

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Jana Fryzelková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Polymorfismus -3176C/T genu pro
interleukin 28B při léčbě virové hepatitidy C**

Bakalářská práce

Jana Fryzelková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce:

Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením pana Ing. Dalibora Novotného, Ph.D. za použití níže citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci dne 23. 4. 2013

.....

podpis

Souhrn

Infekce virem hepatitidy C a onemocnění jí způsobené představují významný problém pro celou lidskou populaci. Virem je v současnosti nakaženo téměř 170 milionů jedinců na světě, tedy 3 % populace. Virus je schopný unikat mechanismům imunitního dohledu hostitele a přetrvávat v organismu. Vyvíjí se chronická infekce spojená s vážnými onemocněními jater. Velkým problémem zůstává terapie chronické infekce, kdy u řady pacientů není ani při opakované terapii dosaženo vyléčení. Situaci komplikuje fakt, že akutní fáze infekce nebývají nakaženými rozpoznány, virus se může dále šířit a léčba je zahájena až příliš pozdě. U některých jedinců dojde ke spontánní eliminaci infekce. Pravděpodobnost spontánního uzdravení a úspěšnost terapie jsou ovlivněny množstvím faktorů pocházejících jak od viru, tak od hostitele. Jedním z nich je i jednonukleotidový polymorfismus -3176C/T (rs12979860) v oblasti lidského genu pro interleukin 28B. Jedinci s genotypem CC v tomto polymorfismu vykazují až dvakrát vyšší úspěšnost terapie než pacienti s genotypem TT. V experimentální části této bakalářské práce byla ověřena diagnostická metoda stanovující genotyp v polymorfismu -3176C/T genu pro interleukin 28B u pacientů. V klinické praxi se stanovení využívá k predikci úspěšnosti terapie a pro preferenci některých léčebných postupů před jinými.

Summary

Hepatitis C virus infection is a major problem for the whole human population. The infection affects about 170 million people worldwide, which is 3 % of the world population. The virus escapes the mechanisms of the host's immune system and persists in the organism. Then the chronic infection related to serious liver disease develops. The treatment of chronic infection is still problematic, many patients are not successfully cured despite the repeated therapy. In addition, many people do not recognize the acute phases of infection. The virus spreads and the treatment is initiated too late. However, a few individuals spontaneously clear the infection. The likelihood of clearance of the infection and the success of treatment is influenced by many host and viral factors. One of the most important ones is a single nucleotide polymorphism -3176C/T (rs12979860) near the human *IL28B* gene. The CC genotype is associated with a twofold greater rate of curing than the TT genotype. The diagnostic method which is used for determination of -3176C/T genotype was verified in the experimental part of this bachelor thesis. This determination has many clinical applications, it can predict the success of therapy and doctors can select suitable therapeutic treatment according to the patient.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat panu Ing. Daliboru Novotnému, Ph.D za odborné vedení a poskytnuté rady během vypracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala zaměstnankyním Laboratoře molekulární biologie Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc Bc. Margitě Bartkové a Daniele Pjajkové za pomoc při práci v laboratoři.

Tato bakalářská práce vznikla za podpory projektu:

CZ.1.07./2.2.00/15.0252 „Kreativní přístup ve výuce fyziologie – integrované (motivační) vzdělávací moduly“

Obsah:

1. ÚVOD.....	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1 Systematické zařazení viru hepatitidy C	10
2.2 Morfologie.....	11
2.3 Virový genom, genotypy.....	11
2.4 Životní cyklus.....	13
2.5 Epidemiologie	15
2.6 Patogeneze infekce HCV a imunitní odpověď hostitele	17
2.6.1 Patogeneze akutní infekce HCV	17
2.6.2 Vrozená imunitní odpověď proti HCV a gen pro interleukin 28B	18
2.6.3 Specifická imunitní odpověď proti HCV.....	20
2.6.4 Mechanismy persistence infekce HCV, patogeneze chronické infekce HCV	22
2.7 Klinický obraz virové hepatitidy C	24
2.8 Prevence	25
2.9 Terapie.....	26
2.9.1 Terapie akutní a chronické infekce virem hepatitidy C.....	26
2.9.2 Polymorfismus genu pro interleukin 28B	27
2.10 Klinická doporučení pro diagnostiku a léčbu HCV	29
2.10.1 Standardní laboratorní vyšetřovací metody	29
2.10.2 Standardní terapeutický postup při chronické infekci HCV	30
3. CÍL PRÁCE	31
4. MATERIÁLY A METODIKA	32
4.1 Izolace genomové DNA ze vzorku, určení čistoty a výpočet koncentrace DNA	32
4.1.1. Materiál, chemikálie a použité přístroje	32
4.1.2 Pracovní postup izolace genomové DNA	34
4.1.3 Pracovní postup určení čistoty vzorku a výpočtu koncentrace DNA	35
4.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase, analýza křivky tání.....	36
4.2.1 Materiál, chemikálie a použité přístroje	39
4.2.2 Pracovní postup amplifikace a detekce.....	40
4.2.3 Vyhodnocení analýzy křivky tání	42

5. VÝSLEDKY.....	44
5.1 Určení čistoty a výpočet koncentrace izolované DNA	44
5.2 Vyhodnocení analýzy křivky tání	45
6. DISKUZE.....	48
7. ZÁVĚR.....	49
8. LITERATURA.....	50
8.1 Seznam použité literatury.....	50
8.2 Seznam hypertextových odkazů.....	56
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57

1. ÚVOD

První záznamy o existenci viru hepatitidy C pochází z 80. let minulého století, k samotné identifikaci viru došlo až v roce 1989. Virus byl tehdy popsán jako původce potransfúzní hepatitidy nezpůsobené virem hepatitidy A nebo hepatitidy B. Proto bývá virus hepatitidy C často označován jako non-A-non-B virus. V následujícím období se vědci snažili charakterizovat vlastnosti viru a onemocnění jím způsobené. V roce 1994 pak byla přijata první klasifikace, nomenklatura pro stabilní formy viru, tzv. genotypy viru hepatitidy C. S dalším studiem viru přicházely nové poznatky, které doprovázely nově vyvstávající otázky, z nichž řada nebyla dosud plně zodpovězena. Ukázalo se, že virus hepatitidy C je schopen unikat imunitnímu dohledu hostitele a jeho genom vykazuje vysokou genetickou variabilitu. Což přispívá k tomu, že ke spontánní eliminaci viru a vymizení akutní infekce dojde jen u přibližně 30 % nakažených. U zbylých 70-80 % infikovaných se vyvíjí chronická infekce doprovázená vážnými onemocněními jater, jako je hepatocelulární karcinom. Podle nejnovějších výzkumů Světové zdravotnické organizace je virem hepatitidy C v současnosti nakaženo až 170 milionů jedinců, přibližně 3 % světové populace. Ročně podlehne následkům infekce několik stovek tisíc lidí. Infekce virem hepatitidy C tak představuje významnou zátěž pro celou populaci. Studium viru zůstává v popředí zájmu zdravotníků i vědců, a proto se jím zabývám i v bakalářské práci.

Velkým přetrvávajícím problémem je léčba chronické infekce virem hepatitidy C. Jednotlivé genotypy viru reagují na dnes standardně používanou léčbu (pegylovanými interferony v kombinaci s ribavirinem) odlišným způsobem a u řady pacientů není dosaženo uzdravení ani při opakované terapii. Nové přísliby v úspěšnosti terapie poskytují aktuální vědecké studie. Klinickému testování je podstoupeno několik typů tzv. přímo působících virostatik, z nichž některá jsou již v řadě zemí zaváděna na trh. Dále byly v rozsáhlých genomových studiích pacientů objeveny jednonukleotidové polymorfismy v oblasti genu *IL28B*, který kóduje interferon typu III zapojený do imunitní odpovědi hostitele. Zdá se, že odlišné genotypy v těchto polymorfismech mohou způsobovat rozdíly ve spontánní eliminaci infekce a v úspěšnosti standardní terapie mezi jednotlivými pacienty. Největší význam je přikládán polymorfismu -3176C/T (rs12979860) v oblasti genu pro interleukin 28B. Stanovení genotypu v tomto polymorfismu má význam především v klinické praxi. Cílem experimentální části bakalářské práce bylo ověření diagnostické metody využívající komerční soupravy pro stanovení genotypu v polymorfismu -3176C/T v oblasti genu pro interleukin 28B.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Systematické zařazení viru hepatitidy C

Hepatotropní viry, respektive viry vyvolávající hepatitidy, tvoří různorodou a komplikovanou skupinu s rozdílným systematickým zařazením. Virus hepatitidy B (HBV) je řazen do poměrně nedávno vzniklé čeledi *Hepadnaviridae* a virus hepatitidy A patří do čeledi *Picornaviridae*. Virus hepatitidy C (hepatitis C virus, HCV) nalézáme v čeledi *Flaviviridae*, spolu s HCV do této čeledi klasifikujeme též virus hepatitidy G. Zbylé známé viry této skupiny, jako například virus hepatitidy D a virus hepatitidy E, mají naprosto odlišné zařazení (Rajčáni, 2006).

Virus hepatitidy C je klasifikován do jednoho ze tří rodů, rozdělených na základě biologických vlastností, čeledi *Flaviviridae*, tj. do rodu *Hepacivirus*. Vedle rodu *Hepacivirus* obsahuje čeleď ještě rod *Flavivirus* (virus klíšťové encefalitidy a další) a rod *Pestivirus* (virus moru prasat atd). V čeledi *Flaviviridae*, která dříve tvořila podčeleď čeledi *Togaviridae*, se nachází přibližně sedmdesát virů. Název této čeledi vychází ze skutečnosti, že se geny zařazených virů přepisují odlišným mechanismem jako geny virů čeledi *Togaviridae*. Mezi charakteristické vlastnosti této čeledi patří jednovláknová pozitivní ribonukleová kyselina (RNA), malé obalené viriony o průměru 40-50 nm a schopnost aglutinace červených krvinek, čehož se využívá v detekci příslušných virů (Rajčáni, 2006).

Zjednodušeně lze systematické zařazení viru hepatitidy C zapsat podle následujícího schématu – Schéma 1.

Schéma 1: Systematické zařazení HCV (Rajčáni, 2006)

Čeleď – *Flaviviridae*

Rod – *Hepacivirus*

Druh, typy zástupců – Virus hepatitidy C

2.2 Morfologie

Pro virus hepatitidy C jsou charakteristické obalené sférické částice, jejichž lipidový obal tvoří dva glykoproteiny – E1 (30 kDa) a E2 (70 kDa). Částice dosahují průměru 30-80 nm, přičemž vnitřní kapsid má přibližně 33-35 nm. Virus hepatitidy C patří mezi ssRNA (single-stranded RNA, jednovláknové RNA) viry s pozitivní polaritou (Rajčáni, 2006). Přesná podoba virionů HCV nebyla známa až do roku 1994, kdy Kaito *et al.* pomocí elektronového mikroskopu tyto částice našli a vyfotografovali (pracovali se vzorky plazmy pacientů). Tehdy je popsali jako sférické částice s hroznatými výčnělky na povrchu. Těmito prvními a dalšími pozorováními byla odhalena morfologie HCV (Stránský, 1999).

2.3 Virový genom, genotypy

Jednovláknová molekula RNA tvořící genom HCV se skládá přibližně z deseti tisíc nukleotidů a má jeden dlouhý otevřený čtecí rámec (open reading frame, ORF). Z hlediska uspořádání je molekula RNA zakončena tzv. netranslačními oblastmi genomu, které nejsou překládány, tedy 5' UTR (untranslated region) a 3' UTR oblastmi. Bylo zjištěno, že 5' translační oblasti genomu kódují strukturní proteiny tvořící nukleokapsid a obal a na základě 3' translační oblasti genomu jsou syntetizovány nestrukturní proteiny. Translací je vytvořen polyproteinový prekurzor (3000 aminokyselin), jehož N-terminální proteiny (po rozštěpení: C – core protein, E1, E2/NS1 – obalové proteiny) plní strukturní funkci a C-terminální proteiny (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) hrají důležitou roli v průběhu replikace. NS3 protein je proteáza a helikáza, fosfoprotein NS5A má význam při replikaci a NS5B protein má RNA-polymerázovou aktivitu (Stránský, 1999).

Virus hepatitidy C je znám vysokou genetickou variabilitou. Jedná se o sekvenční nukleotidovou variabilitu, která je odlišná pro různé oblasti genomu a která vede k antigenním a biologickým změnám. Mezi oblastmi zachovávající si konzervativnost patří 5' UTR oblast a N-terminální úsek oblasti pro core protein. Naopak poměrně vysoce variabilní jsou oblasti genomu pro E1, E2, NS2, NS4, NS5 proteiny a 3' netranslační oblast. Významná jsou antigenní místa s rozdílnou aminokyselinovou sekvencí nacházející se na hypervariabilním úseku oblastí E1 a E2/NS1 (Stránský, 1999).

V průběhu infekce HCV se virus pokouší uniknout imunitní reakci, a proto vytváří tzv. obalové mutanty, které jsou však nestabilní. Stabilní formy viru, které označujeme

jako genotypy HCV, pravděpodobně vznikly podobným způsobem, avšak dlouhodobým procesem došlo k jejich ustálení. V minulosti existovalo několik metod stanovení a klasifikace genotypů HCV (Stránský, 1999). V devadesátých letech minulého století byla přijata klasifikace dle Simmondse, na jejímž základě vznikla celosvětová oficiální nomenklatura. Poměrně složitá metoda klasifikace byla založena na variacích sekvencí ve vybraných oblastech genomu HCV (NS5, E1 a 5' UTR), následných matematických výpočtech a zapisování do fylogenetických stromů. Výsledkem bylo stanovení šesti základních genotypů HCV, tedy HCV 1-6, jejichž nukleotidová sekvence byla oproti celému virovému genomu rozdílná o 31-33 %. Některé genotypy byly dále rozčleněny na subtypy (např. 1a-1c) lišící se o 20-25 % (Simmonds *et al.*, 1994; Stránský, 1999).

V následujících deseti letech byly postupně objevovány další genotypy a subtypy HCV, které byly označovány příslušnými vyššími čísly. Rovněž byl v určitých geografických oblastech zaznamenán výskyt rekombinantních forem mezi jednotlivými genotypy HCV (Kalinina *et al.*, 2002). Proto bylo nutné vytvořit stabilní klasifikační systém založený na objektivních kritériích, který by byl schopný pojmut jak nově rozpoznané genetické varianty, tak rekombinantní formy. V roce 2005 byla přijata nová verze klasifikace vycházející z fylogenetické analýzy určitých oblastí genomu (core, E1 a NS5B) a ze zjišťování kompletních genomových sekvencí HCV. Bylo ustanoveno šest základních genotypů (neboli kladů) HCV, nově objevené genotypy byly přejmenovány a zařazeny jako subtypy těchto základních genotypů. Rovněž byla stanovena pravidla pro přijetí nových subtypů a pro označování rekombinantních forem (Simmonds *et al.*, 2005).

Zjišťování genotypů HCV u infikovaných pacientů má význam především v klinické oblasti. U infekcí jednotlivými genotypy lze pozorovat odlišný průběh a rozdílnou odpověď na léčbu pegylovanými interferony a ribavirinem (Hnatyszyn, 2005). Proto se v klinické praxi ke genotypizaci používají testy vycházející z polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití specifických primerů a sond (Stránský, 1999).

Jak bylo uvedeno dříve, v průběhu replikace viru dochází k častým výskytům mutací, především v hypervariabilní oblasti E2/NS1, které dávají vzniknout velkému množství variabilních a nestabilních mutantů. Tyto mutanty, kteří jsou si ovšem blízce geneticky příbuzní, nazýváme kvazisppecies. V popředí souboru mutantů zůstává původní 'master genom' s vysokou replikační aktivitou, jehož je tudíž v populaci nejvíce. Kvazisppecies tak díky své variabilitě (především v obalových proteinech viru) zvyšují schopnost HCV vyhnout se imunitním reakcím, adaptace a setrvání v hostiteli, zapříčiňují rezistenci vůči lékům (interferonům) a komplikují nalezení vakcíny (Stránský, 1999).

