

**lek. Arkadiusz Urbanowicz**

**Ekspresja mikro-RNA w surowicy biorców wątroby, leczonych terapią  
bezinterferonową z powodu zakażenia HCV**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: **dr hab. n. med. Michał Ciszek**

Promotor pomocniczy: **dr n. med. Dominika Klimczak-Tomaniak**

Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

## **Ekspresja mikro-RNA w surowicy biorców wątroby, leczonych terapią bezinterferonową z powodu zakażenia HCV**

### Wstęp

Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C (WZW C), mimo przełomu w jego leczeniu farmakologicznym, nadal stanowi ogromny problem zdrowotny na całym świecie. WZW C prowadzi do rozwoju wielu groźnych powikłań jak marskość wątroby i pierwotny rak wątrobowokomórkowy (HCC). Przewlekłe zakażenie HCV skutkuje rozwojem włóknienia wątroby w środowisku przewlekłego zapalenia, co predysponuje do procesów naprawczo-proliferacyjnych w wątrobie. Ich wynikiem jest powstanie guzków regeneracyjnych we włókniejącym mięszu, ale też rozwojem ognisk HCC – obie patologie bywają trudne do rozróżnienia (zwłaszcza na wczesnym etapie). Skryty przebieg w początkowych stadiach choroby nowotworowej dodatkowo opóźnia rozpoznanie i znacznie ogranicza możliwości skutecznego leczenia. Wobec braku powszechnie uznanych i efektywnych diagnostycznie badań wskaźnikowych nadzór onkologiczny takich pacjentów opiera się głównie na regularnych badaniach obrazowych. Niemniej intensywnie poszukuje się nowych metod diagnostycznych umożliwiających aktywne monitorowanie włóknienia wątroby oraz ryzyko nowotworzenia.

### Cel pracy

W tym badaniu oceniano możliwość oznaczania profilu mikro-RNA swoistego dla zakażenia HCV, włóknienia wątroby oraz HCC u pacjentów po przeszczepieniu wątroby, w próbkach krwi badanych za pomocą technik molekularnych, przed i po zakończeniu leczenia DAA.

### Metodyka

Spośród 120 pacjentów po przeszczepieniu wątroby, z nawrotem zakażenia HCV potwierdzonym na podstawie biopsji i obecności RNA HCV w surowicy, poddanych leczeniu przeciwwirusowemu za pomocą leków o działaniu bezpośrednim (DAA) prowadzonym wg typowego schematu (genotyp 1 - 12 tyg. ledipaswir/sofosbuwir +

RBV; genotyp 3 - sofosbuwir + RBV przez 24 tygodnie; genotyp 4 - parytaprewir/rytonawir/ombitaswir + RBV przez 12 tygodni), wybrano 25 pacjentów z wywiadem HCC w wątrobie własnej oraz 23 pacjentów bez wywiadu choroby nowotworowej, która stanowiła grupę kontrolną. Oznaczano profil ekspresji wybranych na podstawie piśmiennictwa genów mikro-RNA (miRNA): miR-21, -26a, -122, -155, -214, -221, -222, -571, -let7a) za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy, w czasie rzeczywistym, w oparciu o odwrotną transkrypcję (qRT-PCR). Oznaczenia badanych genów dokonano w próbkach mikro-RNA wyizolowanego z surowic pacjentów, pobranych przed kwalifikacją do leczenia DAA oraz po upływie 6 miesięcy od jego zakończenia.

### Wyniki

Cztery spośród 9 badanych genów nie uległy amplifikacji (miR-122, -155, -222, and -571). W przypadku 5 genów mikro-RNA obserwowano amplifikację umożliwiającą detekcję ich ilości w surowicy pacjentów. Skuteczne leczenie przeciwwirusowe powoduje wzrost ekspresji wszystkich miRNA, podlegających detekcji, niezależnie od wywiadu HCC (wzrost ekspresji w kolejności malejącej miR-221, miR-214, -26a, ket7a oraz -21). Terapia DAA wiąże się z odmienną ekspresją miR-221, -26a, -21 oraz -let7a w zależności od obecności HCC w wywiadzie. Eradykacja HCV w grupie z wywiadem nowotworowym pozwala korelować ze znacznym wzrostem poziomu ekspresji miR-221, -26a oraz -214, granicznego wzrostu dla -let7a oraz pozostaje niezmienna w przypadku miR-21. W grupie bez wywiadu nowotworowego leczenie przeciwwirusowe skutkuje wzrostem miR-214 i -21, granicznym wzrostem miR-221 oraz niezmienną ekspresją miR-let7a i -26a. W grupie bez wywiadu HCC obserwuje się wzrost ekspresji miR-214 niezależnie od nasilenia włóknienia, w przypadku miR-221 obserwowany wzrost ekspresji ma trend narastający wraz ze stopniem włóknienia. Eradykacja HCV w przypadku wystąpienia wznowy HCC wiąże się ze wzrostem ekspresji miR-221, -21 oraz -26, a także zmniejszeniem ekspresji miR-214 i -let7a (w porównaniu do grupy wolnej od wznowy HCC). Pomimo nieosiągnięcia znamienności statystycznej genami miRNA najlepiej dyskryminującymi wznowę HCC są miR-214 i miR-let7a.

### Wnioski

Oznaczanie profilu ekspresji wybranych genów miRNA w surowicach pacjentów może posłużyć jako potencjalny wskaźnik wznowy HCC (w szczególności odmienny

kierunek zmiany ekspresji dla miR-214 i odmienny poziom ekspresji miR-let7a). Eradykacja HCV za pomocą DAA skutkuje dynamicznymi zmianami profilu ekspresji badanych genów regulatorowych. W przypadku miR-214, -221 oraz -let7a dodatkowym czynnikiem modyfikującym ich ekspresję jest nasilenie włóknienia wątroby. Mała inwazyjność pozyskania materiału biologicznego (pobranie krwi z żyły obwodowej) i obserwowana zmienność ekspresji badanych miRNA mogą zachęcać do dalszych badań mających na celu oceny wartości predykcyjnej miR-214 i miR-let7a (oddzielnie bądź w skojarzeniu) jako potencjalnego wskaźnika ryzyka i nawrotu HCC.