Beata Kruk

Streszczenie w języku polskim

Wpływ wybranych polimorfizmów genetycznych na progresję włóknienia w cholestatycznych chorobach wątroby

Wprowadzenie: Dane zaprezentowane przez ekspertów Europejskiego Towarzystwa Badań nad Wątrobą (EASL) wyraźnie wskazują na znaczne obciążenie chorobami wątroby mieszkańców Europy. Postępujące włóknienie jest powszechne u osób z przewlekłymi chorobami wątroby (CLD) i może być wywołane przez różne czynniki, w tym niealkoholową stłuszczeniową chorobę wątroby (NAFLD), zakażenia wirusowe (głównie wirusowe zapalenie wątroby typu B i C, czyli HBV i HCV), alkoholową chorobę wątroby (ALD), choroby cholestatyczne (PBC - pierwotne zapalenie dróg żółciowych; PSC - pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych) i autoimmunologiczne zapalenie wątroby (AIH). Znaczne nagromadzenie kolagenu w wątrobie (zwłóknienie wątroby) powodowane jest przewlekłym uszkodzeniem hepatocytów i stanowi odpowiedź narządu na proces zapalny, w celu jego ograniczenia. Wczesne stadia włóknienia wątroby są u większości pacjentów bezobjawowe. Objawy zaawansowanego włóknienia wątroby ujawniają się klinicznie w późnym stadium choroby, tj. w momencie, gdy u chorych rozwija się marskość wątroby i wyczerpaniu ulegnie funkcja narządu. Transplantacja wątroby jest jedyną opcją terapeutyczną w stadium zdekompensowanej marskości wątroby, co ze względu na ograniczony dostęp do narządów, jest możliwe tylko u niektórych chorych. Powikłania związane z włóknieniem i marskością wątroby są głównymi czynnikami ograniczającymi przeżycie pacjentów z CLD. Dodatkowo u ponad 30% pacjentów z marskością wątroby rozwinie się rak wątrobowokomórkowy (HCC).

Progresja włóknienia wątroby jest wynikiem interakcji pomiędzy predyspozycjami genetycznymi, a czynnikami zewnętrznymi. Fibrogeneza, z punktu widzenia genetyki, należy do tzw. cech złożonych. Oznacza to, że jej postęp jest regulowany przez liczne geny, ich polimorfizmy i mutacje, które w wyniku interakcji mogą warunkować fenotyp. Do chwili obecnej wykryto znaczną część genetycznego komponentu progresji wirusowych i metabolicznych chorób wątroby, ale mniej wiadomo o genetycznych modyfikatorach przewlekłych chorób wątroby o etiologii autoimmunologicznej i cholestatycznej.

Pierwotne żółciowe zapalenie dróg żółciowych i pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych reprezentują dwie rzadkie, przewlekłe, cholestatyczne choroby wątroby.

Mogą one postępować do zwłóknienia, a następnie do marskości wątroby, patogeneza obu z nich nie jest jasna. PBC dotyczy dróg żółciowych międzyzrazikowych, charakteryzuje się immunologicznie uwarunkowaną destrukcją wewnątrzwątrobowych małych dróg żółciowych i zapaleniem wrotnym indukowanym przez limfocyty, które wynikiem jest ductopenia i postępującą cholestaza. PSC natomiast charakteryzuje się postępującym, przewlekłym zapaleniem oraz destrukcją zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzwątrobowych dróg żółciowych, uszkodzeniem komórek wątroby i włóknieniem narządu. Podejrzewa się wpływ predyspozycji genetycznej na patogenezę PBC i PSC, jednak dotychczasowe badania nie przyniosły jednoznacznych wyników. Włóknienie wątroby i jego konsekwencje - upośledzona funkcja wątroby i nadciśnienie wrotne - wpływają na długość życia pacjentów, ale dotychczas nie udało się zidentyfikować głównych czynników genetycznych, modyfikujących przebieg PBC i PSC.

Materiały i metody: Niniejsza rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech oryginalnych, powiązanych tematycznie publikacji. W pracy zbadano wpływ wybranych polimorfizmów genetycznych na progresję włóknienia wątroby w cholestatycznych chorobach wątroby (PSC, PBC, AIH oraz wariantów PSC/AIH, PBC/AIH). Wybrane polimorfizmy, które potencjalnie mogły być związane z progresją choroby wątroby, zostały zgenotypowane przy użyciu sond typu TaqMan: *PNPLA3* (rs738409), *TM6SF2* (rs58542926), *MARC1* (rs2642438), *HSD17B13* (rs72613567), *MBOAT7* (rs641738), *ABCB4* (rs2109505). Analiza genetyczna z zastosowaniem metodologii sond typu TaqMan wykorzystuje amplifikację DNA (PCR) i znakowanie DNA sondami fluorescencyjnymi.

Do pierwszego badania prospektywnie włączono 178 pacjentów z PSC (66 kobiet, zakres wieku 17-75 lat, 55 pacjentów z marskością wątroby).

W drugim badaniu prospektywnie włączono 313 pacjentów z AIH, w tym warianty AIH - PSC oraz AIH – PBC, odpowiednio 206 (66%), 77 (25%) i 30 (9%) pacjentów (218 kobiet, zakres wieku 18-84 lata, 130 pacjentów z marskością wątroby).

