6,565	0,010
	T1M1	0,233	0,372	8,094	0,004
GSTT1/ GSTM1/ GSTA1/ GSTP1	T0M1TA	0,057	0,016	5,23	0,022
	T1M1CA	0,089	0,167	4,183	0,041

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

Ģenētisko marķieru analīze mirušajiem un izdzīvojušajiem pacientus

Rs# (dbSNP)	Gēns	Retākā alēle (MAF)	MAF mirušajiem pacientiem (n = 19)	MAF izdzīvojušajiem pacientiem (n = 41)	P vērt.	OR	CI 95%
rs1801133	<i>MTHFR</i>	T	0,472	0,312	0,09	1,96	0,87–4,41
–	<i>GSTM1</i>	Nulles genotips	0,421	0,341	0,40	1,40	0,63–3,08
–	<i>GSTT1</i>	Nulles genotips	0,263	0,171	0,23	1,73	0,68–4,36
rs4124874	<i>UGT1A1</i>	(TA) ₇	0,368	0,402	0,72	0,86	0,39–1,95
rs3957356	<i>GSTA1</i>	T	0,394	0,451	0,56	0,79	0,36–1,73
rs1799929	<i>NAT2</i>	C	0,447	0,487	0,68	0,85	0,39–1,85
rs1799930	<i>NAT2</i>	G	0,395	0,218	0,04	2,34	1,01–5,44
rs1695	<i>GSTP1</i>	G	0,289	0,321	0,73	0,86	0,37–2,01

3.3. Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem ATH pacientiem

Izmantojot lineāro regresiju pēc aditīvā modeļa, tika pārbaudīta ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem. Statistiski ticama asociācija tika atrasta starp *GSTM1* un *GSTT1* gēnu nulles genotipiem un *NAT2* gēna marķieriem (statistiski ticamos rezultātus skatīt 3.5. tabulā, visus rezultātus skatīt pielikumā). *GSTM1* nulles genotips bija saistīts ar kopējā bilirubīna līmeni (BETA = 67,23, $p = 0,014$) indivīdiem ar nulles genotipu vidējais bilirubīna līmenis ir $362,62 \pm 205,44$, bet ar nenulles genotipu – $497,09 \pm 182,53$ ($p = 0,014$); ar tiešo bilirubīnu (BETA = 53,89, $p = 0,023$) indivīdiem ar nulles genotipu vidējais tiešā bilirubīna līmenis ir $287,32 \pm 173,28$, bet ar nenulles genotipu – $397,55 \pm 169,13$ ($p = 0,20$). Izmantojot kovariātus, vislielākā ietekme bija pacienta vecumam. *GSTT1* nulles genotips bija saistīts ar protrombīna līmeni (BETA = -11,05, $p = 0,037$, indivīdiem ar nulles genotipu vidējais protrombīna līmenis ir $40,87 \pm 23,56$, bet ar nenulles genotipu – $62,93 \pm 33,67$ ($p = 0,037$) un hialuronskābi (BETA = 170,4, $p = 0,014$, indivīdiem ar nulles genotipu vidējais hialuronskābes līmenis ir $899,58 \pm 443,15$, bet ar nenulles genotipu – $512,81 \pm 444,34$ ($p = 0,009$)).

NAT2 gēna alēles rs1799929 un rs1799930 parādīja pretēju asociāciju – rs1799929 bija negatīva asociācija ar GGT (BETA = -261,3, $p = 0,018$), sārmaino fosfatāzi (BETA = -270,5, $p = 0,032$) un holesterīnu (BETA = -2,254, $p = 0,018$). rs1799930 alēlei bija pozitīva asociācija ar bilirubīnu (BETA = 86,17, $p = 0,045$), gamma glutamiltransferāzi (BETA = 325.8, $p = 0.011$) un sārmaino fosfatāzi (BETA = 374.8, $p = 0.011$). Saistību ar GGT ietekmēja tas, vai pacients stacionārā mira vai izdzīvoja ($p_{\text{koriģēts pēc terapijas iznākuma}} = 0.004$).

Ģenētisko marķieru asociācija ar bioķīmiskajiem rādītājiem akūta toksiska hepatīta pacientiem

Bioķīmiskais rādītājs	Rs# (dbSNP)	Gēns	BETA	P vērtība (neko- riģēta)
Bilirubīns	–	<i>GSTM1</i>	67,2	0,014
	rs1799930	<i>NAT2</i>	86,2	0,045
Tiešais bilirubīns	–	<i>GSTM1</i>	53,9	0,023
GGT	rs1799929	<i>NAT2</i>	–261,3	0,018
	rs1799930	<i>NAT2</i>	325,8	0,011
Sārmainā fosfatāze	rs1799929	<i>NAT2</i>	–270,5	0,032
	rs1799930	<i>NAT2</i>	374,8	0,011
Holesterīns	rs1799929	<i>NAT2</i>	–2,25	0,018
Protrombīns		<i>GSTT1</i>	–11,05	0,037
Hialuronskābe		<i>GSTT1</i>	170,4	0,014

3.4. VHC pacientu raksturojums

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

Pacientu bioķīmiskais raksturojums un salīdzinājums starp dzimumiem parādīts tabulā 3.6. Vīriešiem statistiski ticami augstāki bija ALAT, GGT un dzelzs līmenis kā arī leikocītu skaits ($p < 0,05$), salīdzinot ar sievietēm. Eritrocītu skaits un hemoglobīna līmenis bija augstāks vīriešiem, kas būtu skaidrojams arī ar atšķirīgām normām starp dzimumiem. 182 pacientiem tika noteikts vīrusa genotips – 71,4% bija genotips 1, 5,5% genotips 2 un 23,1% bija genotips 3, 51 pacientam (21,9%) vīrusa genotips netika noteikts vai ambulatorajā kartē nebija atzīmēts. Salīdzinot savā starpā bioķīmiskos rādītājus pacientiem ar 1. genotipu pret pārējiem genotipiem – statistiski ticami atšķīrās

tikai ALAT līmenis – 1. genotipam $95,79 \pm 68,48$, 2. un 3. genotipam $119 \pm 159,42$, $p = 0,018$, citi rezultāti nav parādīti. Salīdzinot bioķīmiskos rādītājus starp pirmo un pārējiem genotipiem, statistiski ticami atšķīrās ALAT (1. genotipam $95,79 \pm 68,48$ U/l, 2. un 3. genotipam $135,51 \pm 120,86$ U/l, $p = 0,06$), citokeratīns–18 (1. genotipam $315,03 \pm 318,53$ U/l, 2. un 3. genotipam $465,27 \pm 472,76$ U/l, $p = 0,045$).