2.4 Životní cyklus

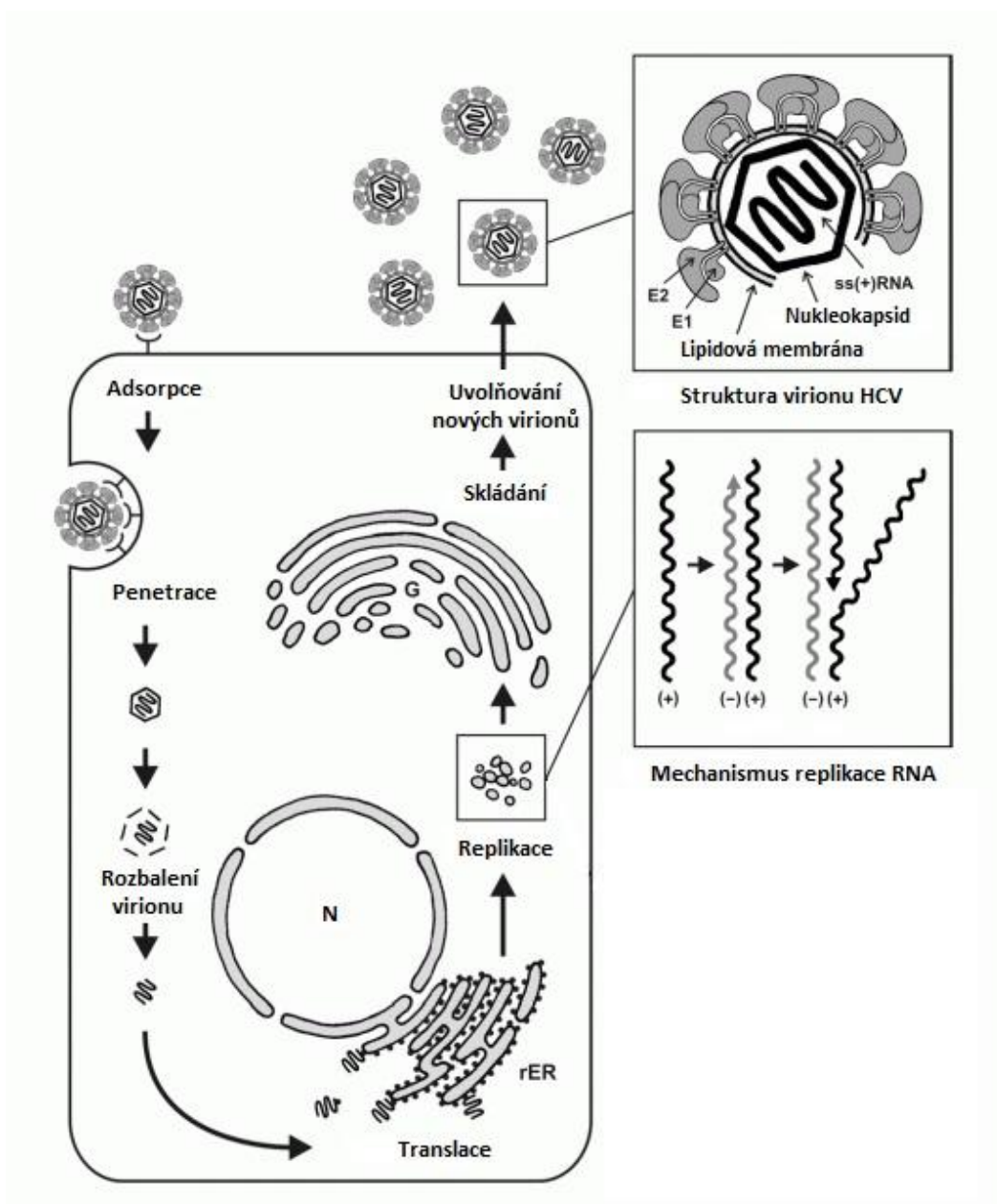
Některé fáze životního cyklu HCV v hostitelských buňkách zatím nebyly zcela objasněny, jeho základ je však obdobný jako u dalších virů z čeledi *Flaviviridae*. Skládá se tedy z adsorpce, penetrace, rozbalení virionu, translace a replikace, skládání a uvolňování nových virionů. Adsorpce virionů HCV na hostitelské buňky probíhá na základě interakce virových glykoproteinů E1 a E2 a buněčných receptorů (Rajčáni, 2006). V lidském organismu nalzáme hned několik možných receptorů plnících tuto úlohu (Chevaliez *et* Pawlotsky, 2006). Jedná se především o CD81 receptor na povrchu buněk mnoha typů, jako jsou B a T lymfocyty a hepatocyty (Kitadokoro *et al.*, 2001), který pravděpodobně působí jako koreceptor pro následné interakce (Cormier *et al.*, 2004). Dalšími receptory jsou například tzv. SR-BI (scavenger receptor B, typ I) na povrchu hepatocytů a také LDL-R (low-density lipoprotein receptor). Předpokládá se, že všechny zmíněné buněčné receptory interagují s glykoproteinem E2 (Chevaliez *et* Pawlotsky, 2006).

Následuje penetrace zahájená fúzí obalu virionu s cytoplazmatickou membránou buňky. Poté probíhá vezikulární endocytóza virového nukleokapsidu pomocí buněčných receptorů zprostředkovávajících endocytózu do cytoplazmy. Fúze je pod kontrolou specifických virových proteinů (jsou zřejmě součástí E1 a E2), průnik se děje za pomoci glykoproteinů E1 a E2 (Chevaliez *et* Pawlotsky, 2006; Lescar *et al.*, 2001).

Virová RNA je uvolněna z vezikuly vzniklé endocytózou, respektive z rozpadlého nukleokapsidu, do cytoplazmy a dále slouží jako templát pro syntézu polyproteinového prekurzoru. Translaci reguluje IRES (internal ribosome entry site), sekvence umístěná v 5' UTR oblasti a v počátku oblasti pro core protein. IRES zprostředkuje interakci virové RNA s ribozomem (na drsném endoplazmatickém retikulu - ER) a spolu s dalšími faktory iniciuje translaci (Chevaliez *et* Pawlotsky, 2006; Rajčáni, 2006). Vzniká polyproteinový prekurzor, který je transportován do lumenu ER, kde podléhá posttranslačním úpravám (McLauchlan *et al.*, 2002). Dojde k postupnému rozštěpení na jednotlivé strukturní a nestrukturní proteiny účinkem virové endogenní proteázové aktivity, pomocí NS2 a NS3 proteinů (Rajčáni, 2006).

Infekce HCV vede k přestavbě intracelulárních membrán bohatých zejména na mastné kyseliny a cholesterol (tzv. lipidové rafty). Takovou je i membrána ER, která je pak předpokladem vzniku replikačního komplexu. Iniaci jeho tvorby provádí protein NS4B. Komplex se skládá z virových proteinů, buněčných komponent a vznikajících RNA řetězců (Chevaliez *et* Pawlotsky, 2006). Replikace HCV probíhá ve dvou krocích katalyzovaných

proteiny NS5B (RNA-dependentní RNA polymeráza, RdRp) a NS3. Kdy je nejdříve na základě pozitivně nabitě jednovláknové RNA syntetizována negativně nabitá RNA, která je templátem pro produkci velkého množství kladné RNA, jež je dále využita v různých procesech. Jedním z nich je výstavba nových virionů uskutečňující se v cytoplazmě na povrchu membrány ER (Bartenschlager *et al.*, 2004; Rajčáni, 2006). Zformované kapsidy se obalují membránou vezikul uvolněných z ER, těmito vezikulami jsou poté viriony transportovány po cytoplazmě a uvolněny, obdobně jako při průniku do buňky (Rajčáni, 2006).



Obr. 1: Životní cyklus HCV (převzato a upraveno dle Chevaliez *et* Pawlotsky, 2006)

N – jádro, rER – drsné endoplazmatické retikulum, G – Golgiho komplex

2.5 Epidemiologie

Podle souhrnného průzkumu, jehož výsledky v roce 2004 zveřejnila Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO), je virem HCV celosvětově infikováno přibližně 130-170 milionů jedinců, což představuje asi 2-3 % celé populace. Odhaduje se, že ročně na následky infekce virem hepatitidy C zemře až 350 tisíc lidí. Souvisí to s rozvojem tzv. chronické hepatitidy a vývinem následných onemocnění (cirhóza jater, hepatocelulární karcinom). Infekci HCV a zejména její chronické formě je tedy přisuzována poměrně vysoká morbidita i mortalita (Averhoff *et al.*, 2012; Perz *et al.*, 2006).

V prevalenci infekce HCV nacházíme v rámci celého světa značné rozdíly, kdy se například významně liší počty infikovaných při porovnání dvou sousedních států nebo i v rámci geografických regionů jedné země (WHO, 2004). Plnohodnotné zhodnocení prevalence HCV však komplikuje omezené získávání epidemiologických dat v některých rozvojových zemích. Řada nakažených navíc ani neví o vlastní infekci, protože se u nich po delší dobu neprojevuje (Averhoff *et al.*, 2012). Obecně lze říci, že v USA a ve vyspělých zemích (západní Evropa, Austrálie) je prevalence HCV nižší, a to méně než 2 % populace. Naopak v řadě rozvojových zemí (východní Evropa, bývalý Sovětský svaz, Jižní Amerika, Afrika, země Středního východu, jižní Asie apod.) se promořenost HCV zvyšuje (více než 3 % populace). K zemím s nejvyšším procentem infikovaných patří Egypt (více než 10 % obyvatelstva) a Pákistán (WHO, 2004). V České republice bylo v roce 2011 evidováno přes 800 nakažených virem HCV (www.szu.cz). Celkově došlo v uplynulých padesáti letech k významnému rozšíření infekce po celém světě (WHO, 2004).

Za nejrozšířenější způsob infekce HCV je považován parenterální přenos, a to krevní transfúze, dialýza, transplantace orgánu, chirurgický zákrok, narkomanie, profesionální nákazy (náhodné píchnutí jehlou) apod. (Stránský, 1999). Hlavní zdroj infekce dříve představovala krevní transfúze, kvůli čemuž byly zavedeny testy darované krve na HCV (Horák *et al.*, 1999). I přesto krevní transfúze a příjem krevních derivátů zůstává jedním z rizikových faktorů, především v rozvojových zemích, kde krev není dostatečně kontrolována. V těchto zemích je obvykle zdravotnictví na nízké úrovni, špatné podmínky a neadekvátní používání jehel a dalších nemocničních nástrojů zde vedou k vysokému počtu nově infikovaných HCV. Ročně se jedná až o 2 miliony nakažených (Hauri *et al.*, 2004). Mezi další faktory infekce zahrnuté do zdravotnictví řadíme transplantaci solidních

orgánů a tkání (rovněž nutné testovat na HCV), léčbu chronickou hemodialýzou při selhání ledvin a stomatologické výkony (přítomnost HCV RNA byla prokázána i ve slinách). Infekce se tak může vyvinout u stomatologů s dlouhodobou praxí. Ohroženi jsou i další nemocniční pracovníci, kteří mohou být infikováni při vykonávání zákroků, procento nakažených není příliš vysoké (Horák *et Stříteský*, 1999).

Velmi vysoká prevalence HCV byla zaznamenána u nitrožilních narkomanů, zejména v Číně. V Mexiku, Pákistánu a Thajsku je odhadováno více než 80 % infikovaných narkomanů. V rozvinutých zemích se v současnosti stává nitrožilní užití drog primárním zdrojem infekce HCV (Nelson *et al.*, 2011). Zatímco skupinu nitrožilních narkomanů tvoří zejména mladší jedinci nakažení genotypem 3a, skupina nakažených prostřednictvím krevní transfúze nebo z neznámého zdroje zahrnuje starší osoby s infekcí genotypem 1b (Horák *et Stříteský*, 1999). Jedinci narození v letech 1945-1965 představují odhadem až tři čtvrtiny všech infikovaných HCV, tento trend se velmi výrazně uplatňuje v Japonsku a na Taiwanu (Alter, 2007).

K přenosu HCV může docházet i perkutánní cestou, a to nejčastěji potřísněním sliznice nebo kůže infikovanou krví. Možná je i infekce prostřednictvím otevřených ran na kůži, vážnějších popálenin a kožních onemocnění (Stránský, 1999). K rizikovým faktorům infekce HCV přiřazujeme tetování, akupunkturu, holení, propíchnutí ušních boltců, některé kulturně specifické praktiky v léčitelství apod. (Horák *et Stříteský*, 1999). Hlavní příčinou markantní prevalence HCV v Egyptě je program zaměřený na eradikaci schistosomiázy v šedesátých a sedmdesátých letech minulého století, kdy byly opakovaně používány stejné injekční stříkačky (Averhoff *et al.*, 2012).

U významného procenta (30-50 %) nakažených HCV nelze zjistit přesný zdroj infekce nebo nelze dokázat, že jedinci mohli být exponováni infekcí z krve. Existují nonparenterální možnosti přenosu, a to již zmiňovaný přenos slinami a také spermatem, virus byl prokázán i v moči. Možný je heterosexuální a homosexuální přenos, avšak pravděpodobnost infekce je nízká, rizikovou skupinu představují prostitutky či jedinci s dlouhodobým sexuálním vztahem s infikovaným. Prokázána byla infekce HCV mezi jednotlivými rodinnými příslušníky – rodiče, manželé, sourozenci. K vertikálnímu přenosu z matky na dítě dochází zřejmě v průběhu porodu, ale jen vzácně. Pokud je však matka současně HIV pozitivní, disponuje větší viremii a riziko přenosu na dítě se zvyšuje. Současná infekce HCV a HIV má rovněž negativní vliv na rychlost průběhu souvisejících onemocnění jater (Horák *et Stříteský*, 1999). Podle nejnovějších odhadů postihuje koinfekce HCV více než 30 % z 33 milionů nakažených HIV (Price *et Thio*, 2010).

2.6 Patogeneze infekce HCV a imunitní odpověď hostitele

Infekce virem hepatitidy C může mít v lidském organismu akutní nebo chronický charakter. U většiny postižených (70-80 %) infekce přetrvává a u přibližně třiceti procent z nich se pak vyvíjí záněty a vážná chronická onemocnění jater, především cirhóza a hepatocelulární karcinom. Avšak asi u 30 % infikovaných dochází ke spontánní eliminaci akutní infekce HCV. Na to, zda dojde k vývinu chronického onemocnění nebo naopak k vymizení akutní infekce, mají vliv epidemiologické a virové faktory i faktory pocházející od hostitele (Thomas *et al.*, 2009). Hlavní roli zde zastává především imunitní odpověď hostitele a její komplexní interakce s HCV, které udávají povahu následného vývinu a progresu infekce (Rehermann *et Nascimbeni*, 2005). Imunitní odpověď zapřičiňuje i vlastní akutní či chronická onemocnění jater. HCV je totiž hepatotropní, avšak nevykazuje přímý cytopatický účinek na buňky. Poškození jater je výsledkem působení specifických lymfocytů proti infikovaným jaterním buňkám (Bertoletti *et Ferrari*, 2003).

2.6.1 Patogeneze akutní infekce HCV

Patogeneze akutní infekce HCV má obvykle následující postup. HCV RNA bývá v séru detekovatelná do dvou týdnů po vystavení infekci virem, její hladiny se rychle zvyšují v důsledku replikace viru (Bertoletti *et Ferrari*, 2003). Délka inkubačního období se odvíjí od způsobu přenosu infekce HCV. Při infekci menším množstvím virových částic lze HCV RNA v séru detekovat obvykle až po delší době (Maasoumy *et Wedemeyer*, 2012). Po fázi rychlé replikace následuje období dlouhé 4-6 týdnů, kdy zůstávají hladiny HCV RNA v séru přibližně stejné nebo se jen mírně zvyšují (Bertoletti *et Ferrari*, 2003). To je zapřičiněno stimulací vrozené imunitní reakce. Virus hepatitidy C však disponuje mechanismy, které vrozenou imunitní odpověď zmírňují (Rehermann, 2005). V této první fázi infekce zřejmě HCV potlačuje i získanou imunitní odpověď. Díky imunologickým studiím bylo dokázáno, že očekávaná specifická buněčná imunitní reakce bývá zaznamenána až po 1-2 měsících od infekce HCV (Bertoletti *et Ferrari*, 2003) a humorální imunitní odpověď dokonce až po 2-3 měsících (Rehermann *et Nascimbeni*, 2005). Lymfocyty proti HCV tedy nejsou produkovány a zatím nemohou způsobovat jaterní poškození, infekce se obvykle vyvíjí bez příznaků, bez žloutenky (Rehermann *et Nascimbeni*, 2005). Replikační fáze je také spojena se zvýšenou aktivitou aminotransferáz, které se nacházejí v jaterních a svalových buňkách. V průběhu infekce jsou aminotransferázy nadměrně uvolňovány z poškozovaných jaterních buněk do krve

(Horák *et* Stříteský, 1999). Po dosažení maximální koncentrace aminotransferáz v krvi obvykle následuje fáze, kdy se hladiny HCV RNA v séru postupně snižují (Heller *et* Rehmann, 2005).