Do trzeciego badania prospektywnie włączono 867 pacjentów z PBC i PSC oraz dwie grupy kontrolne. Pierwsza grupa chorych zrekrutowana w Szczecinie składała się ze 196 pacjentów z PBC (174 kobiety, zakres wieku 23 - 87 lat, 82 pacjentów z marskością wątroby) i 135 pacjentów z PSC (39 kobiet, zakres wieku 17-69 lat, 53 pacjentów z marskością wątroby). Druga grupa chorych rekrutowana w Warszawie składała się z 260 pacjentów z PBC (241 kobiet, zakres wieku 29-86 lat, 114 pacjentów z marskością wątroby) i 276 pacjentów z PSC (97 kobiet, zakres wieku 22-81 lat, 92 pacjentów

z marskością wątroby). Dwie grupy kontrolne, 150 zdrowych dawców krwi i 318 pacjentów bez choroby wątroby, zrekrutowano odpowiednio w Szczecinie i Warszawie.

Wyniki: Wyniki pierwszego badania, dotyczącego grupy pacjentów z PSC, wykazały, że zarówno polimorfizmy genu *PNPLA3*, jak i *TM6SF2* nie miały wpływu na progresję włóknienia wątroby. Aktywności enzymów wątrobowych w surowicy nie były modyfikowane przez obecność wariantów *PNPLA3* (ALT P = 0,88; AST P = 0,77) lub *TM6SF2* (ALT P = 0,92, AST P = 0,49). Zwiększenie liczby alleli ryzyka nie miało wpływu na aktywność enzymów wątrobowych w surowicy, co wykazała odrębna analiza pacjentów będących nosicielami 0 (n = 99), 1 (n = 64), 2 (n = 12) lub 3 (n = 3) alleli ryzyka (P > 0,05). Nie zaobserwowano istotnego wpływu polimorfizmów w grupie pacjentów przed i po transplantacji wątroby, jak również u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, które jest częstą chorobą współistniejącą w PSC. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami a płcią, włóknieniem wątroby i aktywnością enzymów wątrobowych.

W drugiej publikacji oceniono wpływ polimorfizmów genów *MARC1* (rs2642438), *HSD17B13* (rs72613567), *PNPLA3* (rs738409), *TM6SF2* (rs58542926) i *MBOAT7* (rs641738) na przebieg kliniczny choroby u pacjentów z AIH oraz cholestatycznymi wariantami AIH-PBC i AIH-PSC. Nosiciele ochronnego allela *MARC1* mieli niższe wartości ALT i AST (odpowiednio P = 0,04; P = 0,02). Pacjenci z wariantami AIH-PSC i AIH-PBC, którzy byli nosicielami wariantu *HSD17B13* mieli niższe stężenie GGT w surowicy (P = 0,02). U nosicieli wariantu *MBOAT7* zaobserwowano istotnie zwiększone ryzyko rozwoju raka HCC (OR = 3,71; P = 0,02). Warianty *HSD17B13*, *TM6SF2* i *MBOAT7* nie były istotnie statystycznie związane z wartościami enzymów wątrobowych, LSM, FIB-4, APRI lub MELD (wszystkie P > 0,05). Ponadto, żaden z badanych polimorfizmów nie był związany z marskością wątroby w momencie diagnozy. Również żaden z pięciu badanych wariantów genetycznych nie był istotnie statystycznie związany z transplantacją wątroby lub śmiercią (wszystkie P > 0,05).

W trzeciej i ostatniej pracy niniejszej rozprawy doktorskiej zbadano wpływ polimorfizmu genu *ABCB4* c.711A>T na progresję włóknienia u pacjentów z PBC i PSC. W pracy tej wykazano, że w dwóch badanych grupach pacjentów z PBC, nosiciele allela ryzyka wystąpienia chorób cholestatycznych częściej prezentowali marskość wątroby (Szczecin: OR = 1,841; P = 0,025; Warszawa: OR = 1,528; P = 0,039). Allel ryzyka związany był z podwyższonym stężeniem AST (Szczecin P = 0,018), ALP (Szczecin P < 0,001; Warszawa P = 0,021) i GGT (Szczecin P = 0,003; Warszawa P = 0,045)

w momencie włączenia do badania. W trakcie obserwacji pacjenci z PBC istotnie poprawili swoje wyniki laboratoryjne, niezależnie od genotypu *ABCB4* c.711A>T (P > 0,05). W ciągu 8±4 lat obserwacji 22 pacjentów w grupie PBC ze Szczecina rozwinęło marskość wątroby, a ryzyko to było wyższe wśród nosicieli wariantu ryzyka (OR = 5,65; P = 0,04). W przeciwieństwie do PBC, nie wykryto żadnego związku *ABCB4* c.711A>T z fenotypem wątroby w kohortach PSC.

Wnioski: Polimorfizmy genów *PNPLA3* i *TM6SF2* nie przyczyniają się w istotny sposób do pogorszenia funkcji wątroby u pacjentów z PSC (publikacja 1). Polimorfizm genu *MARC1* ma działanie ochronne u pacjentów z AIH oraz wariantami AIH-PSC i AIH-PBC. Polimorfizm genu *MBOAT7* znacznie zwiększał ryzyko rozwoju raka HCC (publikacja 2). Wariant procholestatyczny genu *ABCB4* c.711A>T modulował uszkodzenie wątroby u pacjentów z PBC, natomiast nie zaobserwowano wpływu tego wariantu u pacjentów z PSC. W szczególności nosiciele mutacji mają zwiększone ryzyko postępującego włóknienia wątroby (publikacja 3).