3.6. tabula

Pacientu raksturojums CVH diagnozes uzstādīšanas brīdī, salīdzinājums starp dzimumiem

Rādītājs	Pacientiem kopā		Vīriešiem		Sievietēm		p vērtība
	Vid.	SD	Vid.	SD	Vid.	SD	
CVH atklāšanas vecums	38,73	12,88	37,62	13,52	40,03	38,73	0,156
HCV slodze	2,6 E+6	5,3 E+7	2,7 E+6	5,2 E+7	2,4 E+6	5,5 E+7	0,725
ALAT (U/l)	102,8 5	86,13	116,8 8	92,83	86,72	74,95	0,008
ASAT (U/l)	65,49	61,86	71,68	73,01	58,56	45,67	0,123
GGT (U/l)	70,49	80,64	86,33	96,23	54,49	57,18	0,005
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	24,26	9,82	26,43	9,21	19,92	9,75	0,006
Feritīns (ng/ml)	430,0	757,8	460,5	476,4	367,5	1150	0,640
Hialuronskābe (ng/ml)	52,76	95,31	46,29	52,76	59,05	123,5	0,427
Citokeratīns–18 U/l	340,9	342,2	352,2	399,2	330,0	278,7	0,685
Citohroms (ng/l)	0,39	1,08	0,39	0,69	0,39	1,36	0,984
Leikocītu skaits ($\cdot 10^9/l$)	5,89	1,63	6,11	1,66	5,65	1,56	0,036
Neitrofilu (%)	54,47	9,56	55,13	9,27	53,71	9,88	0,263
Eritrocītu skaits ($\cdot 10^{12}/l$)	4,72	0,49	4,91	0,48	4,5	0,40	0,000
Hb (g/l)	14,63	1,57	15,34	1,36	13,82	1,38	0,000
HAI	6,70	3,02	6,81	2,98	6,58	3,08	0,565

Savukārt, tā kā 3. vīrusa genotipam tiek aprakstīta izteiktāka steatozes attīstība, salīdzinot ar citiem genotipiem, tika salīdzināti bioķīmiskie dati

diagnozes brīdī starp 3. un 1./2. vīrusa genotipiem. Statistiski ticamas atšķirības tika atrastas starp šādiem rādītājiem: ALAT (1./2. genotipam ALAT līmenis $97,48 \pm 77,8$ U/l, 3. genotipam $139,43 \pm 11,84$ U/l, $p = 0,006$), ASAT (1./2. genotipam ASAT līmenis $61,18 \pm 53,08$ U/l, 3. genotipam $81,34 \pm 75,62$ U/l, $p = 0,009$).

12 pacientiem morfoloģiski tika konstatēta aknu ciroze. Salīdzinot bioķīmiskos rādītājos pacientu grupās ar un bez cirozes, statistiski ticami atšķirās ALAT, ASAT, GGT, citokeratīns-18 un hialuronskābes līmenis pirms terapijas uzsākšanas. Statistiski ticamie rezultāti attēloti tabulā 3.7.).

3.7. tabula

Bioķīmisko rādītāju raksturojums pacientiem bez vai ar aknu cirozi

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

^a Aknu biopsija netika veikta 13 hroniska CVH pacientiem, ^b p vērtība aprēķināta izmantojot Manna–Vītņija tests, kas ir piemērots neparametriskajiem datiem

Salīdzinot cirozes sastopamības biežumu starp vīrusu genotipiem, statistiski ticamas atšķirības ($p < 0,05$) netika atrastas, ne salīdzinot katru vīrusu genotipi atsevišķi, ne salīdzinot atsevišķi trešo vīrusa genotipu pret pārējiem diviem iespējamiem genotipiem.

Antivirālo terapijas rezultāts tika izvērtēts 150 pacientiem (tika izslēgti pacienti, kuri personīgu iemeslu dēļ pārtrauca terapiju) – SVR tika sasniegta 46 (57,5%) vīriešu un 50 (71%) sievietes (OR = 1,488, $p = 0,077$, CI 95% 0,949–2,332). Salīdzinot savā starpā pacientus, kuriem antivirālā terapija bija veiksmīga (sasniegta SVR), ar tiem, kuriem tā bija neveiksmīga (neatbildētāji un tiem, kuriem pēc terapijas tika konstatēts HCV RNS),

statistiski ticami zemāki bija GGT un hialuronskābes līmenis, fibrozes rādītāji un HAI kopējais indekss un augstāks leikocītu skaits un ($p < 0,05$) (rezultāti attēloti 3.8. tabulā).

3.8. tabula

Pacientu salīdzinājums ar efektīvu un neefektīvu antivirālo terapiju

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

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

Viens no terapijas efektivitātes riska faktoriem ir izteikta aknu audu fibroze, un tās izteiktākā forma ir aknu ciroze. Savā starpā tika salīdzināta terapijas efektivitāte pacientiem ar un bez aknu cirozes. Starp pacientiem, kas saņēma terapiju, 143 pacientiem tika veikta aknu biopsija un 9 pacientiem tika

konstatēta aknu ciroze. SVR tika sasniegta 89 (66,42%) pacientiem bez cirozes un 3 (33,33%) pacientiem bez cirozes ($p = 0,045$).

3.5. Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu grupā

Salīdzinot analizēto marķieru biežumus kontroles un hroniska CVH grupās, statistiski ticami atšķīrās *GSTM1* nenulles genotips (OR = 1,487, $p = 0,0052$), *GSTT1* nulles genotips (OR 1,621, $p = 0,0226$) un *CCR5* del32 alēle (OR 1,675, $p = 0,0026$) (rezultāti attēloti 3.9.tabulā).

3.9. tabula

Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu un kontroles grupā

Rs# (dbSNP)	Gēns	Retākā alēle	MAF CVH grupā	MAF kont. grupā	P vērt.	OR	CI 95%
gstm1	<i>GSTM1</i>	M1	0,536	0,437	0,005	1,487	1,125–1,966
gstt1	<i>GSTT1</i>	T0	0,156	0,102	0,023	1,621	1,067–2,46
rs8175347	<i>UGT1A1</i>	(TA) ₇	0,359	0,354	0,879	1,024	0,757–1,384
rs333	<i>CCR5</i>	D	0,245	0,162	0,003	1,675	1,195–2,348
rs1800562	<i>HFE</i>	Y	0,047	0,034	0,401	1,315	0,663–2,607
rs1799945	<i>HFE</i>	D	0,128	0,120	0,702	1,077	0,728–1,593
rs76151636	<i>ATP7B</i>	Q	0,016	0,007	0,192	2,228	0,648–7,661
rs28929474	<i>SERPINA1</i>	PIZ	0,016	0,023	0,489	0,666	0,209–2,123
rs17580	<i>SERPINA1</i>	PIS	0,016	0	0,066	NA	NA

Ģenētisko marķieru analīze tika veikta 150 pacientiem, kuriem tika uzsākta terapija un tā netika pārtraukta nemedicīnisku indikāciju dēļ. 96 pacientiem terapija bija veiksmīga, tika sasniegta SVR, bet 56 pacientiem terapija nebija veiksmīga (19 pacienti bija totāli neatbildētāji un 16 no viņiem terapija tika pārtraukta).

Savstarpēji salīdzinot pacientus ar sasniegtu SVR un neefektīvu terapiju (rezultāti attēloti tabulā 3.10.), statistiski ticami atšķīrās tikai *CCR5* gēna 32bp

delēcija, kas bija biežāka pacientiem ar neefektīvu terapiju – vīrusa persistēšanu pēc antivirālās terapijas beigām ($MAF_{\text{neefektīvu terapiju}} = 0,3723$, $MAF_{\text{SVR}} = 0,1625$, $p = 0,0002$, $OR = 3,057$, $CI_{95\%} 1,69-5,13$), atsevišķi salīdzinot vīriešiem – $MAF_{\text{neefektīvu terapiju}} = 0,3167$, $MAF_{\text{SVR}} = 0,1$, $p = 0,0013$, $OR = 4,171$, $CI_{95\%} 1,678-10,37$ un sievietēm – $MAF_{\text{neefektīvu terapiju}} = 0,4706$, $MAF_{\text{SVR}} = 0,225$, $p = 0,0087$, $OR = 3,062$, $CI_{95\%} 1,304-7,19$.