V následné patogenezí infekce HCV jsou u jednotlivých pacientů pozorovány značné rozdíly. Vlivem dostatečného působení vrozené a získané humorální a především buněčné imunitní odpovědi může dojít k vymizení akutní infekce HCV (Fafi-Kremer *et al.* 2012). V některých případech potlačení infekce nebyly v krvi ani zaznamenány žádné specifické protilátky proti HCV (Heller *et* Rehmann, 2005). Jsou známy situace, kdy se akutní infekce po několika měsících opakuje, to je zřejmě zapříčiněno nedokonalou eliminací viru z jaterních buněk (Rehmann *et* Nascimbeni, 2005). U řady pacientů po akutní infekci vzniká chronické onemocnění, a to vlivem slabé imunitní reakce a mechanismů, díky kterým virus uniká imunitnímu dohledu (Fafi-Kremer *et al.*, 2012). Objevují se také pacienti, u kterých má onemocnění od začátku chronický charakter (Horák *et* Stříteský, 1999). Po vývinu chronické infekce dochází k eliminaci HCV jen velmi zřídka (Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012).

2.6.2 Vrozená imunitní odpověď proti HCV a gen pro interleukin 28B

Vrozená imunita představuje první obranný mechanismus organismu namířený proti infekci HCV. K tomuto typu imunity patří endogenní sekrece interferonu a působení NK buněk (natural killer) (Caruntu *et* Benea, 2006).

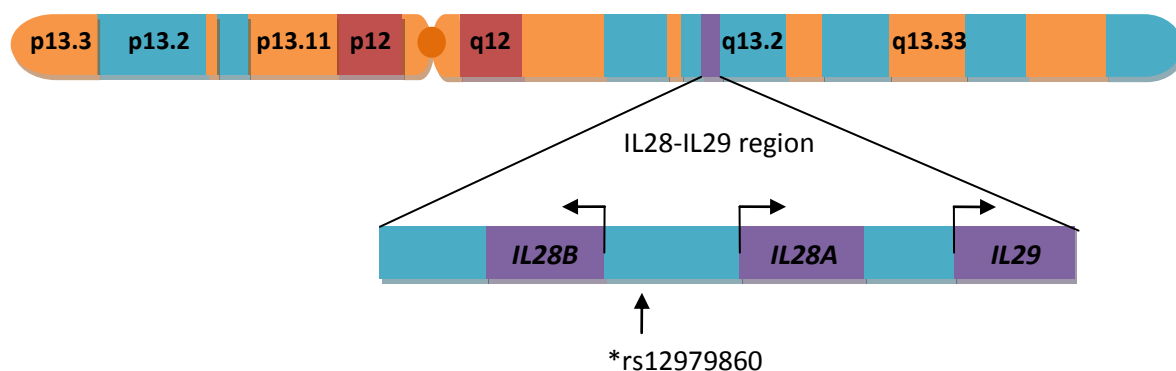
V průběhu akutní fáze infekce je jedním z prvních kroků vrozené imunitní odpovědi produkce interferonů typu I, ke kterým jsou řazeny interferon α (IFN- α) a interferon β (IFN- β). Interferon typu I má několik antivirových a imunomodulačních účinků (Bertoletti *et* Ferrari, 2003). Aktivuje buněčnou proteinkinázu a způsobuje tak inhibici proteinové syntézy v infikovaných buňkách. Dále inhibuje virovou replikaci aktivací enzymu 2'-5' oligoadenylát syntetázy a specifických proteinů. Zvyšuje expresi genů hlavního histokompatibilního komplexu (human leucocyte antigen, HLA) v antigen prezentujících a infikovaných buňkách. Stimuluje činnost NK buněk, dendritických buněk a CD8⁺ lymfocytů, taktéž podněcuje vliv molekul podílejících se na apoptóze infikovaných buněk. V podmínkách *in vitro* je virus vůči interferonu citlivý, ukazuje se však, že HCV vyvinul různé strategie, díky kterým potlačuje antivirové působení interferonu *in vivo*. HCV snižuje intracelulární produkci interferonu α prostřednictvím některých svých nestrukturních proteinů (NS4A, NS5A), které ovlivňují regulační faktory produkce

interferonu. Dále virové proteiny E2 a NS5A tlumí aktivitu specifického enzymu, který je aktivován interferonem a účinkuje proti virové replikaci (Caruntu *et Benea*, 2006). Virus tedy v prvních fázích infekce podněcuje tvorbu interferonu, avšak zdá se, že je proti jeho účinku relativně rezistentní (Heller *et Rehermann*, 2005).

Vedle interferonu typu I (IFN- α a IFN- β) jsou do imunitní odpovědi proti viru HCV pravděpodobně zapojeny také interferony typu III. Mezi které patří IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3, u nichž se předpokládá stejný účinek, jako u interferonu typu I, protože jsou indukovány virovou infekcí a v podmínkách *in vitro* vykazují antivirovou aktivitu (Kotenko *et al.*, 2003). V případě IFN- λ 1 je prokázán inhibiční vliv na HCV, indukuje zvýšení exprese interferonem stimulovaných genů a podporuje antivirové působení IFN- α (Marcello *et al.*, 2006). IFN- λ 3 zřejmě účinkuje stejně jako IFN- λ 1 (Thomas *et al.*, 2009).

Gen pro interleukin 28B (*IL28B*) kódující IFN- λ 3 leží u člověka na dlouhém raménku chromozomu 19, v blízkosti genů pro IFN- λ 1 (gen *IL29*) a IFN- λ 2 (gen *IL28A*). Přesná lokalizace genu je vyobrazena na obrázku (Obr. 2). V jednom z recentních výzkumů byl identifikován jednonukleotidový polymorfismus rs12979860, neboli -3176C/T, v oblasti genu pro interleukin 28B (Ge *et al.*, 2009). Předpokládá se, že tento polymorfismus způsobuje změnu funkce IFN- λ 3, což má následně vliv na eliminaci infekce HCV. Jsou známy dvě alelové formy tohoto polymorfismu, alela C a T. V další studii bylo zjištěno, že genotyp CC je úzce spojen se spontánním vymizením akutní infekce HCV. Alela C je recesivní, genotypy TT a CT nevykazují pozitivní účinek na spontánní eliminaci HCV. Jedná se zřejmě o jeden z nejdůležitějších genetických faktorů spojených s přirozeným vymizením infekce HCV. V jedné z následných kapitol bude prezentováno využití určování genotypů u pacientů při léčbě infekce HCV (Thomas *et al.*, 2009).

Bylo objeveno několik dalších polymorfismů v oblasti genu *IL28B*, kde za příznivé genotypy s pozitivním efektem v eliminaci infekce jsou považovány TT rs8099917, TT rs8105790, AA rs12980275 a CC rs10853728 (Rao *et al.*, 2012).



Obr. 2: Lokalizace genu *IL28B* a polymorfismu rs12979860 (-3176C/T) na dlouhém raménku lidského chromozomu 19 (překresleno dle Hayes *et al.*, 2012)

Vrozená imunita zahrnuje rovněž NK buňky, jejichž aktivita může být ovlivněna působením virových proteinů. Proteiny se váží na povrch NK buněk a blokují jejich aktivitu, cytotoxický efekt a také sekreci cytokinů. Signály z vrozené imunitní reakce působí na maturaci dendritických buněk propojujících vrozenou a specifickou imunitu. Dendritické buňky patří mezi antigen prezentující buňky (Caruntu *et Benea*, 2006).

2.6.3 Specifická imunitní odpověď proti HCV

Specifická buněčná imunita je všeobecně považována za rozhodující faktor udávající průběh infekce HCV v organismu. Podílí se na ní působení $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů specifických vůči HCV a jejich sekrece cytokinů (Caruntu *et Benea*, 2006). Včasná, silná, polyklonální a multispecifická buněčná odpověď obvykle vede k eliminaci infekce HCV. Naopak při pozdní, krátkodobé, slabší buněčné reakci namířené jen proti několika virovým epitopům přechází infekce do chronické podoby (Orland *et al.*, 2001).

$CD4^+$ pomocné T lymfocyty rozpoznávají krátké exogenní antigenní peptidy navázané prostřednictvím HLA molekul II. třídy na povrchu antigen prezentujících buněk, mezi které patří dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty (Koszinowski *et al.*, 1991). Nejvíce imunogenními virovými antigeny jsou core protein, NS3 a NS4 proteiny (Tsai *et al.*, 1997). Tato imunitní odpověď je tedy namířena převážně proti nestrukturním proteinům a vysoce konzervovaným epitopům. $CD4^+$ T lymfocyty pak pomocí produkce lymfokinů regulují aktivitu antigen specifických B lymfocytů a $CD8^+$ T lymfocytů (Cerny

et Chisari, 1999). Th1 cytokiny stimulují cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty, Th2 cytokiny zase produkci protilátek B lymfocyty. Ukazuje se, že intenzivní produkce cytokinů Th1 je obvykle spojena se spontánní eliminací infekce HCV (*Caruntu et Benea, 2006*).

CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty interagují svými receptory s antigenními virovými peptidy syntetizovanými v buňkách. Ty jsou na povrchu infikovaných buněk prezentovány díky HLA molekulám I. třídy, kterými disponují všechny jaderné buňky v těle. CD8⁺ T lymfocyty rozpoznávají jak konzervované, tak variabilní epitopy všech proteinů HCV. Tento typ lymfocytů působí cytotoxicky a většinou tedy vede k apoptóze infikovaných buněk. Účinek CD8⁺ T lymfocytů nemusí být namířen pouze přímo proti infikovaným buňkám, ale může ovlivňovat i neinfikované buňky v okolí pomocí sekretovaných mediátorů podporujících apoptózu (*Cerny et Chisari, 1999*). Při rezistenci buněk k těmto mediátorům často vzniká hepatocelulární karcinom (*Horák et Stříteský, 1999*). Pokud je tento typ buněčné odpovědi dostatečně intenzivní, může dojít k eliminaci infikovaných buněk a tedy i virové infekce. Obvykle však působení CD8⁺ T lymfocytů není adekvátní, což vede k persistenci viru a vzniku chronického poškození jaterních buněk. U většiny pacientů i přes stálou polyklonální a multispecifickou imunitní odpověď cytotoxických T lymfocytů infekce přetrvává a objevují se chronická onemocnění jater (*Cerny et Chisari, 1999; Doherty et Zinkernagel, 1974*).

Specifické CD4⁺ T lymfocyty pravděpodobně působí i po odeznění akutní infekce až po dobu několika let, zatímco odpověď CD8⁺ T lymfocytů s postupem času vymizí (*Caruntu et Benea, 2006*).

Humorální odpověď zůstávala po dlouhou dobu opomíjena a byla považována za méně důležitou a účinnou v obraně proti infekci HCV. K tomu pravděpodobně přispěl i nedostatek modelových systémů a organismů pro studium jejího významu. V posledních letech se však objevily výzkumy odhalující role neutralizačních protilátek anti-HCV, které si kladou za cíl naleznout účinnou vakcínu (*Fafi-Kremer et al., 2012*). Neutralizační protilátky mohou být v séru detekovány přibližně v době po vypuknutí buněčné imunitní reakce a po zvýšení hladiny aminotransferáz v krvi (*Heller et Rehmann, 2005*). Bylo zjištěno, že první detekovatelné protilátky cílí na NS3 a core proteiny. Poté se objevují protilátky specificky zaměřené proti obalovým glykoproteinům E1 a E2 (*Caruntu et Benea, 2006*). Zejména pro regiony kódující glykoprotein E2 je příznačná vysoká genetická variabilita, která snižuje celkový účinek protilátek a omezuje jejich účinnost při reinfekci HCV (*Fafi-Kremer et al., 2012*). Proto protilátkám anti-HCV není přisuzován neutralizační efekt v imunitní obraně organismu (www.ces-hep.cz).

2.6.4 Mechanismy persistence infekce HCV, patogeneze chronické infekce HCV

Virus hepatitidy C uniká imunologickému dohledu hned na několika úrovních pomocí různých mechanismů. Řada z nich zatím nebyla zcela objasněna. Některé strategie, které virus v průběhu evoluce vyvinul k obraně proti imunitní odpovědi, byly zmíněny v předešlých kapitolách (např. rezistence k interferonu apod.) (Caruntu *et* Benea, 2006).

Za hlavní mechanismus uplatňovaný v perzistenci viru v organismu je považována jeho vysoká genetická variabilita. HCV RNA-polymeráza NS5B syntetizuje RNA s řadou nepřesností a dává vzniku bodovým mutacím vedoucím ke genetické a posléze strukturní variabilitě mezi jednotlivými tzv. kvaziespecies (Fafi-Kremer *et al.*, 2012). Jak bylo zmíněno výše, dochází v primární fázi infekce k opoždění specifické imunitní odpovědi, což poskytuje viru dostatek prostoru a času k vytvoření mnoha různých mutantů, kvaziespecies. Při nástupu specifické imunitní reakce jsou z těchto mutantů rychle selektováni ti, kteří jsou odolní vůči specificky zaměřeným lymfocytům (Rehermann *et* Nascimbeni, 2005). Kvaziespecies unikají buněčné odpovědi prostřednictvím více strategií. Jejich antigenní peptidy nemohou být identifikovány nebo se nemohou vázat na HLA molekuly a být prezentovány na povrchu buněk, taktéž nemohou být rozpoznány specifickými receptory lymfocytů, případně protilátkami (Caruntu *et* Benea, 2006). Následné působení neutralizačních protilátek také vyvíjí pozitivní selekční tlak na virové populace, což vede k dalšímu rozšiřování diverzity mutantů a k perzistenci HCV. Virus je tak stále o krok napřed před imunitním systémem. Obecně platí, že pokud virus v organismu disponuje nízkou genetickou variabilitou, dochází k eliminaci infekce. (Farci *et al.*, 2000). Naopak vysoce variabilní populace unikají imunitní reakci organismu a vyvíjí se chronická infekce (Caruntu *et* Benea, 2006).

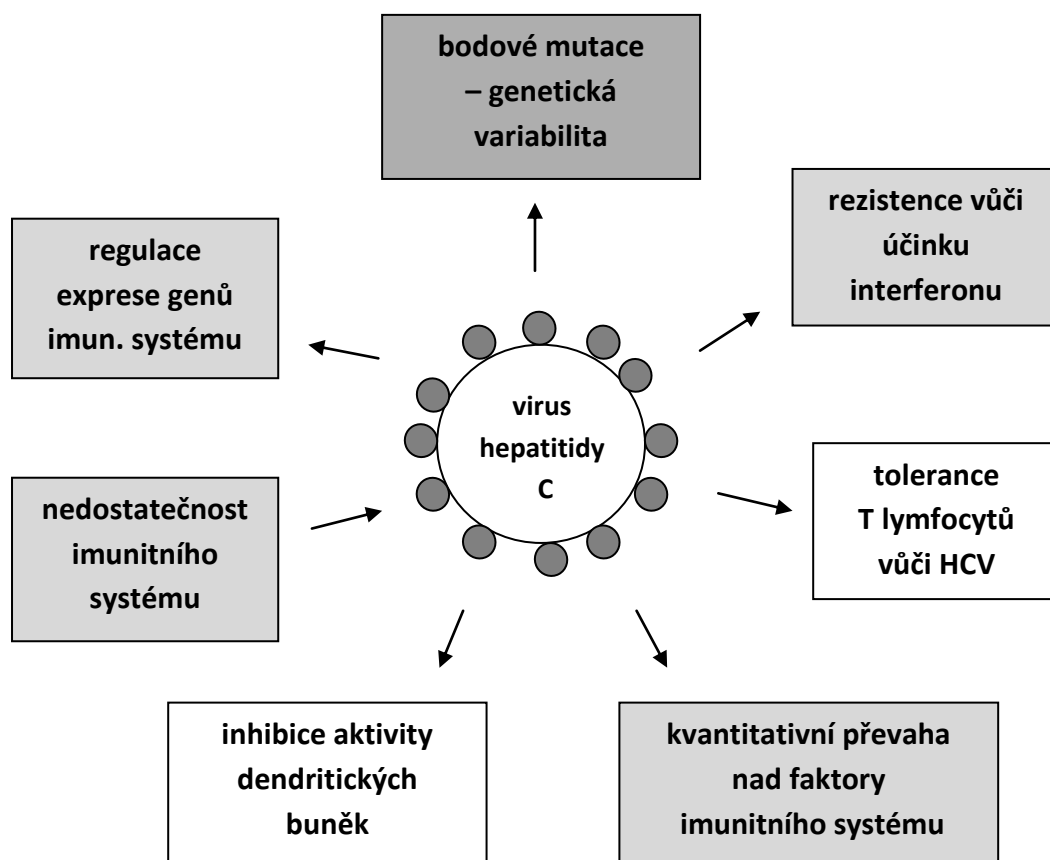
Virus může imunitní odpověď překonat i na základě kvantitativní převahy nad jejími faktory. Infekce analogicky přetrvává i díky kvantitativní či kvalitativní nedostatečnosti imunitní reakce. Při dlouhodobé perzistenci viru v organismu se rovněž objevuje tolerance T lymfocytů vůči viru. Virus může dále regulovat, respektive snižovat expresi genů zapojených v obraně proti infekci (Cerny *et* Chisari, 1999).

K úniku přispívají i proteiny HCV, například core protein prokazatelně ovlivňuje diferenciaci, proliferaci a funkci T lymfocytů. Dále virové proteiny potlačují aktivitu dendritických buněk a způsobují snížení sekrece jejich cytokinů (Sarobe, 2006; Caruntu *et* Benea, 2006).

Díky všem těmto a dalším mechanismům virus v hostiteli přetrvává, pokud je HCV RNA v séru detekovatelná i po šesti měsících po přenosu, lze tento stav definovat jako

chronickou infekci HCV (Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012). HCV se neustále replikuje a šíří mezi jaterními buňkami, což vede k jejich poškození a apoptóze vlivem stálé, i když obvykle slabé, buněčné imunitní odpovědi. Hepatocyty stimulované k apoptóze produkují látky, které aktivují imunitní hvězdicovité buňky. Z nich vznikají myofibroblasty, které syntetizují kolagen, fibronectin a laminin. Vytváří se extracelulární vazivová matrix a jaterní fibróza (Horák *et* Stříteský, 1999). Vyvíjí se další jaterní choroby, které budou shrnuty v následující kapitole.

Schéma 2: Mechanismy persistence viru HCV v organismu



2.7 Klinický obraz virové hepatitidy C

Mezi jednotlivými jedinci s akutní či chronickou infekcí HCV lze pozorovat rozdíly ve výsledném klinickém obrazu onemocnění. U většiny z nich se v prvních fázích akutní, respektive chronické infekce neobjevují žádné příznaky. Na druhou stranu, u některých se vyvíjí nespecifické či specifické příznaky, případně mimojaterní onemocnění a komplikace. Díky způsobům přenosu HCV je navíc významné procento pacientů vedle HCV infikováno také virem hepatitidy B nebo HIV. Tyto koinfekce a rovněž nadměrná konzumace alkoholu mají významný vliv na průběh infekce HCV a dané projevy onemocnění (Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012).

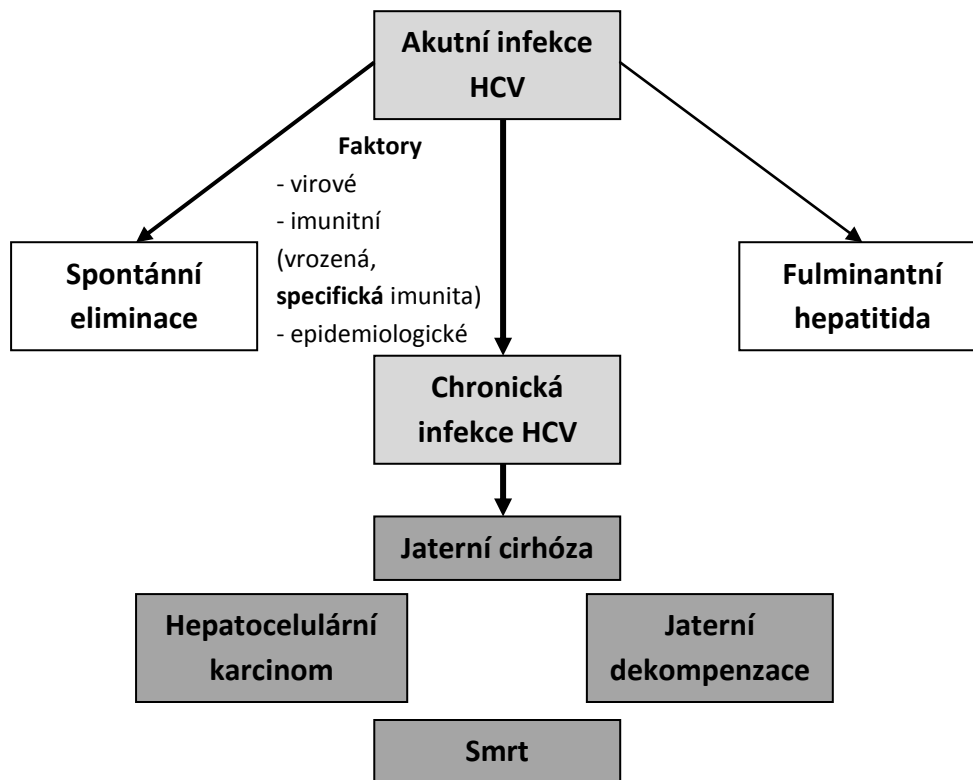
Akutní infekce HCV obvykle není doprovázena žádnými příznaky, což přispívá k tomu, že postižení si nejsou vědomi infekce, která se tak může dále rozvíjet. U některých pacientů lze zaznamenat nespecifické symptomy, například únavu, nauzeu, bolesti břicha, ztrátu chuti k jídlu, mírnou horečku, svalovou bolest apod. Případně také specifické projevy vyplývající z poškození jater, jako je žloutenka (Loomba *et al.*, 2011). Zajímavé je, že u pacientů s rozvinutými příznaky dochází s větší frekvencí k eliminaci infekce HCV. Fulminantní průběh infekce se vyskytuje jen v ojedinělých případech (Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012).

Charakter chronického onemocnění je u pacientů variabilní, mezi doprovodné, nespecifické příznaky patří nauzea, bolesti v pravé části břicha, únava, svalová bolest, bolesti kloubů atd. (Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012). V klinickém obrazu chronické hepatitidy zaujímají významné postavení i mimojaterní onemocnění. Řadíme zde smíšenou kryoglobulinémii, při které se v krvi vyskytují kryoglobuliny. Jedná se o imunoglobuliny precipitující při teplotě nižší než 37 °C (Pischke *et al.*, 2008). Chronickou infekci HCV dále doprovází i *diabetes mellitus* typu 2 a poruchy centrální nervové soustavy, únava a deprese (Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012).

Jaterní cirhóza spojená s jaterní dekompenzací a hepatocelulární karcinom představují pokročilá stádia onemocnění. Jaterní cirhóza je zaznamenána asi u 15-56 % pacientů s chronickou infekcí. K faktorům, které zvyšují pravděpodobnost vzniku cirhózy, zařazujeme zvyšující se věk pacientů v kombinaci s postupující fibrózou jaterní tkáně, rozdílnost genotypů HCV, vývin jaterní steatózy v průběhu infekce a také zvýšenou konzumaci alkoholu (Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012). Cirhózu jater v řadě případů následuje vývin hepatocelulárního karcinomu, ten však může vznikat i v infikovaných játrech bez cirhózy (Lok *et al.*, 2009). Karcinom je často první klinicky

zaznamenanou komplikací poškození jater a předchází celkové jaterní dekompenzaci. Dekompenzaci provází vývin ascitu a krvácení do trávicího traktu. Konečným stádiem onemocnění je pak smrt (Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012).

Schéma 3: Průběh infekce virem hepatitidy C (dle Maasoumy *et* Wedemeyer, 2012)



2.8 Prevence

Strategie uplatňované v prevenci proti infekci HCV a v kontrole jejího šíření vyplývají z epidemiologických poznatků a výsledků použití léčby u pacientů (Thomson *et* Finch, 2005). V mnoha státech v tomto ohledu zatím nebyla přijata a uskutečněna dostatečná opatření. Na druhou stranu v zemích, kde byly provedeny příslušné zásahy proti šíření infekce HCV, i tak neustále vzrůstá morbidita a mortalita v důsledku onemocnění spojených s touto infekcí (Averhoff *et al.*, 2012). Situaci komplikuje celá řada faktorů, především bezpříznaková prvotní stádia infekce. Nakažení jedinci o vlastní infekci nemusí po dlouhou dobu vědět, nepodstupují léčbu a představují zdroj pro další přenos. Rozrůstá se tak „skrytá“ epidemie (Hagan *et* Schinazi, 2013).

Prevence vyžaduje v každé zemi či regionu individuální přístup. Opatření by měla být obecně zaměřena na testování potenciálně infikovaných, léčbu pacientů, zvýšení veřejného

povědomí o HCV a zejména na zamezení přenosu infekce na další jedince či případné reinfekce (Averhoff *et al.*, 2012). Zvláštní pozornost vyžadují rizikové skupiny, jako nitrožilní narkomani (příkladem prevence je pravidelné vyměňování jehel) a vězni. Významné je i vzdělávání ve školách (Thomson *et Finch*, 2005).

2.9 Terapie

2.9.1 Terapie akutní a chronické infekce virem hepatitidy C

Léčba infekce virem hepatitidy C je i v současnosti předmětem mnoha studií a výzkumů. Řada z nich přinesla v posledních přibližně dvaceti letech významné poznatky, které přispěly k poměrně rychlému vývoji nových terapeutických postupů. Nové možnosti několikanásobně zvýšily účinnost léčby a naopak redukovaly výskyt nepříznivých vedlejších účinků spojených s terapií (Hagan *et Schinazi*, 2013).

Problematickým bodem zůstává vhodná iniciace terapie s ohledem na patogenezi a klinický průběh onemocnění, především v případě akutní infekce HCV. V definici a zavedení léčby akutní infekce lze pozorovat odlišné názory odborníků (www.ces-hep.cz). U symptomatických pacientů dochází s velkou pravděpodobností ke spontánní eliminaci infekce, proto se zde nabízí odklad terapie. U mnoha infikovaných se však příznaky nevyskytují. Obecně je tedy doporučeno zahájit terapii i u pacientů s akutní infekcí, důležitý je zde ale individuální přístup (Caruntu *et Benea*, 2006; Thomson *et Finch*, 2005).

U většiny jedinců s chronickou infekcí HCV je doporučeno zahájit protivirovou terapii, zejména u těch s rizikem vývoje jaterní cirhózy. Cílem terapie je redukovat rozvoj komplikací hepatitidy, měřítkem úspěšnosti léčby je dosažení tzv. setrvalé virologické odpovědi (sustained virological response, SVR), kterou definujeme jako negativní sérovou HCV RNA ve 24. týdnu po skončení terapie (www.ces-hep.cz).

V 90. letech minulého století byla zavedena léčba interferonem α aplikovaným třikrát týdně subkutánně v kombinaci s denním podáním ribavirinu (RBV) jako syntetického analoga nukleosidu. SVR bylo dosaženo jen u přibližně 40 % léčených pacientů (Thomson *et Finch*, 2005).

Následovalo uvedení kombinované terapie s pegylovanými interferony neboli peginterferony (peg-IFN). Podávání 40-kDa peginterferonu α -2a nebo 12-kDa peginterferonu α -2b v kombinaci s ribavirinem zůstává i v současnosti standardním postupem při léčbě infekce HCV (Manns *et al.*, 2001). Kombinovaná terapie peg-IFN

s ribavirinem dosahuje daleko lepších výsledků než léčba aplikovaná v 90. letech. Procento SVR u pacientů se odvíjí především od virového genotypu. U pacientů infikovaných genotypy 2, 3, 5 a 6 při 24 týdenním podání peg-IFN a RBV dojde k setrvalé virologické odpovědi až v 75-80 % případů. V případě genotypu 4 dojde k SVR po 48 týdnech terapie asi u 70 % osob (Hagan *et* Schinazi, 2013). Menší efektivnost léčby je pozorována u jedinců infikovaných genotypem 1, kdy byla zaznamenána úspěšná terapie jen u asi 40 % pacientů i po 48 týdnech podávání peg-IFN a RBV (Hagan *et* Schinazi, 2013; Thomson *et* Finch, 2005). U mnoha pacientů podstoupivších tuto kombinovanou terapii se objevily vedlejší příznaky, jako anémie, deprese, příznaky podobné chřipce apod., což u řady z nich vedlo k vysazení léků a tedy i narušení léčby. Mezi hlavní faktory, které ovlivňují úspěšnost standardní terapie, patří vedle genotypu HCV také polymorfismus genu pro IL28B, rasový původ pacienta, absence/přítomnost cirhózy, věk, pohlaví, výchozí množství virové RNA a doba zahájení léčby (Hagan *et* Schinazi, 2013). Polymorfismu genu pro interleukin 28B je v posledních letech přisuzován poměrně velký význam v predikci úspěšnosti terapie (www.ces-hep.cz).

Novým příslibem pro stále nevyлечené pacienty se zdají být tzv. přímo působící virostatika (directly acting antivirals, DAA), která by měla být v brzké době široce zaváděna. Při použití DAA je očekáváno dosažení SVR až u 90 % pacientů (Hagan *et* Schinazi, 2013). Jedná se o látky, které narušují replikační cyklus HCV. Schváleny pro použití v terapii chronické infekce HCV byly zatím boceprevir a telaprevir v kombinaci s peg-IFN a RBV. Telaprevir a boceprevir inhibují virovou serinovou proteázu. Mnoho podobných léků je v současné době ve fázi klinického testování. DAA zatím vykazují účinnost především v léčbě jedinců infikovaných genotypem 1, kteří po dlouhou dobu představovali problematickou skupinu (EASL, 2011). Obecným faktorem komplikujícím léčbu infekce HCV, včetně terapie DAA, je rychlá selekce rezistentních variant HCV (www.ces-hep.cz).

2.9.2 Polymorfismus genu pro interleukin 28B

Míra úspěšnosti terapie chronické infekce HCV je ovlivňována množstvím faktorů pocházejících jak od viru, tak od hostitele. I když je kombinovaná léčba peg-IFN spolu s RBV hodnocena jako poměrně účinná, u řady pacientů při ní nedochází k potlačení infekce. Také jsou pozorovány odchylky v úspěšnosti léčby v různých geografických oblastech, respektive v rasových populacích, například při srovnání četnosti SVR u jedinců

evropského a afrického původu. Tyto a další indicie vedly k předpokladu existence hostitelských genetických faktorů předpovídajících efektivnost antivirové terapie (Ge *et al.*, 2009). Od roku 2009 bylo objeveno několik jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism, SNP) v oblasti genu pro interleukin 28B, které, jak se ukázalo, jsou silně spojeny s dosažením SVR u pacientů. (Ge *et al.*, 2009; Rauch *et al.*, 2010). Funkce a lokalizace genu *IL28B* byly popsány v kapitole 2.6.2.