3.10. tabula

Alēļu asociācija ar SVR sasniegšanu

Rs# (dbSNP)	Gēns	Retākā alēle	MAF pacientiem ar neefektīvu terapiju	MAF SVR pacientu grupā	p vērtība	OR	CI 95%
–	<i>GSTM1</i>	M0	0,436	0,474	0,586	0,859	0,495– 1,487
–	<i>GSTT1</i>	T0	0,128	0,132	0,943	0,971	0,430– 2,189
rs175347	<i>UGT1A1</i>	(TA) ⁷	0,396	0,355	0,503	1,192	0,712– 1,995
rs333	<i>CCR5</i>	D	0,372	0,163	0,0001	3,057	1,69– 5,53
rs1800562	<i>HFE</i>	Y	0,041	0,073	0,287	0,540	0,171– 1,704
rs1799945	<i>HFE</i>	D	0,1	0,115	0,693	0,852	0,384– 1,888
rs76151636	<i>ATP7B</i>	Q	0,029	0,022	0,709	1,333	0,292– 6,078
rs28929474	<i>SERPINA</i> <i>I</i>	PIZ	0,009	0,028	0,309	0,343	0,039– 2,974
rs17580	<i>SERPINA</i> <i>I</i>	PIS	0,019	0,011	0,57	1,76	0,244– 12,69

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

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

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

Veicot lineārās regresijas analīzi, asociācijai ar bioķīmiskajiem un morfoloģiskajiem datiem diagnozes uzstādīšanas brīdī, iegūtie dati tika koriģēti pēc dzimuma un vecuma, gan arī pēc dzimuma, vecuma un genotipa kopā.

Statistiski ticami rezultāti tika iegūti asociācijai starp *PIZ* alēli, kas saistīta ar paaugstinātu citohroma un hialuronskābes līmeni, *PIS* alēli, kas saistīta ar paaugstinātu hialuronskābes un samazinātu hemoglobīna līmeni (statistiski ticamā asociācija pazuda, kad vērtības tika koriģētas pēc dzimuma, dzimuma un vecuma vai dzimuma, vecuma un genotipa), *GSTMI* nenulles genotips ar paaugstinātu citokeratīna līmeni, samazinātu HAI indeksu, un samazinātu hemoglobīna līmeni (statistiski ticamā asociācija pazuda, kad vērtības tika koriģētas pēc dzimuma, dzimuma un vecuma vai dzimuma, vecuma un genotipa) un *UGT1A1* gēna (TA)⁷ alēli, kas bija saistīta ar paaugstinātu citokeratīna līmeni (rezultāti attēloti 3.11. tabulā).

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

	SNP	Alēle	BETA	p vērtība
Citohroms C	rs28929474	PIZ	1,657	3,969e-005
Citokeratīns-18	–	M1	86,41	0,0153
	rs8175347	(TA) ⁷	99,92	0,0498
	rs17580	PIS	460,1	0,0005
Hialuronskābe	rs28929474	PIZ	166,4	0,0001
	rs17580	PIS	103,8	0,0101
Hb pirms	–	M1	-0,345	0,0266
	rs17580	PIS	-1,183	0,0521
Fibroze	rs28929474	PIZ	0,819	0,0753
HAI	–	M1	-0,7737	0,0083

4. DISKUSIJA

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

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

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

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

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

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

Sārmainā fosfatāze, līdzīgi kā GGT, tiek aprakstīta kā specifiskāka alkohola izraisīta hepatīta rādītājs [Perrillo, 1978], bet mūsu pacientu grupā nebija iespējams izvērtēt tās salīdzinājumu ar kontroles grupu, bet salīdzinājumā ar references intervālu (0–117U/l) vidējās vērtības pacientu grupā bija palielinātas (673 U/l), bet nevienā no pašlaik plaši izmantotajām skalām sārmainā fosfatāze netiek iekļauta kā rādītājs, lai noteiktu alkohola izraisīta hepatīta smagumu [Mathurin, 2012]. Pacientu grupā, izvērtējot un salīdzinot dažādas apakšgrupas (sievietes/vīrieši, letālie/neletālie gadījumi), netika atrastas statistiski ticamas atšķirības tās līmeņos.

4.2. Ģenētisko marķieru analīze akūta toksiska hepatīta pacientiem

Pētījumā tika iekļauti 10 ģenētiskie marķieri, kas tika noteikti akūta toksiska hepatīta pacientiem, divi no tiem tika izslēgti no tālākās analīzes, jo *ALDH2* gēna marķieris bija monomorfis, kā jau iepriekš tas ir aprakstīts eiropiešu izcelsmes populācijās [Wang, 2002], un *NAT2* gēna alēle G857A (rs1799931), jo tās biežums bija mazāks kā 0,05. Analizējot pārējos ģenētiskos marķierus akūta toksiska alkohola hepatīta pacientu grupā, statistiski ticami rezultāti tika konstatēti, analizējot *GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipus, kā arī *NAT2* gēnā esošos marķierus.

GSTs kodējošie gēni ir iesaistīti oksidatīvā stresa samazināšanā. Saistībā ar alkohola metabolismu vai ar tā lietošanu izraisītām slimībām visvairāk ir pētīti *GSTM1* un *GSTT1* nulles genotipi. Mūsu pētījumā tika atklāts, ka akūta toksiska hepatīta pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, ir biežāks *GSTT1* nulles genotips (OR = 2,174, $p = 0,004$), kā arī *GSTT1* un *GSTM1* nenulles genotipu kombinācija ir sastopama biežāk akūta toksiska hepatīta grupā, salīdzinot ar kontroles grupu ($p = 0,004$). Saistībā ar alkohola lietošanu *Marcos*

et al. ir veikuši meta–analīzi, apkopojot informāciju no 15 dažādiem pētījumiem, kuros tika noteikta *GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipu un *GSTP1* gēna Ile105Val alēles biežums alkoholiķiem ar un bez cirozes, kā arī kontroles grupai. Statistiski ticama asociācija tika atrasta tikai ar *GSTM1* nulles genotipu un tikai, salīdzinot alkoholiķu grupas savā starpā – ar/bez alkohola izraisītu aknu slimību (OR = 1,43, CI95% 1,14–1,78); un pacientiem ar/bez alkohola izraisītu cirozi (OR = 1,40, CI 95% 1,11–1,77), bet ne ar kontroles grupu (OR = 1,09, CI 95% 0,87–1,37) [Marcos, 2011]. Rezultātu nesakritība ar *GSTM1* nulles genotipu mūsu pētījumā varētu būt saistīta gan ar izvēlētas pacientu grupas lielumu, gan arī ar to, ka mūsu izvēlētajai pacientu grupai ne vienmēr bija zināma alkohola lietošanas anamnēze, un tie tika analizēti kā akūta toksiska hepatīta pacienti, nevis hroniski alkohola lietotāji, pretēji Marcos *et al.* aprakstītajos pētījumos, kuros bija iekļauti hroniski alkohola lietotāji ar/bez alkohola izraisītu aknu slimību/cirozi [Marcos, 2011]. *GSTM1* nulles genotips mūsu pacientu grupā saistās ar paaugstinātu bilirubīna līmeni (kopējo bilirubīna un tiešo bilirubīnu). *GSTM1* nulles genotips tiek saistīts ar hiperbilirubinēmiju jaundzimušo vecumā, kas tiek skaidrots ar *GSTM1* un *GSTA1* līdzību bilirubīna piesaistē un līdz ar to arī konjugēšanā [Muslu, 2008]. Vēlākā vecumā *GSTM1* saistība ar bilirubīnu tiek aprakstīta saistībā ar hepatotoksisku medikamentu lietošanu.