Na význam SNP v oblasti genu *IL28B* poprvé výrazněji upozornila studie Ge *et al.* (2009), která poukázala na vliv SNP rs12979860 v kombinované virové terapii. SNP lokalizovaný v pozici -3176 se vyskytuje ve dvou alelových formách, tj. jako alela C a alela T. Ge *et al.* (2009) zjistili, že u pacientů s genotypem CC v tomto SNP je zaznamenána více jak dvakrát vyšší úspěšnost kombinované terapie nežli u jedinců s genotypem TT. Tento fakt platí pro jedince jak evropského, tak afroamerického či hispánského původu. Dále objevili rozdíly ve frekvenci alel a genotypů v jednotlivých rasových populacích, což poskytlo vysvětlení pro vyšší četnost SVR u pacientů evropského původu. Ve studii byly rovněž determinovány další dva genetické polymorfismy v oblasti genu pro interleukin 28B, které jsou ve vztahu se SNP rs12979860. Jedná se o SNP rs28416813 a rs8103142, kdy posledně jmenovaný vede k záměně aminokyseliny lysinu za arginin (Ge *et al.*, 2009). Předpokládá se, že právě tato změna může ovlivňovat výslednou funkci kódovaného IFN- λ 3 (Thomas *et al.*, 2009). Přesný mechanismus, jakým různé varianty SNP rs12979860 působí při terapii, však zatím nebyl zcela objasněn (www.ces-hep.cz). Thomas *et al.* (2009) později ukázali roli tohoto polymorfismu v pravděpodobnosti spontánní eliminace infekce HCV (viz kapitola 2.6.2).

Postupně byly determinovány i další polymorfismy v oblasti genu pro interleukin 28B působící na účinnost léčby, příkladem může být pozitivní vliv genotypu TT v SNP rs8099917 (Rauch *et al.*, 2010). Polymorfismus rs12979860 je však považován za nejvýznamnější, i když řada výzkumů zpochybnila jeho roli v léčbě a zejména v predikci spontánní eliminace HCV (např. Rao *et al.*, 2012).

Při srovnání vlivu příznivého genotypu CC rs12979860 na výsledný efekt terapie s faktory pocházejícími od hostitele (věk, pohlaví, stupeň fibrózy) a dalšími faktory (výchozí hladina HCV) byly získány pozoruhodné výsledky. Ukázalo se, že prediktivní hodnota účinnosti léčby je u genotypů *IL28B* vyšší než u zbylých faktorů a je vyšší u virového genotypu 1 než u genotypů 2 a 3 (Ge *et al.*, 2009; www.ces-hep.cz). Vztah mezi genotypem CC rs12979860 a dosažením SVR se jeví jako zatím nejcitlivější a nejdůležitější faktor od hostitele udávající úspěšnost terapie (www.ces-hep.cz).

Stanovení genotypů u pacientů postižených chronickou infekcí HCV má tedy význam v předpovědi dosažení SVR a účinnosti terapie (www.ces-hep.cz). Může tak ovlivnit zavedení léčby peg-IFN spolu s RBV u konkrétního pacienta (Ge *et al.*, 2009). V roce 2010 byly uvedeny komerční soupravy, které slouží ke stanovení genotypu v polymorfismu rs12979860 (-3176C/T). Lékaři se pak mohou na základě zjištěného genotypu a dalších prediktivních faktorů rozhodnout, zda u pacienta použít například opakovanou léčbu peg-IFN nebo raději vyčkat na dobu zavedení DAA. Dále má stanovení genotypů význam v iniciaci/odložení léčby pacientů s akutní infekcí HCV. Důležité je si uvědomit, že předpovědní hodnota genotypů v polymorfismech ve vztahu k účinnosti léčby není stoprocentní (Urbánek, 2011). V neposlední řadě má genotypizace význam v klinických studiích s protivirovými léčivy, kde slouží k rozdělení infikovaných do jednotlivých testovaných skupin (www.ces-hep.cz).

2.10 Klinická doporučení pro diagnostiku a léčbu HCV

2.10.1 Standardní laboratorní vyšetřovací metody

Ke standardním laboratorním metodám používaným v diagnostice (chronické) infekce HCV patří sérologické detekční a molekulárně genetické metody. Sérologické detekční metody jsou založeny na detekci protilátek anti-HCV v séru pacienta pomocí jedné z variant metody EIA, enzymové imunoanalýzy. Vyšetření protilátek v krvi je doporučováno především u jedinců, u kterých je možnost, že byli vystaveni infekci virem hepatitidy C. Zvláštní důraz by měl být kladen na „screening“ osob z rizikových skupin, jako jsou nitrožilní narkomani, zdravotničtí pracovníci apod. (www.ces-hep.cz).

Molekulárně genetické metody kvalitativně či kvantitativně stanovují přítomnost HCV RNA v séru a tkáních pacienta. Obvykle bývá prováděna amplifikace nukleové kyseliny v reálném čase, neboli real-time PCR, které předchází reverzní transkripce. V mnoha případech následuje po průběhu PCR i tzv. genotypizace viru infikovaného jedince. Molekulárně genetické metody bývají použity u osob anti-HCV pozitivních a podezřelých osob anti-HCV negativních (www.ces-hep.cz).

2.10.2 Standardní terapeutický postup při chronické infekci HCV

Česká hepatologická společnost a Společnost infekčního lékařství České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně vydaly v roce 2012 aktualizovaný standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce HCV, který je nyní uplatňován v klinické praxi. Podle tohoto postupu by měla být protivirová terapie zahájena u naprosté většiny pacientů s chronickou infekcí HCV a především u těch s rizikem vývinu cirhózy jater. K rozhodujícím faktorům zavedení léčby řadíme detekci HCV RNA v séru, výsledky jaterní biopsie, stupeň aktivity zánětu a genotypy polymorfismů genu *IL28B*. Zvýšená hladina aminotransferáz nemusí být vždy prokázána (www.ces-hep.cz).

Po dlouhou dobu byl dodržován standardní postup kombinované léčby pegylovanými interferony spolu s ribavirinem, kdy v případě chronické infekce genotypy HCV 1, 4, 5 a 6 terapie trvala 48 týdnů, v případě infekce genotypy 2 a 3 pak 24 týdnů. Tento postup byl posléze částečně modifikován, také byl uzpůsoben pro zavedení přímo působících virostatik i na český trh (www.ces-hep.cz):

- u zatím neléčených jedinců s chronickou infekcí genotypem HCV 1 je doporučeno aplikovat boceprevir nebo telaprevir v kombinaci s peg-IFN a RBV,
- problém představuje opakovaná terapie pacientů neúspěšně léčených DAA a infikovaných genotypem 1,
- u doposud neléčených pacientů s infekcí genotypy HCV 2 a 3 je doporučeno použít modifikovaný postup léčby peg-IFN s ribavirinem.

Přímo působící virostatika nejsou prozatím v České republice běžné využívána, proto je pro doposud neléčené pacienty s chronickou infekcí genotypy 1, 2 a 3 doporučeno využívat modifikovaných standardních postupů. V případě pacientů infikovaných genotypem 1, u kterých došlo k potlačení kombinované léčby, je třeba zvážit odklad opakování této terapie do doby ustavení DAA do naší republiky. Individuální přístup v terapii chronické infekce i nadále vyžadují zvláštní skupiny infikovaných, mezi které patří děti, aktivní uživatelé drog, osoby s infekcí HBV nebo HIV, pacienti s nemocemi jater v pokročilém stádiu apod. (www.ces-hep.cz).

Stanovení genotypů polymorfismů genu pro interleukin 28B je prozatím využíváno především v predikci úspěšnosti léčby. Pro to, zda je vhodné u pacientů s konkrétními genotypy upřednostnit zavedení léčby DAA spolu s peg-IFN a RBV před terapií peg-IFN s ribavirinem, zatím nebylo získáno dostatečné množství dat (www.ces-hep.cz).

Základním kritériem vyléčení infekce je dosažení SVR u pacienta (www.ces-hep.cz).

3. CÍL PRÁCE

Vypracování teoretické práce o významu hepatitidy C a metodách laboratorní diagnostiky. Praktické seznámení se základními laboratorními metodami molekulární biologie. V praktické části ověření diagnostické metody.

4. MATERIÁLY A METODIKA

4.1 Izolace genomové DNA ze vzorku, určení čistoty a výpočet koncentrace DNA

V první fázi praktické části bakalářské práce byla izolována genomová deoxyribonukleová kyselina (DNA) pacientů ze vzorků plné krve. Izolace byla provedena pomocí soupravy firmy QIAGEN - QIAamp DNA Blood Mini Kit. Cílem metody je rychlá extrakce DNA o adekvátní čistotě z buněk za současného odstranění zbylých balastních komponent. Použitá souprava je založena na purifikaci DNA díky její adsorpci na membránu. Před purifikací DNA je provedena lýze buněk prostřednictvím roztoku QIAGEN proteázy. Vlastní purifikace sestává ze čtyř základních kroků, připravený lyzovaný roztok krve s DNA je aplikován na kolonku se silikátovou membránou. Za optimálních podmínek nastavených díky použití vhodných roztoků poté během krátké centrifugace dochází k adsorpci DNA na membránu. Následuje postupné dvojitě vymytí přebytečných balastních molekul (proteiny atd.) z kolonky pomocí dvou různých vymývacích pufrů a opakované centrifugace. Konečný krok purifikace představuje eluce DNA z kolonky do sběrné zkumavky (QIAGEN, 2010).

Poté bylo provedeno stanovení čistoty vzorku a koncentrace izolované genomové DNA pomocí měření absorbance na spektrofotometru a následných výpočtů.

4.1.1. Materiál, chemikálie a použité přístroje

Biologický materiál

Biologickým materiálem použitým pro izolaci genomové DNA byla plná krev pacientů odebraná do zkumavky s protisrážlivým činidlem (K3EDTA). Krev byla uchovávána při teplotě 4 °C.

Chemikálie

Izolace genomové DNA byla provedena pomocí soupravy QIAamp DNA Blood Mini Kit, Cat. No. 51104, na 50 izolací (QIAGEN). Souprava je sestavena z těchto roztoků a chemikálií:

- **QIAGEN Protease stock solution**, k lyofilizované proteáze je třeba před prvním použitím přidat Protease solvent (nukleáz zbavená voda obsahující 0,04% azid sodný; ke 24 mg je třeba přidat 1,2 ml solventu); rozpuštěná proteáza je stabilní 2 měsíce při 4 °C; pro delší skladování by měla být proteáza zamražena po alikvotech při -20 °C
- **Buffer AL**, před použitím by měl být roztok řádně promíchán protřepáním; pokud je v roztoku vidět precipitát, je třeba jej před použitím rozpustit při 70 °C; roztok je stabilní jeden rok při teplotě místnosti
- **Buffer AW1**, pufr je v soupravě dodáván jako koncentrát, proto je třeba před prvním použitím přidat 96% etanol, k 19 ml koncentrátu přidat 25 ml 96% etanolu; pufr je stabilní jeden rok při teplotě místnosti
- **Buffer AW2**, pufr je v soupravě dodáván jako koncentrát, proto je třeba před prvním použitím přidat 96% etanol, k 13 ml koncentrátu přidat 30 ml 96% etanolu; pufr je stabilní jeden rok při teplotě místnosti

Další použité chemikálie:

- 96% etanol
- destilovaná voda

Přístroje a pomůcky

K izolaci DNA a následnému měření absorbance vzorku byly využity tyto přístroje a pomůcky:

- 1,5ml mikrozkušavky, Eppendorf , Německo
- QIAamp centrifugační kolonky, QIAGEN, Německo
- 2ml sběrné zkumavky, QIAGEN, Německo
- sada špiček, Eppendorf, Německo
- mikropipety 2-20 µl, 20-200 µl, Autoclavable Nichipet, NICHIRYO, Japonsko
- mikropipeta 100-1000 µl, Hamilton, Švýcarsko
- centrifuga BR4i, Jouan, Francie
- třepačka (vortex) UNIMAG-ZX3, UniEquip, Německo
- termoblok Major Science, USA
- kyveta z křemenného skla
- spektrofotometr Helios Omega UV-VIS, Thermo Scientific, USA

4.1.2 Pracovní postup izolace genomové DNA

Před vlastní izolací byly vzorky krve a destilovaná voda vytemperovány na teplotu místnosti. Dále byl vytemperován termoblok na teplotu 56 °C.

Nejprve bylo napipetováno 20 µl QIAGEN Protease roztoku na dno 1,5ml mikrozkušavek, do kterých bylo dále přidáno 200 µl vzorku plné krve a 200 µl Buffer AL roztoku. Obsah uzavřených mikrozkušavek byl promíchán na třepačce po dobu 15 vteřin tak, aby vzniknul homogenní roztok. Následovala inkubace po dobu 10 minut v termobloku při teplotě 56 °C. Poté proběhla krátká centrifugace mikrozkušavek s roztoky při pokojové teplotě.

Do mikrozkušavek bylo potom přidáno 200 µl 96% etanolu, po uzavření následovalo promíchání obsahu mikrozkušavek na třepačce po dobu 15 vteřin a krátká centrifugace mikrozkušavek. Směsi z mikrozkušavek byly následně opatrně přeneseny na QIAamp centrifugační kolonky umístěné ve 2ml sběrných zkumavkách. Centrifugační kolonky byly opatrně uzavřeny. Proběhla centrifugace kolonek umístěných ve sběrných zkumavkách, a to po dobu 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu (revolutions per minute, rpm). Po skončení byly centrifugační kolonky přeneseny do čistých 2ml sběrných zkumavek. V případě, že filtrát při centrifugaci kompletně neprošel kolonkou, byla centrifugace opakována při vyšších otáčkách.

Po otevření kolonek bylo pečlivě přidáno 500 µl roztoku Buffer AW1 tak, aby nebylo namočeno víčko. Po uzavření následovala centrifugace kolonek ve sběrných zkumavkách při 8000 rpm po dobu 1 minuty. Opět byly vyměněny použité sběrné zkumavky za čisté. Centrifugační kolonky byly otevřeny, bylo opatrně přidáno 500 µl roztoku Buffer AW2 tak, aby nebylo namočeno víčko. Kolonky byly uzavřeny a proběhla centrifugace po dobu 3 minut při 14000 rpm. Poté byly odstraněny použité 2ml sběrné zkumavky s filtrátem a kolonky byly umístěny do čistých 1,5ml mikrozkušavek.

Po otevření centrifugačních kolonek bylo přidáno 50 µl destilované vody, proběhla inkubace při teplotě místnosti po dobu 1 minuty. Následovala centrifugace kolonek s mikrozkušavkami po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Kolonky byly odstraněny, mikrozkušavky byly uzavřeny a řádně popsány. Tímto byla izolována genomová DNA připravená pro další použití, pro PCR. Vzorky izolované DNA byly uchovávány při 4 °C.

4.1.3 Pracovní postup určení čistoty vzorku a výpočtu koncentrace DNA

Ze vzorku izolované genomové DNA bylo vždy odpipetováno 20 μl do čisté mikrozkuhavky. Následně bylo do mikrozkuhavky přidáno 980 μl destilované vody, roztok byl řádně promíchán propipetováním.

Příprava spektrofotometru pro měření absorbance zředěných vzorků spočívala ve vytemperování přístroje a v měření tzv. blanku. Do kyvety byl aplikován 1 ml destilované vody, byla změřena absorbance při 260 nm a 280 nm přístrojem a tím došlo k jeho vynulování. Důležité je zde připomenout, že pro měření absorbance v UV oblasti je nezbytné používat křemennou kyvetu. Poté byly do kyvety postupně nalévány zředěné vzorky a byla měřena jejich absorbance při 260 nm a 280 nm.

Z naměřených hodnot absorbance byla určena čistota vzorku izolované DNA. Index čistoty se vypočítá jako podíl absorbance (A) při 260 nm a při 280 nm:

$$\text{index čistoty} = A_{260} / A_{280}$$

Při hodnotě indexu nižší než 1,8 se pravděpodobně jedná o vzorek výrazněji kontaminovaný bílkovinami. Pokud je hodnota indexu menší než 1,4, vzorek není vhodný pro další použití a je třeba opakovat izolaci. Je-li hodnota indexu větší než 1,8, vzorek DNA dosahuje dostatečné čistoty a může být použit v PCR.