Marcos et al., veiktajā meta–analīzes pētījumā netika atrasta asociācija ar *GSTT1* nulles genotipu un alkohola izraisītu aknu bojājumu [Marcos, 2011]. Skaidrojums, kāpēc mūsu pētījumā tika atrasta saistība ar *GSTT1* nulles genotipu un akūtu toksisku hepatītu, salīdzinot ar kontroles grupu, varētu būt vairāk saistīts ar nelegālā alkoholā esošo piemaisījumu atindēšanu, jo kā viens no specifiskiem substrātiem tiek minēts benzēns [Qu, 2005], kas var veidoties dažādos dzērienos, kuros ir nātrija benzoāts un askorbīnskābe, kā arī ar izvēlētas populācijas lielumu. *GSTT1* nulles genotips mūsu pētījuma grupā bija saistīts arī ar samazinātu protrombīna līmeni, iespējams, ka *GSTT1* nulles

genotips ietekmē aknu bojājumu, jo protrombīns tiek lietots kā aknu bojājuma marķieris aknu mazspējas gadījumā [Robert, 1996]. Saistība starp *GSTT1* nulles genotipu un aknu bojājumu tiek aprakstīta saistībā ar medikamentu izraisītu idiosinkrātisku bojājumu [Lucena, 2008], bet saistība ar protrombīna līmeni netika apskatīta.

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

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

aknu bojājumu, kas paskaidro arī lēnās acetilēšanas nosakošās alēles biežāko sastopamību mirušajiem pacientiem mūsu pētījumā.

C481T alēle ir iekļauta haplotipā, kas nosaka lēnu acetilēšanu, bet par atsevišķu šī polimorfisma aktivitāti ir pretrunīgi viedokļi [*Safarinejad, 2012*]. Mūsu pētījuma grupā veiktā analīze pierāda, ka alēlēm C481T un A590G ir pretēja aktivitāte, gan veicot lineārās regresijas analīzi, gan arī salīdzinot vidējos bioķīmiskos rādītājus starp genotipiem. Statistiski ticami atšķirās GGT un sārmainās fosfatāzes līmeņi starp indivīdiem ar dažādiem genotipiem. Abi rādītāji bija augstāki pacientiem ar lēnu acetilēšanu, kas apstiprinātu smagāka aknu bojājuma attīstību pacientiem ar lēnu acetilēšanu.

Skaidrojums, kāpēc mūsu pētījumā netika atrasta saistība starp *UGT1A1* gēna polimorfismu, kas arī pēc plaša genoma asociācijas pētījumiem ir galvenais ģenētiskais marķieris saistīts ar bilirubīna līmeni [*Lieber, 2000*], varētu būt mazā pētāmā pacientu grupa, kā arī tas, ka etanols izmaina gēna *UGT1A1* transkripcijas aktivitāti [*Kardon, 2000*], kas varētu kompensēt mutācijas (TA)₇ izraisīto samazināto gēna ekspresiju, kas izraisa labdabīgu hiperbilirubinēmiju [*Muslu, 2008*].

4.3. Klīniskie un bioķīmiskie rādītāji, kas raksturo CHC pacientus

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

biopsija [EASL, 2011; Santantonio, 2008]. Pētījumā iekļautajiem pacientiem bija noteikts GGT, ALAT, kā arī bija zināms pacientu dzimums.

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

Starp dažādiem vīrusa genotipiem būtiskākās atšķirības tiek minētas starp 1./2. un 3. genotipu, kuram raksturīgāka izteiktāka aknu fibroze tieši uz steatozes fona [Manns, 2006]. Trešajam vīrusa genotipam statistiski ticami

augstāki rādītāji bija – ALAT ($p = 0,006$) un ASAT ($p = 0,009$) līmenī, kas raksturo šūnu citolīzi, un citokeratīna–18 līmenis ($p = 0,005$), kas raksturo šūnu apoptozi. CVH patogēnēzē ir svarīga loma šūnu apoptozei, jo HCV ierosina gan aknu šūnu (veicinot smagāka aknu bojājuma attīstību), gan leukocītu (vairāk saistīts terapijas efektivitāti – vīrusa persistēšanu) apoptozi [Parfieniuk–Kowerda, 2013], tāpēc tās raksturojošie rādītāji, piemēram, citohroms C un citokeratīns–18 tiek pēfīti saistībā ar CVH. Citohroms C vairāk raksturo nespecifisku audu šūnu nāvi, bet citokeratīns–18 specifiski norāda uz aknu šūnu, nevis mezenhimālo šūnu apoptozi. Aknu šūnu apoptozes vai nekrozes rezultātā palielinās arī ALAT, ASAT (nespecifiski šūnu bojāejas – apoptozes vai nekrozes rādītāji) un GGT (specifiskāks aknu šūnu enzīms, kuras līmenis var palielināties gan alkohola lietošanas gadījumā [Perrillo, 1978], gan aknu šūnu bojāejas gadījumā). Tāpēc, salīdzinot iegūtos datus, var noteikt, ka pacientiem ar trešo vīrusa genotipu ir izteiktāka aknu šūnu apoptoze, kas veido smagāku aknu bojājumu, kas sakrīt ar iepriekš aprakstīto [Poynard, 2003a]. Arī pie morfoloģiski visizteiktākā aknu bojājuma, cirozes, mūsu pētāmajā grupā statistiski ticami bija paaugstināti ALAT, ASAT, GGT, citokeratīna–18 un hialuronskābes līmenis ($p < 0,05$). Hialuronskābe tiek sintezēta visos audos, aknās to sintezē Ito šūnas, tās līmenis ir normas robežās, ja nav aknu šūnu bojājuma, bet tā paaugstināšanās saistās ar fibrozes izteiktību aknu audos, un tiek aprakstīts, ka neatkarīgi no izraisītāja, hialuronskābe palielinās līdz ar fibrozes izteiktības pakāpi aknu audos [McHutchison, 2000].

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

Pētījuma grupā tika salīdzināti bioķīmiskie dati pirms terapijas uzsākšanas, pacientiem ar sasniegtu SVR un persistējošu vīrusu pēc terapijas beigām. Statistiski ticami atšķīrās aknu bojājuma rādītājs – GGT līmenis

($p < 0,001$), fibrozi raksturojošs rādītājs – hialuronskābe ($p = 0,021$), iekaisumu raksturojošs rādītājs – leukocītu skaits ($p = 0,021$) un no morfoloģiskajiem izmeklējumiem – atsevišķi fibrozes novērtējums ($p = 0,003$) un arī kopējais HAI ($p = 0,027$). No rādītājiem tikai leukocītu skaits bija augstāks pacientiem ar sasniegtu SVR, bet pārējie rādītāji bija augstāki pacientiem ar persistējošu vīrusu arī pēc antivirālās terapijas. Augstāks leukocītu skaits nodrošina labāku imunitātes nodrošināšanu, kas nodrošina SVR sasniegšanu, kā arī raksturo HCV mazāk izraisītu bojājumu, jo vīruss ierosina gan aknu šūnu, gan leukocītu apoptozi [Parfieniuk–Kowerda, 2013]. Pētījumā iegūtā informācija sakrīt ar iepriekš aprakstīto, ka antivirālās terapijas efektivitāte ir atkarīga no aknu audu fibrozes un iekaisuma attīstības [EASL, 2011].