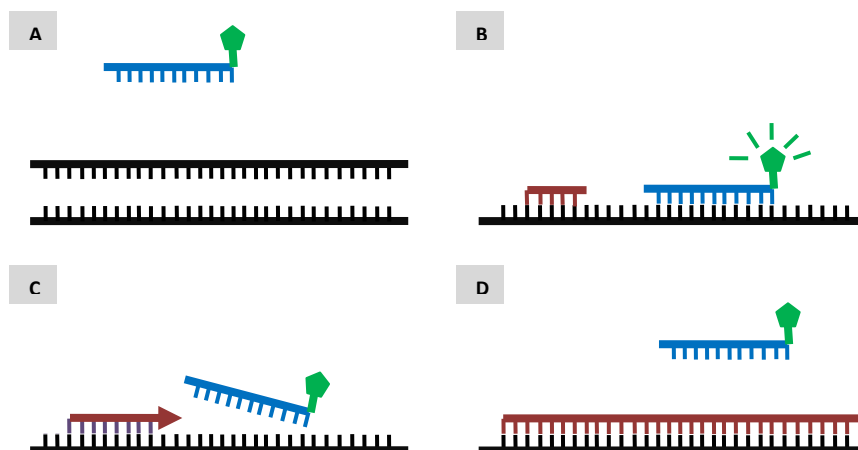
Výpočet koncentrace izolované DNA ve vzorku vycházel z předpokladu, že je-li absorbance při 260 nm rovna jedné, jedná se o roztok dsDNA (double-stranded DNA, dvouvláknová DNA) o koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Získaná hodnota absorbance při 260 nm byla tedy vynásobena padesáti, tak bylo vypočítáno množství dsDNA [μg] ve 20 μl vzorku. Pro výpočet množství dsDNA [μg] v 1 μl vzorku je nutné takto získanou hodnotu vydělit dvaceti, čímž je získána koncentrace dsDNA v jednotkách $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Běžně používaná jednotka koncentrace je však $\text{ng}/\mu\text{l}$, proto je nutné vypočítanou hodnotu vynásobit tisícem. Tímto způsobem byly vypočítány koncentrace všech vzorků izolované genomové DNA.

4.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase, analýza křivky tání

Po izolaci genomové DNA následovalo provedení polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR), v současnosti již standardní metody molekulární biologie. Metoda PCR umožňuje rychlou amplifikaci specifické sekvence DNA. Dochází při ní k pravidelně se opakující syntéze nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3'. Syntéza je uskutečňována prostřednictvím enzymatického působení DNA-polymerázy. Syntéza nových řetězců je umožněna díky vymezení dané sekvence DNA navázáním dvou specifických primerů na protilehlé řetězce DNA, kdy jejich 3'OH konce směřují proti sobě. Na obou matricových řetězcích DNA jsou pak v protisměru syntetizovány nové řetězce. Součástí PCR reakční směsi jsou tedy specifické primery (oligonukleotidy o délce 18-25 nukleotidů), DNA polymeráza, nukleotidy a kofaktory (hořčnaté ionty Mg^{2+}). Pro PCR reakci se obvykle používá *Taq* polymeráza izolovaná z organismu *Thermus aquaticus*, jež je termostabilní a odolává teplotám denaturace DNA. Díky vlastnostem *Taq* polymerázy může PCR probíhat v cyklech za neustálého střídání se tří základních procesů o charakteristických teplotách. Nejprve při 94-98 °C dojde k denuraci dvouřetězcových molekul DNA, následuje snížení teploty na 30-65 °C, což umožňuje připojení primerů k matricovým vláknům DNA. Posledním krokem je vlastní syntéza nových řetězců při 65-75 °C. Produktem PCR jsou zmnožené, primery vymezené úseky DNA nazývané amplikony. V jednotlivých cyklech je vždy počet amplikonů zdvojnásoben, optimální počet cyklů byl stanoven na 25-35 cyklů. V laboratořích je dnes PCR většinou prováděna v zařízeních termocyklerech, které dokážou automaticky měnit teplotu podle nastavených parametrů a programu (Rosypal *et al.*, 2002; Šmarda *et al.*, 2005).

Při tzv. real-time PCR dochází k přímé kvantifikaci amplifikovaných produktů již v průběhu samotné reakce, tedy v reálném čase. Pro provedení real-time PCR je nutné do reakční směsi přidat fluorescenční značky (nespecifická fluorescenční barviva, fluorescenčně značené primery nebo komplementární sondy). Systém je navržen takovým způsobem, že na základě detekce fluorescenčního signálu přístrojem, lze poté odvodit množství PCR amplikonů. Signál je obvykle detekován v průběhu každého cyklu reakce. K nezbytným přístrojovým vybavením patří speciální termocykler schopný detekce fluorescence a počítač (Rosypal *et al.*, 2002; Šmarda *et al.*, 2005).

V případě stanovení genotypu v polymorfismu rs12979860 (-3176C/T) genu *IL28B* jsou amplifikovány sekvence v oblasti genu *IL28B*, které jsou dlouhé 139 bází. Přímá kvantifikace probíhá prostřednictvím speciálních fluorescenčních hybridizačních sond SimpleProbe. Jedná se o sondy, které specificky hybridizují na cílovou sekvenci v oblasti daného SNP, kdy hybridizované sondy vykazují vyšší emitaci fluorescenčního signálu než sondy nenavázané. Více viz Obr. 3 (www. Roche-applied-science.com).

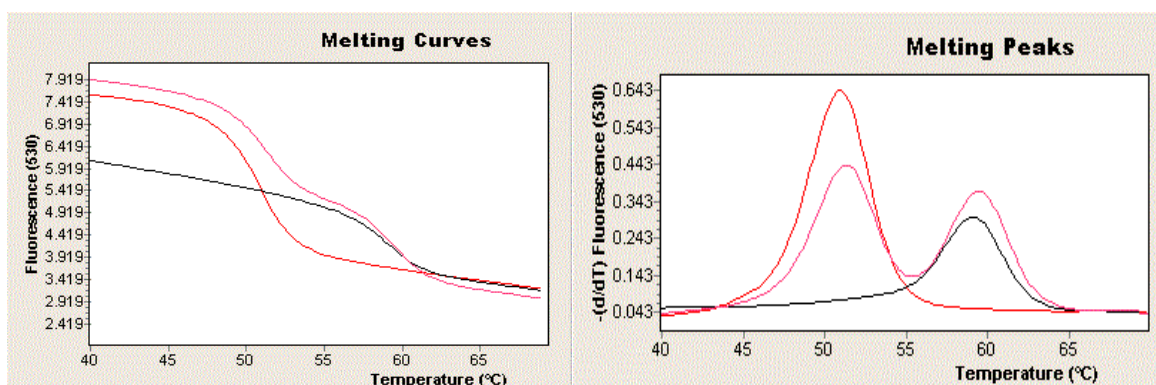


Obr. 3: Princip fungování sond SimpleProbe (www. Roche-applied-science.com)

A) v průběhu denaturace DNA nejsou sondy navázané, poskytují pouze tzv. fluorescenční pozadí; B) po denaturaci dojde k navázání primerů a hybridizaci sond, fluorescence je vyšší (není zhasena), probíhá detekce fluorescenčního signálu; C) v průběhu syntézy nových řetězců je sonda uvolněna; D) uvolněná sonda je opět zhasena, vykazuje jen nízkou fluorescenci

Na průběh real-time PCR přímo navazovalo provedení metody zvané analýza křivky tání, jež vychází ze základních vlastností DNA. Princip metody spočívá v tom, že pokud jsou molekuly dsDNA pozvolna zahřívány, dochází k jejich postupné denaturaci, tedy k oddělování komplementárních řetězců čili k tzv. tání DNA. Teplotu, při které je denaturováno 50 % molekul dsDNA, označujeme jako teplotu tání T_m . Při této teplotě probíhá separace nejrychleji. Hodnota teploty tání závisí na více faktorech, mezi které patří obsah GC bází v sekvenci, délka studovaných řetězců apod. Při použití systému pro real-time PCR lze po skončení vlastní reakce přímo monitorovat proces tání. Roztok dsDNA je ochlazen, poté postupně zahříván až nad očekávanou teplotu tání a současně je

detekován fluorescenční signál. V průběhu zahřívání dsDNA a její denaturace fluorescenční signál klesá. Intenzita fluorescenčního signálu je tedy přímo úměrná množství dsDNA v měřeném roztoku. V případě použití výše popsaných SimpleProbe sond se tak děje proto, že hybridizované sondy vykazují vyšší fluorescenci než sondy nenavázané (oddělené denurací). Z naměřených hodnot fluorescenčního signálu je následně sestaven graf závislosti intenzity fluorescence (osa y) na stoupající teplotě (osa x), neboli křivka tání (viz Obr. 4). Na křivce tání je pak vyhledán inflexní bod, tedy bod, ve kterém se mění zakřivení křivky. V inflexním bodě, jenž odpovídá teplotě tání (T_m) dsDNA, křivka tání poměrně prudce klesá. Po provedení derivace křivky tání (provedení druhé derivace intenzity fluorescence) je získán graf s píkem s vrcholem v dané teplotě tání. Při identifikaci SNP je využito faktu, že pouze jedna nekomplementární báze může změnit teplotu tání sondy. Při detekci SNP rs12979860 je použit SimpleProbe oligomer specifický pro alelu C v pozici -3176. Pokud je ve studované sekvenci DNA přítomna alela C, vykazuje sonda určitou teplotu tání. Pokud je však v pozici -3176 přítomna alela T, sonda není optimálně komplementární, teplota tání je tak v tomto případě nižší. Ze získaných křivek tání a derivovaných křivek tání s píky lze pak poměrně snadno odečíst daný genotyp (www.generi-biotech.com; www.roche-applied-science.com).



Obr. 4: Křivky tání (melting curves) - graf závislosti intenzity fluorescence na stoupající teplotě; derivace křivky tání s píky s vrcholy v daných teplotách tání (melting peaks) - graf závislosti derivované intenzity fluorescence na teplotě

4.2.1 Materiál, chemikálie a použité přístroje

Biologický materiál

Pro real-time PCR a následnou analýzu křivky tání byl použit roztok izolované genomové DNA z plné krve pacientů, který byl získán izolací pomocí soupravy QIAamp DNA Blood Mini Kit, Cat. No. 51104.

Chemikálie

K provedení real-time PCR a analýzy křivky tání byly použity reagenty soupravy LightCycler FastStart DNA Master HybProbe, Cat. No. 03-003-248-001, pro 96 reakcí - každá o objemu 20 μ l (Roche):

- **LightCycler FastStart Enzyme**; reagenty by měly být uchovávány při -15 až -20 °C, mělo by být předcházeno opakovanému zamrazování a rozmrazování
- **LightCycler FastStart Reaction Mix HybProbe**, 10x koncentrovaný roztok, reagenty by měly být uchovávány při -15 až -20 °C, mělo by být předcházeno opakovanému zamrazování a rozmrazování
- Před použitím je třeba přepipetovat 60 μ l z roztoku **LightCycler FastStart Reaction Mix HybProbe** do mikrokumavky s **LightCycler FastStart Enzyme**, čímž je získáno 64 μ l 10x koncentrovaného roztoku **LightCycler FastStart DNA Master HybProbe**. Směs obsahuje FastStart *Taq* DNA polymerázu, reakční pufr, dNTP mix (s dUTP místo dTTP) a 10 mmol/l $MgCl_2$
- **LightCycler FastStart DNA Master HybProbe** by měl být skladován při -15 až -20 °C maximálně po dobu tří měsíců; po rozmražení jsou reagenty stabilní maximálně jeden týden při uchování při teplotě 2 až 8 °C
- **roztok $MgCl_2$** o koncentraci 25 mmol/l, reagenty by měly být (před i po jejich otevření) skladovány při -15 až -20 °C
- **PCR voda**, která by měla být (před i po otevření) skladována při -15 až -20 °C

Dále byla použita souprava LightMix Kit IL28B Cat. No. 40-0588-32, pro 32 reakcí (TIB MOLBIOL), která obsahuje tyto reagenty:

- **premix specifických lyofilizovaných primerů a sond (Reagent mix)**, před použitím je třeba k lyofilizované směsi přidat 66 μ l PCR vody, promíchat na třepače a provést krátkou centrifugaci; lyofilizované reagenty jsou stabilní

nejméně po dobu tří měsíců od dodání, měly by být skladovány při pokojové teplotě, neměly by být zamrazeny; rozpuštěné reagentie jsou stabilní minimálně 5 dní při skladování při 4 °C

- **kontrolní DNA** (alela C, alela T a alela C/T), před použitím je třeba přidat 80 µl PCR vody, následně roztok promíchat pipetováním (10x); výsledná koncentrace činí 10^5 cílových molekul v 5 µl; lyofilizované reagentie jsou stabilní nejméně po dobu tří měsíců od dodání, měly by být skladovány při pokojové teplotě, neměly by být zamrazeny; rozpuštěné reagentie jsou stabilní minimálně 5 dní při skladování při 4 °C

Přístroje a pomůcky

- termocykler LightCycler 2.0, Roche, Švýcarsko
- počítač s programem LightCycler Software, verze 4.1, Roche, Švýcarsko
- sada špiček, Eppendorf, Německo
- mikropipeta 0,1-2 µl TIPOR-V⁺, Orange Scientific, Belgie
- mikropipety 2-20 µl, 20-200 µl, Autoclavable Nichipet, NICHIRYO, Japonsko
- mikropipeta 100-1000 µl, Hamilton, Švýcarsko
- centrifuga BR4i, Jouan, Francie
- třepačka (vortex) UNIMAG-ZX3, UniEquip, Německo
- 1,5ml mikrozkuhavky, Eppendorf, Německo
- plastové kapiláry termocykleru, Roche, Švýcarsko
- pinzeta
- laminární box MSC 12, Jouan, Francie

4.2.2 Pracovní postup amplifikace a detekce

Nejprve byla v chlazené mikrozkuhavce připravena reakční směs pro real-time PCR. Jednotlivé složky mastermixu byly do mikrozkuhavky pipetovány v pořadí uvedeném v tabulce (Tab. I). Objemy jednotlivých reagentií byly upraveny podle počtu prováděných reakcí, kdy byla vždy započítána jedna reakce navíc. Výpočet použitých objemů reagentií vycházel z tabulky (Tab. I).

Tab. I: Příprava PCR reakční směsi pro jednu reakci

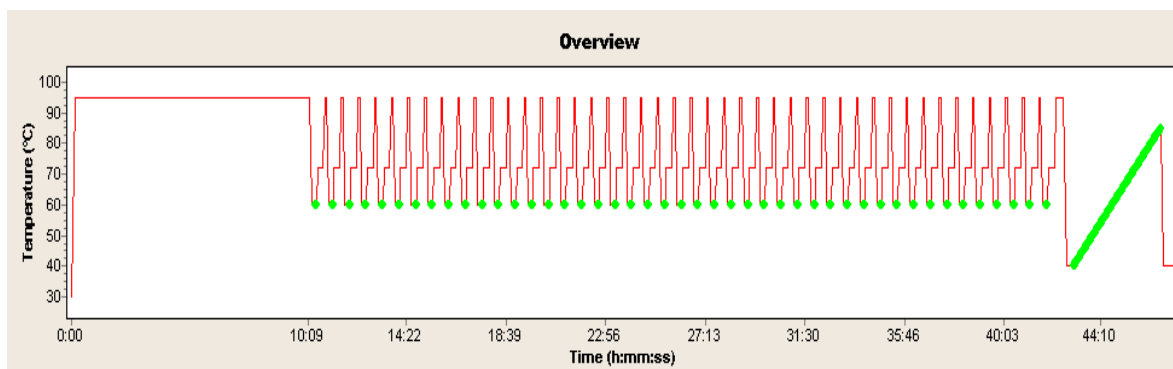
Reagencie	Objem pipetovaný pro 1 reakci [μ l]
FastStart DNA Master HybProbe	2,0
Reagent mix	2,0
Roztok MgCl ₂	1,6
PCR voda	9,4

Následovalo promíchání mastermixu na třepače, krátká centrifugace mikrozkušavky a pipetování mastermixu do kapilár pro termocykler. Do každé kapiláry bylo přidáno 15 μ l reakční směsi. Do kapilár bylo následně přidáno po 5 μ l roztoku izolované DNA, nebo 5 μ l pozitivní kontroly (kontrolní DNA), nebo 5 μ l negativní kontroly (PCR voda). Celkový objem reakce tak činil 20 μ l.

Uzavřené kapiláry byly vloženy do termocykleru a byl spuštěn příslušný program. Program pro stanovení genotypu v polymorfismu rs12979860 (-3176C/T) genu *IL28B* sestává ze čtyř základních kroků o různých teplotních profilech – denaturace, amplifikace neboli cyklování, zahřívání nad teplotu tání a chlazení. Teplotní profil programu je shrnut v tabulce (Tab. II) a obrázku (Obr. 5). Došlo tedy k amplifikaci DNA a následně k analýze křivky tání. Fluorescence byla detekována za použití kanálu pro 530 nm. Výsledná data byla zaznamenána příslušným softwarem termocykleru (LightCycler Software, verze 4.1) v počítači.

Tab. II: Teplotní profil programu termocykleru pro stanovení genotyp v polymorfismu rs12979860 (-3176C/T) genu *IL28B*

	Denaturace	Amplifikace			Zahřívání			Chlazení
Analýza	-	Kvantitativní analýza			Analýza křivky tání			-
Počet cyklů	1	45			1			1
Teplota [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Doba trvání [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Teplotní růst [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Detekce fluorescence	-	-	V jedn. cyklech	-	-	-	Kontinuál.	-



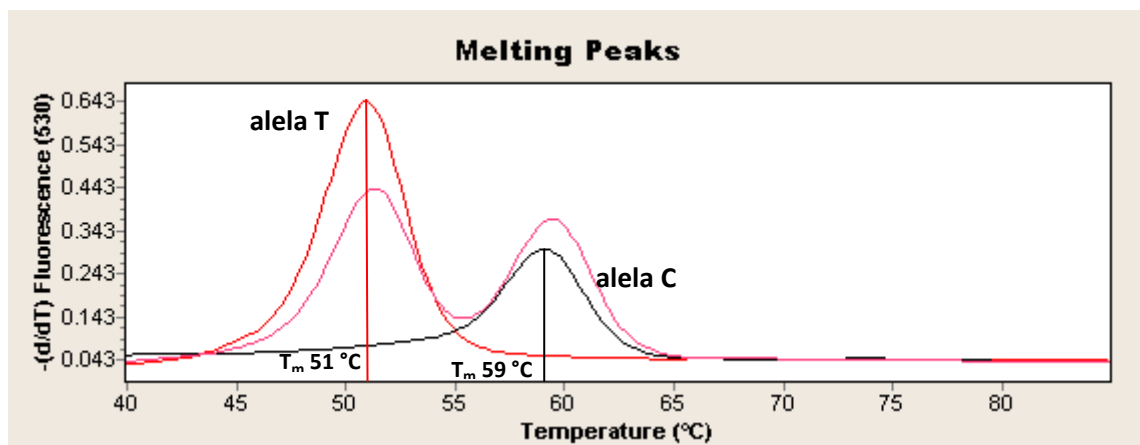
Obr. 5: Graf teplotního profilu programu termocyklieru pro stanovení genotypu v polymorfismu rs12979860 (-3176C/T) genu *IL28B*, kde zelené body/úsečky značí průběh detekce fluorescence při 530 nm přístrojem

4.2.3 Vyhodnocení analýzy křivky tání

Počítačový software LightCycler Software (verze 4.1) na základě získaných dat následně provedl analýzu křivek tání DNA a sestrojil derivované křivky tání s píky v daných teplotách tání. Z výsledných křivek s píky byly posléze odečteny příslušné genotypy v polymorfismu rs12979860 (-3176C/T) genu *IL28B*, kdy u homozygota TT v tomto polymorfismu by měla být získána křivka s jedním píkem a teplotou tání DNA při 51,4 °C. Heterozygot CT by měl vykazovat křivku s dvěma píky s teplotami tání DNA při 51 °C a 59 °C. Křivka homozygota CC by měla mít jeden pik s teplotou tání DNA při 59,2 °C. Akceptovatelná odchylka mezi jednotlivými experimenty byla stanovena na $\pm 2,5$ °C pro dané teploty tání. Teplotní rozdíl mezi jednotlivými píky, respektive teplotami tání, u heterozygota CT by měl být 8 °C. Akceptovatelná odchylka pro teplotní rozdíl u jednotlivých experimentů byla stanovena na $\pm 1,5$ °C. Pokyny pro interpretaci dat získaných počítačovým softwarem jsou shrnuty v tabulce (Tab. III) a obrázku (Obr. 6).

Tab. III: Interpretace dat vyhodnocených počítačovým softwarem termocyklieru

Genotyp <i>IL28B</i>	Homozygot TT	Heterozygot CT	Homozygot CC
Počet píků tání	1	2	1
Teplota tání	51,4 °C	51 °C a 59 °C	59,2 °C
Teplotní rozdíl mezi píky tání	-	8 °C	-



Obr. 6: Křivky tání po derivaci, vyhodnocené počítačovým softwarem termocyklieru, u homozygota TT (červená), heterozygota CT (růžová) a homozygota CC (černá) v polymorfismu rs12979860 (-3176C/T) genu *IL28B*

5. VÝSLEDKY

5.1 Určení čistoty a výpočet koncentrace izolované DNA

Vzorky plné krve pacientů a následně i vzorky izolované genomové DNA byly postupně označeny čísly 1 až 10. Izolace DNA, měření absorbance spektrofotometrem, real-time PCR a vlastní analýza křivek tání probíhaly ve dvou sériích po pěti pacientech.

V tabulce (Tab. IV) lze vidět výsledky měření absorbance zředěných vzorků izolované DNA na spektrofotometru. Dále jsou zde vypočítané hodnoty indexu čistoty jednotlivých vzorků a také koncentrace izolované DNA u jednotlivých vzorků.

Tab. IV: Naměřené hodnoty absorbance zředěných vzorků při 260 a 280 nm, hodnoty indexu čistoty pro jednotlivé vzorky, koncentrace DNA vzorků izolované genomové DNA

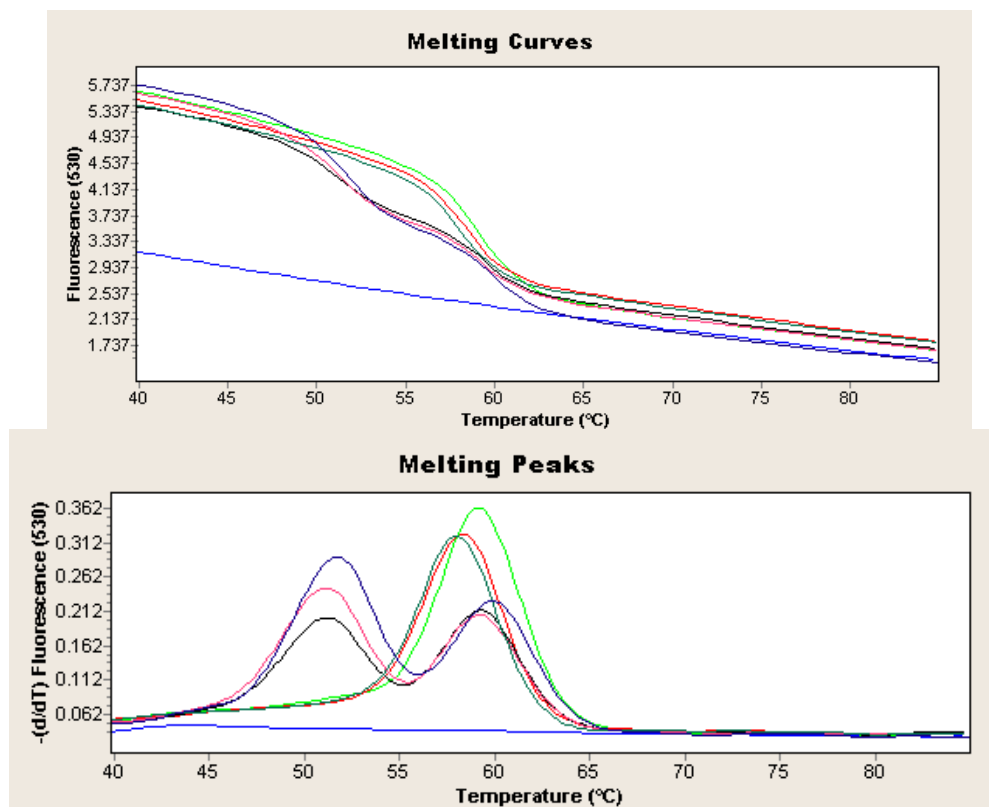
Vzorek	A _(260 nm)	A _(280 nm)	index čistoty $A_{(260)}/A_{(280)}$	koncentrace DNA [ng/μl]
Pac. 1	0,034	0,017	2,0	85
Pac. 2	0,026	0,013	2,0	65
Pac. 3	0,005	0,002	2,5	12,5
Pac. 4	0,017	0,009	1,889	42,5
Pac. 5	0,013	0,007	1,857	32,5
Pac. 6	0,025	0,014	1,786	62,5
Pac. 7	0,012	0,007	1,714	30
Pac. 8	0,012	0,006	2,0	30
Pac. 9	0,008	0,005	1,6	20
Pac. 10	0,040	0,021	1,905	100

Výsledné hodnoty indexu čistoty u všech vzorků izolované DNA byly vyšší než 1,4. Vzorky tedy nebyly kontaminovány takovým způsobem, že by musela být izolace opakována. Nicméně vzorky 6, 7 a 9 byly pravděpodobně výrazněji kontaminovány bílkovinami, protože hodnoty indexu čistoty u nich nedosahovaly hranice 1,8. Zbylé vzorky vykazovaly dostatečnou čistoty izolované genomové DNA.

Koncentrace izolované DNA u jednotlivých vzorků se pohybovaly v poměrně širokém rozmezí od 12,5 do 100 ng/μl. Protože pro adekvátní průběh PCR stačí pouze malé množství výchozí DNA a u provedení real-time PCR nebyla rozhodující kvantifikace, ale amplifikace pro následnou analýzu křivek tání, nebyly vzorky DNA nijak upravovány.

5.2 Vyhodnocení analýzy křivky tání

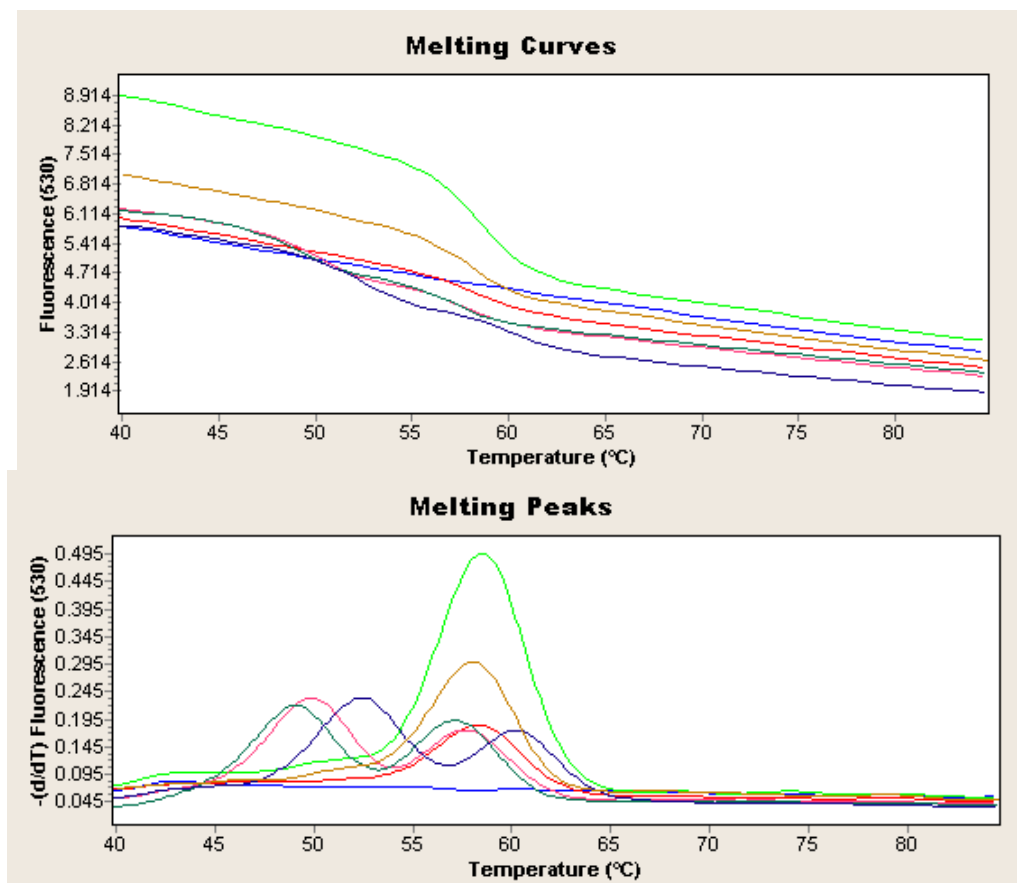
Cílem provedení real-time PCR a analýzy křivky tání bylo stanovit genotypy v polymorfismu rs12979860 genu *IL28B*. Na Obr. 7 a 8 lze vidět křivky tání a derivované křivky tání s píky získané pomocí počítačového softwaru u jednotlivých vzorků pacientů a kontrol. V tabulkách V a VI jsou shrnuty stanovené teploty tání a vyhodnocené genotypy.



Obr. 7: Křivky tání a derivace křivek tání s píky (melting peaks) získané po provedení real-time PCR a analýzy křivek tání u jednotlivých vzorků pacientů 1-5 a kontrol (Tab. V)

Tab. V: Hodnoty teplot tání (T_m) stanovované počítačovým softwarem termocykleru u jednotlivých vzorků pacientů 1-5, PK (pozitivní kontroly) a NK (negativní kontroly); barva křivek tání a derivovaných křivek tání v grafech (viz Obr. 7) příslušná pro jednotlivé vzorky pacientů a kontrol; vyhodnocený genotyp v polymorfismu rs12979860 genu *IL28B*

Vzorek	T_{m1}	T_{m2}	Barva křivek	Genotyp <i>IL28B</i>
NK	-	-	Blue	-
Pac. 1	59,41	-	Green	CC
Pac. 2	58,52	-	Red	CC
Pac. 3	51,22	59,43	Black	CT
Pac. 4	51,17	59,41	Pink	CT
Pac. 5	58,24	-	Green	CC
PK	51,81	60,13	Dark Blue	-



Obr. 8: Křivky tání a derivace křivek tání s píky (melting peaks) získané po provedení real-time PCR a analýzy křivek tání u jednotlivých vzorků pacientů 6-10 a kontrol (Tab. VI)

Tab. VI: Hodnoty teplot tání (T_m) stanovované počítačovým softwarem termocyklieru u jednotlivých vzorků pacientů 6-10, PK (pozitivní kontroly) a NK (negativní kontroly); barva křivek tání a derivovaných křivek tání v grafech (viz Obr. 8) příslušná pro jednotlivé vzorky pacientů a kontrol; vyhodnocený genotyp v polymorfismu rs12979860 genu *IL28B*

Vzorek	T_{m1}	T_{m2}	Barva křivek	Genotyp <i>IL28B</i>
NK	-	-	Blue	-
Pac. 6	58,67	-	Green	CC
Pac. 7	58,69	-	Red	CC
Pac. 8	49,95	57,91	Pink	CT
Pac. 9	58,25	-	Brown	CC
Pac. 10	49,14	57,30	Dark Green	CT
PK	52,54	60,48	Dark Blue	-

Pro ověření správného průběhu real-time PCR a návazné analýzy křivky tání byly vedle vzorků testovány také negativní a pozitivní kontroly. V obou proběhnutších analýzách byla u negativní kontroly zaznamenána pouze nízká intenzita fluorescenčního signálu, tedy tzv. fluorescenční pozadí dané nenavázanými sondami. V reakční směsi s negativní kontrolou se tak nenacházela amplifikovatelná DNA. V případech pozitivních kontrol byly získány derivované křivky tání se dvěma píky, respektive se dvěma teplotami tání. Tyto výsledky odpovídaly výsledkům očekávatelným při použití kontrolní DNA od výrobce, čímž bylo dokázáno, že reakce real-time PCR probíhala adekvátně.

Celkem bylo testováno 10 vzorků plné krve pacientů. Výsledné hodnoty teplot tání u všech vzorků spadaly do rozmezí stanoveného pro teploty tání pro dané genotypy. Analýza křivek tání tak mohla být považována za důvěryhodnou. Z deseti pacientů byl u šesti determinován genotyp CC a u čtyř genotyp CT v polymorfismu rs12979860 genu *IL28B*. Genotyp TT v tomto polymorfismu nebyl stanoven u žádného z testovaných pacientů. Shrnutí výsledků poskytuje tabulka (Tab. VII).