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

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

inhibitorus, iespējams sasniegt pat 95% SVR pacientiem ar 1.genotipu [Chae, 2013], kā arī citus specifiskākus medikamentus.

4.4. Ģenētisko marķieru analīze CVH pacientu grupā un to ietekme uz slimības gaitu

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

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

Promocijas darbā tika pētīti dzelzs (gēns *HFE*), vara (gēns *ATP7B*) un bilirubīna (gēns *UGT1A1*) vielmaiņā iesaistītie gēnu polimorfismi, kā arī del32 polimorfisms (gēnā *CCR5*), kas izmaina leukocītu *CCR5* receptora sintēzi un *GSTM1* un *GSTT1* nulles genotipi, kas saistīti ar oksidatīvo stresu šūnā, kas var

ietekmēt CVH klīnisko gaitu. Tālāk aprakstīti atsevišķi katrs no analizētajiem polimorfismiem.

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

Analizējot *GSTM1* nulles genotipa ietekmi uz antivirālās terapijas efektivitāti, netika atrastas statistiski ticamas atšķirības starp pacientiem, kuriem tika sasniegta SVR un kuriem nē. Analizējotagrīnu virālu atbildi uz antivirālo terapiju, *GSTM1* nulles genotips bija retāk sastopams pacientiem ar persistējošu vīrusu pēc antivirālās terapijas (OR = 0,4949, p = 0,052). Skaidrojums varētu būt, ka *GSTM1* nulles genotips ir saistīts ar lielāku oksidatīvo stresu hepatocītos HCV ietekmē, kas rada lielāku aknu bojājumu un, savukārt, aknu bojājums ir viens no riska faktoriem sliktākai atbildes reakcijai uz antivirālo terapiju [EASL, 2011].

Pamatojumu, ka mūsu pacientu grupā *GSTM1* nulles genotips ir saistīts ar aknu šūnu bojājumu, pierāda arī tas, ka *GSTM1* nulles genotips ir saistīts ar HAI (BETA = -0,7737, p = 0,0083), un citokeratīna-18 līmeni, kas raksturo hepatocītu apoptozi (BETA = 86,41, p = 0,0153) – kas nozīmētu, ka nulles

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

Līdzīgi kā *GSTM1*, arī *GSTT1* ir iesaistīts šūnas oksidatīva stresa regulēšanā un tam piemīt glutaciona peroksidāzes aktivitāte [Hurst, 1998]. Veicot gadījuma – kontroles analīzi, *GSTT1* nulles genotips bija biežāk sastopams hroniska CVH gadījumā (OR = 1,621, p = 0,0226), līdzīgi kā tas aprakstīts arī Spānijas populācijā [Martinez, 2007], bet, analizējot saistību ar atbildes reakciju uz antivirālo terapiju, statistiski ticami rezultāti netika iegūti (p > 0,05). Netika arī atrasta saistība ar bioķīmiskajiem vai morfoloģiskajiem datiem CVH pacientu grupā. Viens no skaidrojumiem, ko piedāvāja Martinez S *et al.* [Martinez, 2007], ka saistību ar bioķīmiskiem rādītājiem CVH pacientu grupā neizdodas atrast, ir tas, ka *GSTT1* un *GSTM1* ir loma agrīnā infekcijas attīstībā, bet, analizējot hroniska CVH pacientus ar kontroles grupu šī ietekme

nav atrodama bioķīmiskā līmenī [Martinez, 2007]. Lai apstiprinātu šo, ir nepieciešams palielināt pētāmo grupu, jo ir tikai atsevišķi pētījumi, kas apskata šo jautājumu.

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

Skaidrojums atrastajai asociācijai varētu būt, ka *CCR5* ir iesaistīts imūnās atbildes nodrošināšanā, kas ir svarīga, lai regulētu gan infekcijas saglabāšanas/ persistēšanu, gan antivirālās terapijas efektivitāti. *CCR5* gēns kodē hemokīnu receptoru, un hemokīni ir hemostatiski citokīni, kas nosaka šūnu virzību uz iekaisuma vietu, un *CCR5* ir viens no hemokīniem, kas ir nozīmīgs HCV klīniskajā attīstībā [Zeremski, 2011]. *CCR5* hemokīnu sintēze pastiprinās HCV inficētajās šūnās, un pierādīts, ka tie veicina fibrozes attīstību aknu šūnās HCV ietekmē [Zeremski, 2007], bet, veicot lineārās regresijas analīzi, lai noteiktu saistību ar bioķīmiskajiem un morfoloģiskajiem rādītājiem mūsu pacientu grupā, tā netika atrasta (p > 0,05).

Salīdzinot pacientus ar sasniegtu SVR, del32 bija biežāka pacientiem ar neefektīvu terapiju (OR = 3,057, p = 0,0002), un biežāka pacientiem ar nulles atbildes reakciju uz antivirālo terapiju (OR = 3,165, p = 0,0012), kas bija izteiktāka vīriešiem (OR = 4,492, p = 0,00098). Iegūtie rezultāti ir pretēji iepriekš aprakstītajiem [Glas, 2003], bet iepriekš aprakstītās negatīvās asociācijas ar terapijas iznākumu bija mazākās pacientu grupās

(n = 78 [Ahlenstiel, 2003], n = 59 [Glas, 2003]), vienā no pētījumiem bija aprakstīts, ka del32 mutācijai ir ietekme monoterapijā ar ribavirīnu [Ahlenstiel, 2003].

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

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

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

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

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

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

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

Veicot asociācijas analīzi, statistiski ticama saistība tika atrasta starp PIS mutāciju un nulles atbildi uz antivirālo atbildi (OR = 7,118, $p = 0,0254$, CI 95% 0,97–52,2), kas bija ticamāka sievietēm (OR = 10,82, $p = 0,042$, CI 95% 0,632–185,1). Analizējot saistību ar bioķīmiskajiem rādītājiem, tika atrasta statistiski ticama asociācija ar rādītājiem, kas raksturo šūnu apoptozi (ar citohromu C) un fibrozi (ar hialuronskābi un morfoloģiskiem izmeklējumiem). Iegūtie rādītāji būtu jāvērtē piesardzīgi, jo abu mutāciju biežums ir $< 0,05$ un atrastā asociācija varētu būt ticama tikai mazā pacientu skaita (ko norāda arī plašais 95% ticamības intervāls), tomēr tie izskaidro viens otru, jo lielāks iekaisums un aknu fibroze ir saistāma ar sliktāku atbildi uz antivirālo terapiju

[EASL, 2011; Bosma, 1995]. Asociācija ar alfa1–antitripsīna nepietiekamību un CVH klīnisko gaitu ir maz pētīta ir iegūti pretrunīgi rezultāti [Gharib, 2011; Settin, 2006].

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

SECINĀJUMI

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

PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Publikācijas (zinātniskie raksti) par pētījuma tēmu:

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

Tēzes zinātnisko konferenšu materiālos:

1. **Piekuse L.**, Kreile M., Lace B., Keiss J., Sondore V., Krumina A. *NAT2* gene polymorphism influence on clinical outcome in acute alcohol induced toxic hepatitis. Proceedings of the Golden Helix Symposium “Genomic Medicine: Translating genes into health” 2012: p23.
2. **Piekuse L.**, Keiss J., Sondore V., Micule I., Kreile M., Lace B., Krumina A. Gilbert syndrome molecular diagnostics and clinical characterization in Latvia. *European Journal of Human Genetics*, 2011, 19 (2) Suppl. 2: p334.
3. Kreile M., **Piekuse L.**, Krumina A., Keišs J., Sondore V. Hereditārās hemohromatozes mutāciju biežums C hepatīta slimniekiem Latvijā. RSU Zinātniskā conference, Tēžu grāmata 2011, lpp. 197.

4. Zarina A., **Piekuse L.**, Kreile M., Krumina A., Lace B., Keiss J., Sondore V., Cernevska G. Mutation spectrum of Wilson disease in Latvia. IV International congress of molecular medicine, Abstract book, 2011, p 115.
5. Krumina A., **Piekuse L.**, Kreile M., Keiss J., Sondore V., Chernushenko A. Genetic variants associated with acute toxic hepatitis. The American Society of Human genetics 60th Meeting, Washington DC, USA, 2010. (Abstract no 922)
6. **Piekuse L.**, Keišs J., Sondore V., Kreile M., Lāce B., Krūmiņa A. Ksenobiotiķu atindēšanas enzīmu kodējošo gēnu polimorfismu raksturojums pacientiem ar akūtu toksisku hepatītu. RSU Zinātniskā konference, Tēzes, 2010, lpp. 89.
7. **Piekuse L.**, Kreile M., Zariņa A., Lāce B., Sondore V., Krumina A., Keiss J. Inherited liver disorder impact on CVH infection in Latvia. European Journal of Human Genetics, vol. 18., Suppl.1., 2010, p.265.
8. **Piekuse L.**, Lace B., Keiss J., Kreile M., Micule I., Sondore V., Čerņevska G., Krumina A. Gilbert syndrome molecular diagnostics in Latvia 2001–2010. The 10th Baltic Congress in laboratory medicine, 2010, Abstract book., p. 34.
9. Zariņa A., Kreile M., **Piekuse L.**, Čerņevska G., Keišs J., Mičule I., Krūmiņa A. Vilsona slimības izraisošās mutācijas H1069Q biežums bērniem vecumā līdz 18 gadiem Latvijas populācijā. RSU Zinātniskā konference, Tēzes, 2010, lpp. 240.
10. Krumina A., **Piekuse L.**, Keiss J., Sondore V., Kreile M., Lace B. Genetic determinants of susceptibility, viral clearance and persistence during hepatitis C virus infection. – 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and molecular biology, Shanfhai, China, 2009, Abstract book, p, 162.
11. Krumina A., **Piekuse L.**, Kreile M., Keiss J., Sondore V., Zhilevica A. Genetic variants associated with susceptibility to hepatitis C virus infection.

Genetics and genomics of infectious diseases, Singapore, 2009, Abstract book, p16

12. **Piekuse L.**, Keiss J., Čerņušenko A., Lace B. Clinical and molecular characterization of patients with acute toxic hepatitis. European Conference of Human Genetics 2009, Abstracts, p, 231.
13. Čerņušenko A., **Piekuse L.** Žilbēra sindroms Latvijā: Diagnoze un diferenciāldiagnoze. RSU Zinātniskās konferences tēzes, 2008, Rīga, lpp 93.
14. Keišs J., Sondore V., Lāce B., Mičule I., **Piekuse L.**, Kreile M., Zariņa A., Krūmiņa A. Aknu ģenētiskās patoloģijas DNS diagnostikas iespējas. RSU Zinātniskā konference, Tēzes, 2007, lpp. 119.
15. **Piekuse L.**, Kreile M., Lace B., Keiss J., Sondore V., Krumina A. CC–chemokine receptor CCR5 and hereditary haemochromatosis mutations associations in viral hepatitis C patients in Latvia. European Journal of Human Genetics, 2007, Vol.15, suppl.1: p.287.
16. **Piekuse L.**, Mičule I., Lāce B., Keišs J., Sondore V., Krūmiņa A. Žilbēra sindroma diagnostika Latvijā. Zinātniskā konference, Tēzes, 2007, lpp. 127.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. // *J Hepatol*, 2011; 55(2): 245–264.
2. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. // *J Hepatol*, 2012; 57(2): 399–420.
3. Afdhal N. H. The natural history of hepatitis C. // *Semin Liver Dis*, 2004; 24 Suppl 2: 3–8.
4. Agundez J. A., Golka K., Martinez C. et al. Unraveling ambiguous NAT2 genotyping data. // *Clin Chem*, 2008; 54(8): 1390–1394.
5. Ahlenstiel G., Berg T., Woitas R. P. et al. Effects of the CCR5–Delta32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. // *J Hepatol*, 2003; 39(2): 245–252.
6. Anand B. S., Currie S., Dieperink E. et al. Alcohol use and treatment of hepatitis C virus: results of a national multicenter study. // *Gastroenterology*, 2006; 130(6): 1607–1616.
7. Avila R. E., Carmo R. A., Farah Kde P. et al. Hyaluronic acid in the evaluation of liver fibrosis in patients with hepatitis C on haemodialysis. // *Braz J Infect Dis*, 2010; 14(4): 335–341.
8. Bosma P. J., Chowdhury J. R., Bakker C. et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP–glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. // *N Engl J Med*, 1995; 333(18): 1171–1175.
9. Bressler B. L., Guindi M., Tomlinson G., Heathcote J. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. // *Hepatology*, 2003; 38(3): 639–644.
10. Chae H. B., Park S. M., Youn S. J. Direct–acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis C: open issues and future perspectives. // *Scientific World Journal*, 2013; 2013: 704912.

11. Chappell S., Hadzic N., Stockley R. et al. A polymorphism of the alpha1-antitrypsin gene represents a risk factor for liver disease. // *Hepatology*, 2008; 47(1): 127–132.
12. Coles B. F., Morel F., Rauch C. et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. // *Pharmacogenetics*, 2001; 11(8): 663–669.
13. Crabb D. W., Edenberg H. J., Bosron W. F., Li T. K. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant. // *J Clin Invest*, 1989; 83(1): 314–316.
14. Curiel D. T., Chytil A., Courtney M., Crystal R. G. Serum alpha 1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu264-Val) mutation results from intracellular degradation of alpha 1-antitrypsin prior to secretion. // *J Biol Chem*, 1989; 264(18): 10477–10486.
15. Datta S., Chowdhury A., Ghosh M. et al. A genome-wide search for non-UGT1A1 markers associated with unconjugated bilirubin level reveals significant association with a polymorphic marker near a gene of the nucleoporin family. // *Ann Hum Genet*, 2012; 76(1): 33–41.
16. Eglite J. HLA II klases DRB1, DQA1, DQB1 ģenētisko marķieru izpēte ar HIV inficētiem un AIDS pacientiem. // PhD thesis, Rīga, 2011.
17. Elzouki A. N., Verbaan H., Lindgren S. et al. Serine protease inhibitors in patients with chronic viral hepatitis. // *J Hepatol*, 1997; 27(1): 42–48.
18. Esteban J. I., Sauleda S., Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. // *J Hepatol*, 2008; 48(1): 148–162.
19. Feder J. N., Penny D. M., Irrinki A. et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95(4): 1472–1477.
20. Frosst P., Blom H. J., Milos R. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. // *Nat Genet*, 1995; 10(1): 111–113.

21. Garcia-Closas M., Hein D. W., Silverman D. et al. A single nucleotide polymorphism tags variation in the arylamine N-acetyltransferase 2 phenotype in populations of European background. // *Pharmacogenet Genomics*, 2011; 21(4): 231–236.
22. Gelatti U., Covolo L., Talamini R. et al. N-Acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, cigarette smoking and hepatocellular carcinoma: a case-control study. // *Int J Cancer*, 2005; 115(2): 301–306.
23. Ghany M. G., Nelson D. R., Strader D. B. et al. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. // *Hepatology*, 2011; 54(4): 1433–1444.
24. Gharib A. F., Karam R. A., Pasha H. F. et al. Polymorphisms of hemochromatosis, and alpha-1 antitrypsin genes in Egyptian HCV patients with and without hepatocellular carcinoma. // *Gene*, 2011; 489(2): 98–102.
25. Glas J., Torok H. P., Simperl C. et al. The Delta 32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene neither is correlated with chronic hepatitis C nor does it predict response to therapy with interferon-alpha and ribavirin. // *Clin Immunol*, 2003; 108(1): 46–50.
26. Guo C. H., Chen P. C., Ko W. S. Status of essential trace minerals and oxidative stress in viral hepatitis C patients with nonalcoholic fatty liver disease. // *Int J Med Sci*, 2013; 10(6): 730–737.
27. Harries L. W., Stubbins M. J., Forman D. et al. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. // *Carcinogenesis*, 1997; 18(4): 641–644.
28. Harris E. D. Cellular copper transport and metabolism. // *Annu Rev Nutr*, 2000; 20: 291–310.

29. Hurst R., Bao Y., Jemth P. et al. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. // *Biochem J*, 1998; 332 (Pt 1): 97–100.
30. Jēruma A. Hronisks vīrushepatīts C: bioķīmiskie un imūnģenētiskie diagnostiskie marķieri etioloģiskās terapijas efektivitātes prognozēšanai. // PhD thesis, Rīga, 2011.
31. Johansson A. S., Stenberg G., Widersten M., Mannervik B. Structure–activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1–1 governed by the H–site residue 105. // *J Mol Biol*, 1998; 278(3): 687–698.
32. Josephy P. D. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. // *Hum Genomics Proteomics*, 2010; 2010: 876940.
33. Kardon T., Coffey M. J., Banhegyi G. et al. Transcriptional induction of bilirubin UDP–glucuronosyltransferase by ethanol in rat liver. // *Alcohol*, 2000; 21(3): 251–257.
34. Katsounas A., Trippler M., Kottlil S. et al. Cytokine/chemokine patterns connect host and viral characteristics with clinics during chronic hepatitis C. // *Eur J Med Res*, 2012; 17: 9.
35. Kidd V. J., Wallace R. B., Itakura K., Woo S. L. Alpha 1–antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. // *Nature*, 1983; 304(5923): 230–234.
36. Kiran M., Chawla Y. K., Kaur J. Glutathione–S–transferase and microsomal epoxide hydrolase polymorphism and viral–related hepatocellular carcinoma risk in India. // *DNA Cell Biol*, 2008; 27(12): 687–694.
37. Ko W. S., Guo C. H., Yeh M. S. et al. Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. // *World J Gastroenterol*, 2005; 11(30): 4697–4702.

38. Kohen R., Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. // *Toxicol Pathol*, 2002; 30(6): 620–650.
39. Koike K., Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. // *Hepato Res*, 2006; 34(2): 65–73.
40. Kondo S., Sturgis E. M., Li F. et al. GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and risk of salivary gland carcinoma. // *Int J Clin Exp Med*, 2009; 2(1): 68–75.
41. Krumina A., Keiss J., Sondore V. et al. From clinical and biochemical to molecular genetic diagnosis of Wilson disease in Latvia. // *Genetika*, 2008; 44(10): 1379–1384.
42. Lace B., Sveger T., Krams A. et al. Age of SERPINA1 gene PI Z mutation: Swedish and Latvian population analysis. // *Ann Hum Genet*, 2008; 72(Pt 3): 300–304.
43. Leff M. A., Fretland A. J., Doll M. A., Hein D. W. Novel human N-acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype. // *J Biol Chem*, 1999; 274(49): 34519–34522.
44. Lieber C. S. Ethnic and gender differences in ethanol metabolism. // *Alcohol Clin Exp Res*, 2000; 24(4): 417–418.
45. Liggi M., Sini M., Sorbello O. et al. HBV and HCV infections in Wilson's disease patients: copper overload could be protective? // *Clin Biochem*, 2012; 45(13–14): 1095–1096.
46. Lin J. P., O'Donnell C. J., Schwaiger J. P. et al. Association between the UGT1A1*28 allele, bilirubin levels, and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. // *Circulation*, 2006; 114(14): 1476–1481.
47. Lisman T., Porte R. J. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. // *Blood*, 2010; 116(6): 878–885.

48. Lucena M. I., Andrade R. J., Martinez C. et al. Glutathione S-transferase m1 and t1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury. // *Hepatology*, 2008; 48(2): 588–596.
49. Manns M. P., Wedemeyer H., Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. // *Gut*, 2006; 55(9): 1350–1359.
50. Marcos M., Pastor I., Chamorro A. J. et al. Meta-analysis: glutathione-S-transferase allelic variants are associated with alcoholic liver disease. // *Aliment Pharmacol Ther*, 2011; 34(10): 1159–1172.
51. Marikovsky M., Nevo N., Vadai E., Harris-Cerruti C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. // *Int J Cancer*, 2002; 97(1): 34–41.
52. Martinez C., Garcia-Martin E., Ladero J. M. et al. GSTT1 and GSTM1 null genotypes may facilitate hepatitis C virus infection becoming chronic. // *J Infect Dis*, 2007; 195(9): 1320–1323.
53. Massard J., Ratzu V., Thabut D. et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. // *J Hepatol*, 2006; 44(1 Suppl): S19–24.
54. Mathurin P., Abdelnour M., Ramond M. J. et al. Early change in bilirubin levels is an important prognostic factor in severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. // *Hepatology*, 2003; 38(6): 1363–1369.
55. Mathurin P., Lucey M. R. Management of alcoholic hepatitis. // *J Hepatol*, 2012; 56 Suppl 1: S39–45.
56. McHutchison J. G., Blatt L. M., de Medina M. et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. // *J Gastroenterol Hepatol*, 2000; 15(8): 945–951.
57. Mura C., Nousbaum J. B., Verger P. et al. Phenotype-genotype correlation in haemochromatosis subjects. // *Hum Genet*, 1997; 101(3): 271–276.

58. Muslu N., Dogruer Z. N., Eskandari G. et al. Are glutathione S-transferase gene polymorphisms linked to neonatal jaundice? // *Eur J Pediatr*, 2008; 167(1): 57–61.
59. Omiecinski C. J., Vanden Heuvel J. P., Perdew G. H., Peters J. M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. // *Toxicol Sci*, 2011; 120 Suppl 1: S49–75.
60. Ostapenko Y. N., Brusin K. M., Zobnin Y. V. et al. Acute cholestatic liver injury caused by polyhexamethyleneguanidine hydrochloride admixed to ethyl alcohol. // *Clin Toxicol (Phila)*, 2011; 49(6): 471–477.
61. Parfieniuk–Kowerda A., Lapinski T. W., Rogalska–Plonska M. et al. Serum cytochrome c and m30–neoepitope of cytokeratin–18 in chronic hepatitis C. // *Liver Int*, 2013.
62. Pemble S., Schroeder K. R., Spencer S. R. et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. // *Biochem J*, 1994; 300 (Pt 1): 271–276.
63. Perrillo R. P., Griffin R., DeSchryver–Kecskemeti K. et al. Alcoholic liver disease presenting with marked elevation of serum alkaline phosphatase. A combined clinical and pathological study. // *Am J Dig Dis*, 1978; 23(12): 1061–1066.
64. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis—a new look at an old disease. // *N Engl J Med*, 2004; 350(23): 2383–2397.
65. Ping J., Wang H., Huang M., Liu Z. S. Genetic analysis of glutathione S-transferase A1 polymorphism in the Chinese population and the influence of genotype on enzymatic properties. // *Toxicol Sci*, 2006; 89(2): 438–443.
66. Poynard T., Imbert–Bismut F., Munteanu M. et al. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV

- FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. // *Comp Hepatol*, 2004; 3(1): 8.
67. Poynard T., Mathurin P., Lai C. L. et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. // *J Hepatol*, 2003a; 38(3): 257–265.
 68. Poynard T., Yuen M. F., Ratziu V., Lai C. L. Viral hepatitis C. // *Lancet*, 2003b; 362(9401): 2095–2100.
 69. Purcell S., Neale B., Todd–Brown K. et al. PLINK: a tool set for whole–genome association and population–based linkage analyses. // *Am J Hum Genet*, 2007; 81(3): 559–575.
 70. Qu Q., Shore R., Li G. et al. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. // *Chem Biol Interact*, 2005; 153–154: 85–95.
 71. Rashed M. N. The role of trace elements on hepatitis virus infections: a review. // *J Trace Elem Med Biol*, 2011; 25(3): 181–187.
 72. Rieger S., Riemer H., Mannhalter C. Multiplex PCR assay for the detection of genetic variants of alpha1–antitrypsin. // *Clin Chem*, 1999; 45(5): 688–690.
 73. Robert A., Chazouilleres O. Prothrombin time in liver failure: time, ratio, activity percentage, or international normalized ratio? // *Hepatology*, 1996; 24(6): 1392–1394.
 74. Rodrigo L., Alvarez V., Rodriguez M. et al. N–acetyltransferase–2, glutathione S–transferase M1, alcohol dehydrogenase, and cytochrome P450IIE1 genotypes in alcoholic liver cirrhosis: a case–control study. // *Scand J Gastroenterol*, 1999; 34(3): 303–307.
 75. Romero–Gomez M., Del Mar Vilorio M., Andrade R. J. et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. // *Gastroenterology*, 2005; 128(3): 636–641.

76. Safarinejad M. R., Shafiei N., Safarinejad S. Methylenetetra-hydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T, A1298C and G1793A polymorphisms: association with risk for clear cell renal cell carcinoma and tumour behaviour in men. // *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2012; 24(4): 269–281.
77. Sambrook J., Russell D. W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. // *CSH Protoc*, 2006; 2006(1).
78. Samson M., Libert F., Doranz B. J. et al. Resistance to HIV–1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR–5 chemokine receptor gene. // *Nature*, 1996; 382(6593): 722–725.
79. Santantonio T., Wiegand J., Gerlach J. T. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. // *J Hepatol*, 2008; 49(4): 625–633.
80. Seidegard J., Vorachek W. R., Pero R. W., Pearson W. R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans–stilbene oxide are due to a gene deletion. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85(19): 7293–7297.
81. Settin A., El–Bendary M., Abo–Al–Kassem R., El Baz R. Molecular analysis of A1AT (S and Z) and HFE (C282Y and H63D) gene mutations in Egyptian cases with HCV liver cirrhosis. // *J Gastrointestin Liver Dis*, 2006; 15(2): 131–135.
82. Sim E., Lack N., Wang C. J. et al. Arylamine N–acetyltransferases: structural and functional implications of polymorphisms. // *Toxicology*, 2008; 254(3): 170–183.
83. Simanis R., Lejniece S., Sochnevs A. et al. . Natural clearance of hepatitis C virus in hemophilia patients. // *Medicina (Kaunas)*, 2008; 44(1): 15–21.
84. Simmonds P., Bukh J., Combet C. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. // *Hepatology*, 2005; 42(4): 962–973.

85. Stewart S., Jones D., Day C. P. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. // *Trends Mol Med*, 2001; 7(9): 408–413.
86. Stickel F., Österreicher C. H. The role of genetic polymorphisms in alcoholic liver disease. // *Alcohol and Alcoholism*, 2006; 41(3): 209–224.
87. Streiff M. B., Mehta S., Thomas D. L. Peripheral blood count abnormalities among patients with hepatitis C in the United States. // *Hepatology*, 2002; 35(4): 947–952.
88. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M. et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. // *Nat Genet*, 2009; 41(10): 1105–1109.
89. Thomas G. R., Forbes J. R., Roberts E. A. et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. // *Nat Genet*, 1995; 9(2): 210–217.
90. Thompson Coon J., Rogers G., Hewson P. et al. Surveillance of cirrhosis for hepatocellular carcinoma: systematic review and economic analysis. // *Health Technol Assess*, 2007; 11(34): 1–206.
91. Tolmane I. Hroniska C vīrushepatīta ārstēšanas rezultātu ietekmējošo faktoru izpēte.// PhD thesis, Rīga, 2012a.
92. Tolmane I., Rozentale B., Keiss J. et al. The prevalence of viral hepatitis C in Latvia: a population-based study. // *Medicina (Kaunas)*, 2011; 47(10): 532–535.
93. Tolmane I., Rozentale B., Keiss J. et al. Interleukin 28B gene polymorphism and association with chronic hepatitis C therapy results in Latvia. // *Hepat Res Treat*, 2012b; 2012: 324090.
94. Tommasi A. M., Fabris P., Carderi I. et al. Lack of higher frequency of the chemokine receptor 5-delta32/delta32 genotype in hepatitis C. // *J Clin Gastroenterol*, 2006; 40(5): 440–443.

95. Topic A., Ljujic M., Radojkovic D. Alpha-1-antitrypsin in pathogenesis of hepatocellular carcinoma. // *Hepat Mon*, 2012; 12(10 HCC): e7042.
96. Wakabayashi I., Groschner K. Modification of the association between alcohol drinking and non-HDL cholesterol by gender. // *Clin Chim Acta*, 2009; 404(2): 154–159.
97. Wang R.S., Nakajima T., Kawamoto T., Honma T. Effects of aldehyde dehydrogenase-2 genetic polymorphisms on metabolism of structurally different aldehydes in human liver. // *Drug Metab Dispos*, 2002; 30(1): 69–73.
98. Wang Y., Hodgkinson V., Zhu S. et al. Advances in the understanding of mammalian copper transporters. // *Adv Nutr*, 2011; 2(2): 129–137.
99. White D. L., Ratziu V., El-Serag H. B. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. // *J Hepatol*, 2008; 49(5): 831–844.
100. Wiegand J., Deterding K., Cornberg M., Wedemeyer H. Treatment of acute hepatitis C: the success of monotherapy with (pegylated) interferon alpha. // *J Antimicrob Chemother*, 2008; 62(5): 860–865.
101. Woitas R. P., Ahlenstiel G., Iwan A. et al. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. // *Gastroenterology*, 2002; 122(7): 1721–1728.
102. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? // *Alcohol Res Health*, 2006; 29(4): 245–254.
103. Zeremski M., Hooker G., Shu M. A. et al. Induction of CXCR3- and CCR5-associated chemokines during acute hepatitis C virus infection. // *J Hepatol*, 2011; 55(3): 545–553.
104. Zeremski M., Petrovic L. M., Talal A. H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. // *J Viral Hepat*, 2007; 14(10): 675–687.

105. Zeuzem S., Feinman S. V., Rasenack J. et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. // N Engl J Med, 2000; 343(23): 1666–1672.