Tab. VII: Genotypy v polymorfismu rs12979860 genu *IL28B* stanové u testovaných pacientů

Genotyp <i>IL28B</i>	TT	CT	CC
Počet pacientů	-	4	6

6. DISKUZE

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo ověření diagnostické metody vyžívané pro stanovení genotypu v polymorfismu -3176C/T (rs12979860) genu *IL28B* u pacientů. Význam determinace tohoto genotypu pro klinickou praxi spočívá v tom, že pacienti s genotypem CC v polymorfismu vykazují vyšší úspěšnost standardně používané terapie infekce HCV. Metoda sestává ze dvou základních kroků - z izolace genomové DNA a provedení real-time PCR a analýzy křivky tání.

Izolace nukleových kyselin ze vzorků bývá v laboratořích běžně automatizována, to znamená, že je k izolaci použita komerční souprava a příslušný přístroj. V Laboratoři molekulární biologie Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc je izolace genomové DNA ze vzorků plné krve pacientů prováděna pomocí soupravy firmy QIAGEN a přístroje QIAcube téže firmy. V případě pacientů s chronickou infekcí HCV je často potřeba izolovat DNA pouze ze vzorku jediného pacienta, protože pacientů s rozpoznanou chronickou infekcí je jen několik desítek ročně. Manuální metoda tak může být alternativou k rutinně používanému automatizovanému procesu. V této práci bylo na základě měření absorbance na spektrofotometru ověřeno, že ruční izolace poskytuje vzorek genomové DNA o dostatečně čistotě a koncentraci pro další použití v PCR.

Při provedení real-time PCR a analýzy křivky tání se manuálně provádí příprava reakční směsi pro PCR a následná aplikace směsi spolu s testovanými vzorky do kolonek termocyklieru. Zbylé kroky metody jsou realizovány termocyklerem a příslušným počítačovým softwarem. V bakalářské práci bylo ověřeno, že při dodržení pracovních dokumentovaných postupů a podmínek výrobce jsou získány adekvátní výsledky. Výsledné hodnoty teploty tání u vzorků byly v rozmezí stanoveném výrobcem použitých reakčních mixů, totéž platí i v případě rozmezí pro hodnoty rozdílu teplot tání u heterozygotů. Výsledky získané v této práci se shodovaly s výsledky analýzy v běžném laboratorním provozu.

Metoda používaná v Laboratoři molekulární biologie Oddělení klinické biochemie FNOL pro detekci genotypu v polymorfismu -3176C/T (rs12979860) genu *IL28B* u pacientů tedy byla ověřena.

7. ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše o významu viru hepatitidy C. Teoretická práce byla zaměřena především na patogenезi infekce virem hepatitidy C v lidském organismu, imunitní odpověď hostitele a dále na terapii infekce HCV. Byly zde shrnuty nejnovějších poznatky o roli jednonukleotidových polymorfismů v oblasti lidského genu pro interleukin 28B ve vrozené imunitní odpovědi hostitele a v úspěšnosti standardně používané terapie. Jednonukleotidový polymorfismus -3176C/T (rs12979860) v oblasti genu *IL28B* zřejmě ovlivňuje pravděpodobnost dosažení spontánní eliminace infekce u nakažených jedinců. Za příznivý genotyp s pozitivním vlivem na eliminaci je považován genotyp CC rs12979860. V dalších studiích bylo zjištěno, že pacienti s genotypem CC rs12979860 vykazují více než dvakrát vyšší úspěšnost terapie infekce než pacienti s genotypem TT v tomto polymorfismu. Genotypy polymorfismu genu *IL28B* mají navíc vyšší prediktivní hodnotu v úspěšnosti terapie než kterýkoliv jiný faktor pocházející od hostitele (věk, pohlaví). Dále zde bylo pojednáno o významu stanovení genotypu v polymorfismu rs12979860 v klinické praxi.

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo především seznámení se základními metodami molekulární biologie. Konkrétně tím, že byla ověřena diagnostická metoda používaná pro stanovení genotypu v polymorfismu -3176C/T (rs12979860) genu *IL28B* u pacientů. Při provedení metody bývají použity komerční soupravy výrobců QIAGEN (pro izolaci genomové DNA) a Roche (real-time PCR a analýza křivky tání). Metoda byla ověřena pomocí analýzy deseti vzorků plné krve pacientů, kdy u šesti z nich byl stanoven genotyp CC a u čtyř genotyp CT.

8. LITERATURA

8.1 Seznam použité literatury

Alter, M. J. (2007): Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 13: 2436-2441.

Averhoff, F. M., Glass, N., Holtzman, D. (2012): Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 55: 10-15.

Bartenschlager, R., Frese, M., Pietschmann, T. (2004): Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in Virus Research* 63: 71-180.

Bertoletti, A., Ferrari, C. (2003): Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 38: 4-13.

Caruntu, F. A., Benea, L. (2006): Acute hepatitis C virus infection: Diagnosis, pathogenesis, treatment. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 15: 249-256.

Cerny, A., Chisari, F. V. (1999): Pathogenesis of chronic hepatitis C: Immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 30: 595-601.

Cormier, E. G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R. J., Gardner, J. P., Dragic, T. (2004): CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7270-7274.

Doherty, P. C., Zinkernagel, R. M. (1974): T-cell-mediated immunopathology in viral infections. *Transplantation Reviews* 19: 89-120.

European Association for the Study of the Liver (2011): EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 55: 245-264.

Fafi-Kremer, S., Fauvelle, C., Felmler, D. J., Zeisel, M. B., Lepiller, Q., Fofana, I., Heydmann, L., Stoll-Keller, F., Baumert, T. F. (2012): Neutralizing Antibodies and Pathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. *Viruses-Basel* 4: 2016-2030.

Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., Strazzer, A., Chien, D. Y., Munoz, S. J., Balestrieri, A., Purcell, R. H., Alter, H. J. (2000): The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288: 339-344.

Ge, D. L., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., Heinzen, E. L., Qiu, P., Bertelsen, A. H., Muir, A. J., Sulkowski, M., McHutchison, J. G., Goldstein, D. B. (2009): Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461: 399-401.

Hagan, L. M., Schinazi, R. F. (2013): Best strategies for global HCV eradication. *Liver International* 33: 68-79.

Hauri, A. M., Armstrong, G. L., Hutin, Y. (2004): The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *International Journal of STD & AIDS* 15: 7-16.

Hayes, C. N., Imamura, M., Aikata, H., Chayama, K. (2012): Genetics of *IL28B* and HCV-response to infection and treatment. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9: 406-417.

Heller, T., Rehermann, B. (2005): Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Seminars in Liver Disease* 25: 7-17.

Hnatyszyn H. J. (2005): Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antiviral Therapy* 10: 1-11.

Horák, J., Stříteský, J. (1999): Patogeneze chronických hepatitid. In: *Chronické hepatitidy*, pp 11-19 Praha, Grada Publishing (Avicenum).

Chevaliez, S., Pawlotsky, J. M. (2006): HCV Genome and Life Cycle. In: Tan, S. L., (ed): *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*, pp 5-47, Norfolk (UK), Horizon Bioscience.

Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., Kohara, M. (1994): Hepatitis C virus

particle detected by immunoelectron microscopic study. *Journal of General Virology* 75: 1755-1760.

Kalinina, O., Norder, H., Mukomolov, S., Magnius, L. O. (2002): A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *Journal of Virology* 76: 4034-4043.

Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G., Bolognesi, M. (2001): CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *The EMBO Journal* 20: 12-18.

Koszinowski, U. H., Reddehase, M. J., Jonjic, S. (1991): The role of CD4 and CD8 T cells in viral infections. *Current Opinion in Immunology* 3: 471-475.

Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M. L., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R. P. (2003): IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology* 4: 69-77.

Lescar, J., Roussel, A., Wien, M. W., Navaza, J., Fuller, S. D., Wengler, G., Wengler, G., Rey, F. A. (2001): The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105: 137-148.

Lok, A. S., Seeff, L. B., Morgan, T. R., Di Bisceglie, A. M., Sterling, R. K., Curto, T. M., Everson, G. T., Lindsay, K. L., Lee, W. M., Bonkovsky, H. L., Dienstag, J. L., Ghany, M. G., Morishima, C., Goodman, Z. D. (2009): Incidence of Hepatocellular Carcinoma and Associated Risk Factors in Hepatitis C-Related Advanced Liver Disease. *Gastroenterology* 136: 138-148.

Loomba, R., Rivera, M. M., McBurney, R., Park, Y., Haynes-Williams, V., Rehmann, B., Alter, H. J., Herrine, S. K., Liang, T. J., Hoofnagle, J. H., Heller, T. (2011): The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 33: 559-565.

Maasoumy, B., Wedemeyer, H. (2012): Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26: 401-412.

- Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M. H., Albrecht, J. K. (2001): Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958-965.
- Marcello, T., Grakoui, A., Barba-Spaeth, G., Machlin, E. S., Kotenko, S. V., MacDonald, M. R., Rice, C. M. (2006): Interferons α and λ inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 131: 1887-1898.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., Martoglio, B. (2002): Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO Journal* 21: 3980-3988.
- Nelson, P. K., Mathers, B. M., Cowie, B., Hagan, H., Des Jarlais, D., Horyniak, D., Degenhardt, L. (2011): Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet* 378: 571-583.
- Orland, J. R., Wright, T. L., Cooper, S. (2001): Acute hepatitis C. *Hepatology* 33: 321-327.
- Perz, J. F., Armstrong, G. L., Farrington, L. A., Hutin, Y., Bell, B. (2006): The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology* 45: 529-538.
- Pischke, S., Cornberg, M., Manns, M. P. (2008): Hepatitis associated cryoglobulinemia. *Internist* 49: 297-304.
- Price, J. C., Thio, C. L. (2010): Liver disease in the HIV-infected individual. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 8: 1002-1012.
- Rajčáni, J. (2006): Čel'ad' Flaviviridae. In: Rajčáni, J., Čiampor, F., (ed.): *Lékar'ská virológia*, pp 435-451, Bratislava, Veda – vydavatel'stvo Slovenskej akadémie vied.
- Rao, H. Y., Sun, D. G., Jiang, D., Yang, R. F., Guo, F., Wang, J. H., Liu, F., Zhang, H. Y., Zhang, H. H., Du, S. C., Jin, Q., Qin, H., Lok, A. S. F., Wei, L. (2012): *IL28B* genetic variants and gender are associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 19: 173-181.

Rauch, A., Kutalik, Z., Descombes, P., Cai, T., Di Iulio, J., Mueller, T., Bochud, M., Battegay, M., Bernasconi, E., Borovicka, J., Colombo, S., Cerny, A., Dufour, J. F., Furrer, H., Gunthard, H. F., Heim, M., Hirschel, B., Malinverni, R., Moradpour, D., Mullhaupt, B., Witteck, A., Beckmann, J. S., Berg, T., Bergmann, S., Negro, F., Telenti, A., Bochud, P. Y. (2010): Genetic Variation in *IL28B* Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: a Genome-Wide Association Study. *Gastroenterology* 138: 1338-1345.

Rehermann, B. (2005): Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: A tale of coevolution and coexistence. *The Journal of Clinical Investigation* 119: 1745-1754.

Rehermann, B., Nascimbeni, M. (2005): Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology* 5: 215-229.

Rosypal, S., Doškař, J., Petrzik, K., Růžičková, V. (2002): Polymerázová řetězová reakce. In (třetí vydání): Úvod do molekulární biologie, čtvrtý díl, pp 1104-1108 Brno, Grafex.

Sarobe P. (2006): Can VHC subvert dendritic cell function? EASL Postgraduate Course, Vienna, Austria, April 26-27: 25-29.

Simmonds, P., Alberti A., Alter, H. J., Bonino, F., Bradley, D. W., Brechot, Ch., Brouwer, J. T., Chan, S. W., Chayama, K., Chen, D. S., Choo, Q. L., Colombo M., Cuypers, T. M., Date, T., Dusheiko, D. M., Esteban J. I., Fay, O., Hadziyannis, S. J., Han, J., Hatzakis, A., Holmes, E. C., Hotta, H., Houghton, M., Irvine, B., Kohara, M., Kolberg, J. A., Kuo, G., Lau, J. Y. N., Lelie, N. P., Maertens, G., McOmish, F., Miyamura, T., Mizokami, M., Nomoto, A., Prince, A. M., Reesink, H. W., Rice, Ch., Roggendorf, M., Schalm, S. W., Shikata, T., Shimotohno, K., Stuyver, L., Trépo, Ch., Weiner, A., Yap, P. L., Urdea, M. S. (1994): a proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 19: 1321-1324.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F. O., Sablon, E., Tadasu, S. I., Stuyver, L., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A., Widell, A. (2005): Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-973.

- Štránský, J. (1999): Virová hepatitida C, pp 14-42, Praha, Grada Publishing (Avicenum).
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005): Metody molekulární biologie, Brno, Masarykova Univerzita.
- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Uigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S. I., Alexander, G., Goedert, J. J., Kirk, G. D., Donfield, S. M., Rosen, H. R., Tobler, L. H., Busch, M. P., McHutchison, J. G., Goldstein, D. B., Carrington, M. (2009): Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461: 798-801.
- Thomson, B. J., Finch, R. G. (2005): Hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection* 11: 86-94.
- Tsai, S. L., Liaw, Y. F., Chen, M. H., Huang, C. Y., Kuo, G. C. (1997): Detection of Type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C chronicity. *Hepatology* 25: 449-458.
- Urbánek, P. (2011): Novinky v terapii chronické infekce virem hepatitidy C. *Remedia* 21: 380-385.
- World Health Organization (2004): Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *The Journal of Clinical Pharmacology* 44: 20-29.

8.2 Seznam hypertextových odkazů

Česká hepatologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně a Společnost infekčního lékařství České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně - Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C

URL: < <http://www.ces-hep.cz/file/161/Guidelines%20HCV%202012.pdf> >
[cit. 2013-3-19]

GENERI BIOTECH

URL: < <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/> >
[cit. 2013-4-1]

Roche Applied Science

URL:
< <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index.jsp?id=LC010404> >
[cit. 2013-4-1]

< <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index.jsp?id=LC01060104> >
[cit. 2013-4-1]

Státní zdravotní ústav v Praze

URL: < <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolutne> > [cit. 2012-11-6]

Literatura pro praktickou část:

QIAGEN (2010): QIAamp[®] DNA Mini and Blood Mini Handbook

Aktualizované vydání (2012) dostupné na internetových stránkách firmy QIAGEN:

URL: < <http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id={67893A91-946F-49B5-8033-394FA5D752EA}&lang=en&ver=1> > [cit. 2013-3-27]

Roche (2011): LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe, Version 14

URL: < https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/03003248001_en_14.pdf >
[cit. 2013-3-27]

TIB MOLBIOL (2011): LightMix[®] Kit IL28B

URL: < http://www.roche-as.es/logs/LightMix_40-0588-32_IL28B_V_110420.pdf >
[cit. 2013-3-28]

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

anti-HCV	protilátka proti viru hepatitidy C
CD	cluster of differentiation
DAA	directly acting antiviral, přímo působící virostatika
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	double-stranded DNA, dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
EDTA	etylendiamin tetraoctová kyselina
EIA	enzyme immunoassay, enzymová imunoanalýza
ER	endoplazmatické retikulum
HBV	hepatitis B virus, virus hepatitidy B
HCV	hepatitis C virus, virus hepatitidy C
HIV	human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLA	human leucocyte antigen, hlavní histokompatibilní komplex
IFN	interferon
IRES	internal ribosome entry site
kDa	kilodalton
LDL-R	low-density lipoprotein receptor
NK	natural killer
ORF	open reading frame, otevřený čtecí rámeček
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
peg-IFN	peginterferony
RBV	ribavirin
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase, RNA-dependetní RNA-polymeráza
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
rpm	revolutions per minute, otáčky za minutu
SNP	single nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus
SR-BI	scavenger receptor B type I
ssRNA	single-stranded RNA, jednovláknová ribonukleová kyselina
SVR	sustained virological response, setrvalá virologická odpověď
UTR	untranslated region, nepřekládané oblasti
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace