



**UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU**

Collegium Medicum  
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

**Bydgoszcz 2023 r.**



**UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU**  
Wydział Lekarski  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

**Justyna Moppert**

**Powikłania hepatologiczne zakażenia EBV u dzieci  
z uwzględnieniem czynników predykcyjnych**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Promotor**

**Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Pawłowska**

**Promotor pomocniczy**

**Dr hab. n. med. Krzysztof Domagalski, prof. UMK**

**Bydgoszcz 2023 r.**

## ***Składam podziękowania***

*Promotor,*

*Profesor dr hab. n. med. **Małgorzacie Pawłowskiej** za okazaną pomoc na każdym etapie przewodu doktorskiego oraz za cenne wskazówki podczas przygotowania rozprawy.*

*Promotorowi pomocniczemu,*

*dr hab. n. med. **Krzysztofowi Domagalskiemu**, prof. UMK za wsparcie, liczne rady i merytoryczne uwagi.*

## SPIS TREŚCI

<b>SPIS TREŚCI</b> .....	3
<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	5
<b>I. WPROWADZENIE</b> .....	7
1. Wirus Epsteina - Barr .....	10
1.1. Budowa genomu EBV .....	10
1.2. Inicjacja zakażenia EBV .....	11
1.3. Cykl życiowy EBV.....	13
1.4. Przebieg kliniczny zakażenia EBV.....	12
1.5. Diagnostyka zakażenia EBV.....	14
2. Cytokiny i cząstki adhezyjne.....	15
2.1. Cząstka adhezyjna s - ICAM - 1 .....	15
2.2. Czynniki martwicy nowotworu .....	16
2.3. Interleukina 6.....	17
3. MiRNA .....	17
3.1. Budowa i funkcje .....	17
3.2. Ekspresja miRNA w patogenezie chorób wątroby.....	18
3.2.1. MiRNA - 122 .....	19
3.2.2. MiRNA - 21.....	19
3.2.3. MiRNA - 199a .....	20
3.2.4. MiRNA - 26b.....	21
3.2.5. MiRNA - 34a .....	22
4. Transporter błonowy BSEP.....	22
4.1. Budowa i funkcje .....	22
4.2. Mutacje genetyczne BSEP.....	23
<b>II. CEL NAUKOWY</b> .....	25
<b>III. PACJENCI</b> .....	26
<b>IV. METODYKA BADAŃ</b> .....	27
1. Diagnostyka zakażenia EBV .....	27
2. Aktywność ALT, GGTP i stężenie białka CRP w surowicy .....	28
3. Liczba leukocytów, monocytów, limfocytów .....	29
4. Analiza stężenia IL - 6 i TNF - $\alpha$ i s - ICAM - 1 w surowicy .....	30

5.	Izolacja i analiza ekspresji miRNA z krwi obwodowej.....	30
6.	Izolacja DNA z krwi obwodowej i genotypowanie .....	31
7.	Analiza statystyczna .....	32
<b>V.</b>	<b>WYNIKI</b> .....	<b>32</b>
1.	Charakterystyka kliniczna pacjentów.....	32
2.	Wiremia EBV DNA a wybrane parametry laboratoryjne i czas hospitalizacji .....	34
3.	Cytokiny a wybrane parametry laboratoryjne.....	35
3.1.	Analiza zależności parametrów hepatologicznych i cytokin .....	39
4.	MiRNA a wybrane parametry laboratoryjne.....	41
4.1.	Zakażenie EBV a ekspresja miRNA .....	41
4.2.	Zależność ekspresji miRNA, aktywności ALT i GGTP .....	43
5.	Rozkład genotypów i alleli dla polimorfizmu 1331T > C genu ABCB11 .....	45
6.	Wpływ wieku na przebieg zakażenia EBV .....	48
<b>VI.</b>	<b>DYSKUSJA</b> .....	<b>50</b>
<b>VII.</b>	<b>WNIOSKI</b> .....	<b>58</b>
<b>VIII.</b>	<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>59</b>
<b>IX.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>60</b>
<b>X.</b>	<b>PIŚMIENNICTWO</b> .....	<b>61</b>
	<b>SPIS RYCIN</b> .....	<b>72</b>
	<b>SPIS TABEL</b> .....	<b>74</b>
	<b>ZAŁĄCZNIKI</b> .....	<b>75</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AAC** - (*acute acalculous cholecystitis*) - bezkamicze zapalenie pęcherzyka żółciowego
- ALD** - (*alcoholic liver disease*) - alkoholowa choroba wątroby
- ALP** - (*fosfatase alcalina*) - fosfataza zasadowa
- ALT** - (*alanine aminotransferase*) - aminotransferaza alaninowa
- antygen MA** - (*membrane antygen*) - antygen membranowy
- AST** - (*aspartate aminotransferase*) - aminotransferaza asparaginianowa
- ATP** - (*adenosine triphosphate*) - adenozyntrifosforan
- BRIC 2** - (*benign reccurent intrahepatic cholestasis 2*) - łagodna nawracająca wewnątrzwątrobowa cholestazą typu 2
- BSEP** - (*bile salt export pump*) - pompa eksportu soli żółciowych
- CMV** - (*Cytomegalovirus*) - wirus cytomegalii
- CRP** - (*C - reactive protein*) - białko C - reaktywne
- Ctdsp2** - (*Carboxy - terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 2*) - końcowa węglowa RNA domena polimerazy II dla polipeptydu A małej fosfatazy 2
- CAEBV** - (*chronic active EBV*) - przewlekłe aktywne zakażenie EBV
- DCA** - (*deoxycholic acid*) - kwas deoksycholowy
- DILI** - (*drug induced liver injury*) - polekowe uszkodzenie wątroby
- DIF** - (*differentiation - inducing factor*) - inicjujący czynnik różnicujący
- EA** - (*early antygen*) - antygen wczesny
- EBER** - (*EBV Encoded small RNA*) - kodowane przez małe RNA
- EBNA** - (*EBV nuclear antygen*) - antygen jądrowy EBV
- EBV** - (*Epstein - Barr virus*) - wirus EBV
- ER** - (*endoplasmatic retikulum*) - retikulum endoplazmatyczne
- FGF** - (*Fibroblast growth factors*) - czynnik wzrostu fibroblastów
- FHF** - (*Fulinant Hepatic Failure*) - piorunujące zapalenie wątroby
- FXR** - (*farnesoid receptor X*) - farnezoidowy receptor X
- GGTP** - (*Gamma - glutamyl transpeptidase*) - gamma - glutamylotranspeptydaza
- HBV** - (*hepatitis B virus*) - wirus zapalenia wątroby typu B
- HCC** - (*hepatocellular carcinoma*) - rak wotrowokomórkowy
- HCV** - (*hepatitis C virus*) - wirus zapalenia wątroby typu C

**HIV** - (*human immunodeficiency virus*) - ludzki wirus upośledzenia odporności

**ICAM - 1** - (*intercellular adhesion molecule - 1*) - międzykomórkowa cząstka adhezyjna

**ICP** - (*intrahepatic cholestasis of pregnancy*) - wewnątrzwątrobowa cholestaza

**IL - 1** - (*interleukin - 1*) - interleukina - 1

**IL - 6** - (*interleukin - 6*) - interleukina - 6

**IL - 12** - (*interleukin - 12*) - interleukina - 12

**INR** - (*international normalized ratio*) - międzynarodowy standardowy wskaźnik

**KSHV** - (*Kaposi's Sarcoma - Herpesvirus*) - mięsak Kaposiego - herpeswirus

**LDH** - (*lactate dehydrogenase*) - dehydrogenaza mleczanowa

**LPS** - (*lipopolysaccharides*) - lipopolisacharydy

**LMP** - (*latent membrane protein*) - latentne białko błonowe

**MELD** - (*Model of End - Stage Liver Disease*) - model schyłkowej niewydolności wątroby

**MHV - 68** - (*Murine gammaherpesvirus - 68*) - Mysi gammaherpeswirus - 68

**MRP2** - (*multidrug resistance protein 2*) - białko oporności wielolekowej 2

**NAFLD** - (*nonalcoholic fatty liver disease*) - niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby

**NTCP** - (*Sodium - taurocholate cotransporting polypeptide*) - polipeptyd kotransportujący traucholan sodu

**PBC** - (*primary biliary cirrhosis*) - pierwotna marskość żółciowa

**PCBP2** - (*poly(rC) - binding protein*) – komórkowe białko wiążące poly(rC)

**PFIC 2** - (*progressive familial intrahepatic cholestasis*) - postępująca rodzinna cholestaza wewnątrzwątrobowa

**PPAR** - (*peroxisome proliferator - activated receptor*) - receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów

**SNP** - (*Single - Nucleotide Polymorphism*) - polimorfizm pojedynczego nukleotydu

**STAT** - (*signals transducers and activator of transcription*) - przekaźniki sygnałów i aktywatory transkrypcji

**S100A7** - (*S100 calcium - binding protein A7*) - S100 wapń - wiązanie białka A7

**TNF -  $\alpha$**  - (*tumor necrosis factor -  $\alpha$* ) - czynnik martwicy nowotworu -  $\alpha$

**TNRF** - (*tumor necrosis factor receptor*) - receptor czynnika martwicy nowotworu

**UDPG** - (*UDP - glucuronyltransferase*) - UDP - glutamylotransferaz

## I. WPROWADZENIE

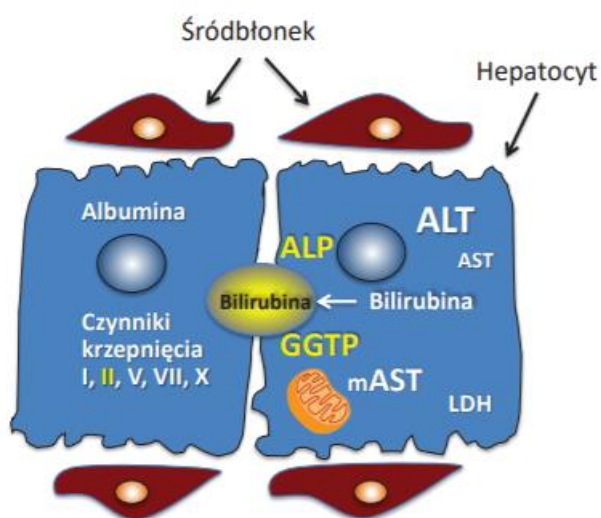
Wątroba jest największym narządem jamy brzusznej, stanowi 3 - 5% całkowitej masy ciała. Uczestniczy w większości szlaków metabolicznych, spełnia wiele złożonych funkcji wydzielniczych i jest głównym źródłem większości białek osocza, lipoprotein i węglowodanów. Podstawową funkcją zewnątrzwydzielniczą wątroby jest wydzielanie żółci. W 60% za produkcję żółci odpowiadają hepatocyty. Komórki nabłonkowe dróg żółciowych (cholangiocyty) stanowiące 3 - 5% populacji komórek wątroby, wydzielają pozostałe 40% objętości żółci. Zaburzenia produkcji żółci, w której uczestniczą hepatocyty i cholangiocyty oraz utrudnienia w przepływie żółci prowadzą do rozwoju cholestaz. Utrzymująca się cholestaza ma negatywny wpływ na wiele procesów, w tym na wchłanianie jelitowe czy krążenie wątrobowo - jelitowe kwasów żółciowych, wtórnie przyczyniając się do uszkodzenia hepatocytów.

W rutynowej diagnostyce hepatologicznej jest wiele testów oceniających funkcje wątroby. Badania laboratoryjne będące istotnym elementem oceny wydolności wątroby w zakresie syntezy białkowej to INR (ang. *International normalized ratio*) i stężenie albumin. Zwiększona aktywność aminotransaminazy alaninowej i asparaginianowej (ALT, AST), fosfatazy zasadowej (ALP) i gamma - glutamylotranspeptydazy (GGTP) świadczy jedynie o zajęciu procesem chorobowym hepatocytów czy cholangiocytów [1], ale w niektórych przypadkach różnicowanie choroby cholestatycznej od mięszonego uszkodzenia wątroby na podstawie oznaczeń w/w. enzymów może być utrudnione.

Cholestaza może towarzyszyć dużej aktywności choroby mięszonej wątroby czy zaawansowanemu włóknieniu. Z drugiej strony choroby cholestatyczne poprzez wtórne uszkodzenie hepatocytów mogą przyczyniać się do wzrostu aktywności enzymów wątrobowych. Zwiększone stężenie bilirubiny wynika z upośledzonego jej sprzęgania z kwasem glukuronowym, upośledzenia wydalania komórkowego, jak również niedrożności dróg żółciowych. Dla procesów cholestatycznych istotna jest ocena zwłaszcza jej frakcji związanej, czyli sprzężonej. W diagnostyce cholestazy wykorzystuje się ponadto ocenę aktywności ALP, GGTP i stężenie kwasów żółciowych. Fosfataza zasadowa w wątrobie znajduje się na powierzchni błony kanalikowej hepatocyta. Poza wątrobą występuje także w jelitach, nerkach i kościach, co determinuje jej statystycznie wyższą aktywność u dzieci i młodzieży. Wynika to ze zwiększonego metabolizmu kostnego w okresie wzrostu kośćca. GGTP jest



enzymem, którego aktywność u noworodków i niemowląt jest 5-7 - krotnie wyższa niż u osób dorosłych. W wątrobie enzym ten znajduje się w błonie kanalikowej, mikrosomach hepatocytów oraz w błonie komórek nabłonkowych dróg żółciowych.

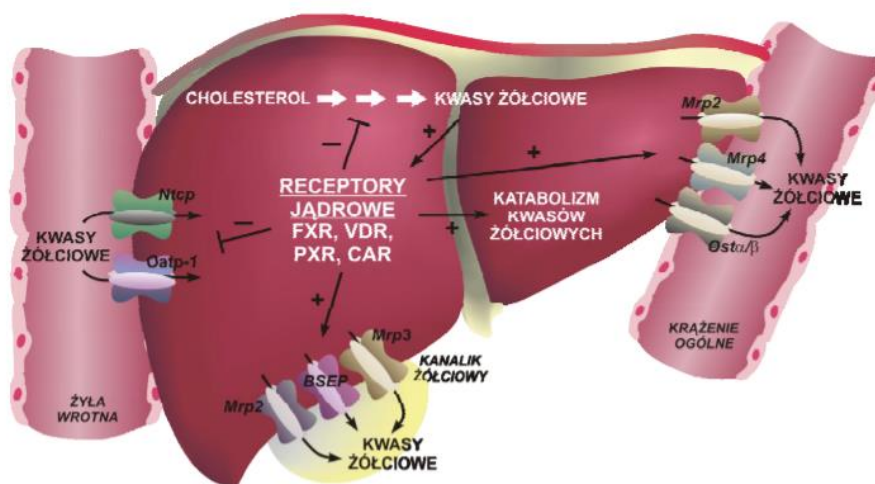


mAST - mitochondrialny AST, ALP - fosfataza zasadowa, LDH - dehydrogenaza mleczanowa

**Rycina 1. Schematyczna prezentacja lokalizacji enzymów wskaźnikowych i wątrobowych białek w obrębie hepatocytu [1].**

Wydalenie kwasów żółciowych jest uzależnione od sprawnie działającego układu wątrobowo-żółciowego. Produkty drobnoustrojów, takie jak endotoksyna czy lipopolisacharyd (LPS, ang. *lipopolysaccharides*) czy stymulują bezpośrednio hepatocyty oraz komórki Kupffera do sekrecji cytokin, które hamują ekspresję genów transporterów kanalików żółciowych zwłaszcza NTCP (ang. *Sodium - Taurocholate Cotransporting Polypeptide*) i BSEP (ABCB11, ang. *Bile Salt Export Pump*). Do grupy cytokin zaangażowanych w w/w. procesy zalicza się m.in. TNF -  $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$* ) i IL - 6 [2, 3, 4, 5]. Transport kwasów żółciowych z hepatocytu do pęcherzyka żółciowego odbywa się wbrew gradientowi stężeń, gdyż ich stężenie w żółci jest 1000 razy większe. Głównym białkiem uczestniczącym w tym procesie jest transporter BSEP. Pompa eksportująca kwasy żółciowe ma aktywność ATP - azy i ulega ekspresji prawie wyłącznie w wątrobie [6]. Obniżenie jej aktywności może przyczyniać się do rozwoju cholestazy. Niektóre

mutacje w genie ABCB11 odpowiedzialne za niedobór białka transportowego BSEP są ściśle związane z określoną formą cholestazy.



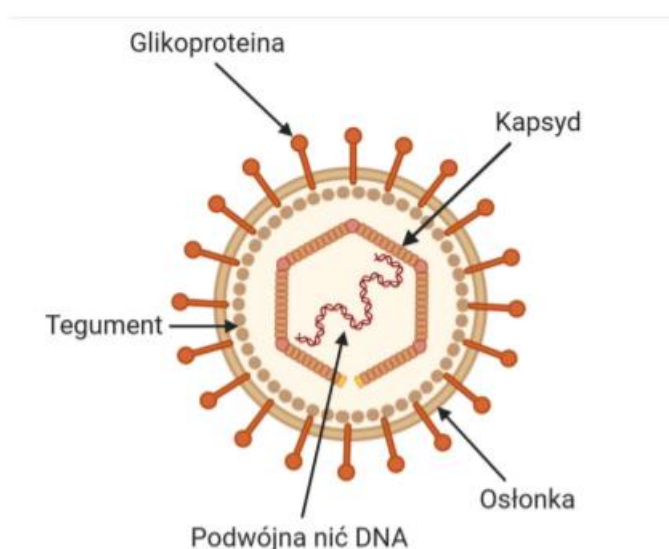
**Rycina 2. Transport kwasów żółciowych do kanalika żółciowego [6].**

Cholestaza w przebiegu zakażeń częściej występuje u dzieci niż u dorosłych. U dorosłych łagodne infekcje bakteryjne zazwyczaj nie wywołują cholestazy, natomiast w przypadku zakażeń o ciężkim przebiegu ryzyko jej wystąpienia sięga 0,6 - 54%. U noworodków i niemowląt ryzyko wystąpienia żółtaczk spowodowanej ciężką infekcją wynosi 20 - 60%. Znacznie rzadziej cholestaza jest powikłaniem infekcji wirusowej, grzybiczej lub inwazji pierwotniakowej [7, 8]. Pierwszą reakcją wątroby na stan zapalny jest aktywacja komórek Browicza - Kupffera, które stanowią 70% całej populacji makrofagów. Oprócz endotoksyn bakteryjnych, bakterii i wirusów usuwają także mediatory zapalne pochodzące z jelit lub innych narządów, ograniczając rozprzestrzenianie się stanu zapalnego. Ich aktywacja prowadzi również do sekrecji cytokin prozapalnych tj.: TNF -  $\alpha$ , IL - 1, IL - 6, IL - 12, tlenku azotu, czy wolnych rodników. Odpowiedź zapalna wpływa również na ekspresję i funkcję kluczowych transporterów wątrobowo - żółciowych. [4]. Interakcje między komórkami śródbłonna naczyń zatokowych, hepatocytami i komórkami Browicza - Kupffera modyfikują właściwości śródbłonna, stymulując jego działanie prozapalne i prokrzepowe. Zwiększenie ekspresji integryn na powierzchni napływających do wątroby pod wpływem TNF -  $\alpha$  granulocytów sprzyja ich adhezji do komórek śródbłonna, przenikaniu do mięszu wątroby i nasilaniu procesów proteolitycznych prowadzących do uszkodzenia jej mięszu [9, 10].

## 1. WIRUS EPSTEINA - BARR

### 1.1. Budowa genomu EBV

Wirus Epsteina - Barr jest wirusem DNA, należącym do rodziny *Herpesviridae*. Kapsyd ma rozmiary 100 - 110 nm, zbudowany jest ze 162 kapsomerów i otacza materiał genetyczny wirusa, którym jest dwuniciowe DNA o strukturze liniowej. Wielkość wirionu dzięki osłonce zyskuje kształt zbliżony do kuli o rozmiarze 120 - 200 nm. Kapsyd otoczony jest tegumentem (warstwą białkową) i osłonką składającą się z podwójnej warstwy lipidowej z glikoproteinami.



**Rycina 3. Schemat budowy wirusa EBV [11].**

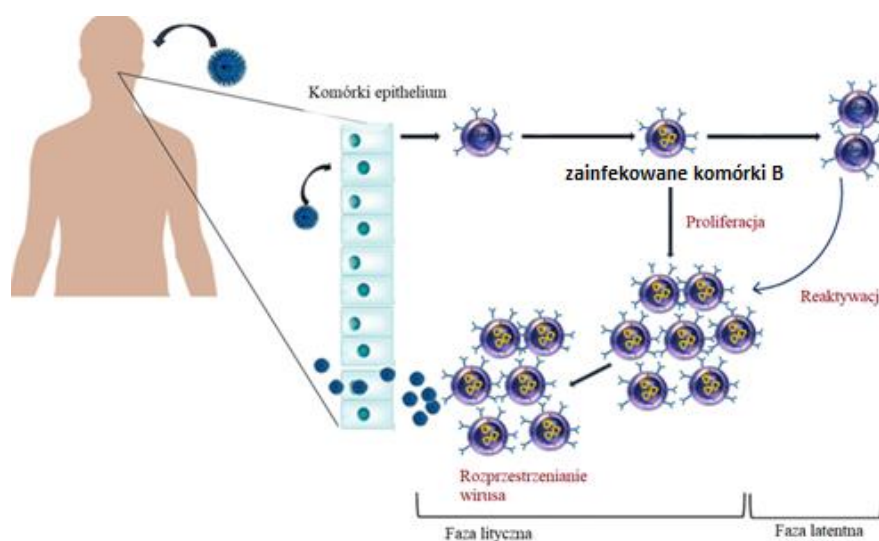
Genom wirusa Epsteina - Barr to podwójna nić DNA (dsDNA) o strukturze liniowej, składająca się z około 172 tysięcy par zasad. DNA EBV może przybierać dwie postaci: liniową (podczas fazy litycznej infekcji) lub episomalną (postać kolista w stanach latencji). Różnice w zakresie struktury obejmujące gen kodujący antygen jądrowy (EBNA - 1; *EBV Nuclear Antygen - 1*) definiują podział na dwa typy wirusa [12, 13, 14]. Typ A występuje na świecie zdecydowanie częściej, przy czym w Europie Zachodniej wywołuje 90% zachorowań. Typ B dominuje w regionie Afryki równikowej, charakteryzuje się również mniejszą zdolnością do transformacji limfocytów B. Prawdopodobnie typ A skuteczniej wywołuje immortalizację limfocytów B, ale dotychczas nie udowodniono, by któryś z tych typów był bardziej onkogenny [12, 13].

## 1.2. Inicjacja zakażenia EBV

Zakażenie pierwotne zaczyna się w jamie nosowo - gardłowej. Wnikanie EBV do limfocytów B odbywa się przy współudziale receptora CD 21, poprzez połączenie się z białkami osłonki: gp350 i gp220. Rzadziej wirus zakaża limfocyty T bądź komórki NK (ang. *Natural Killer*). Poprzez reorganizację cytoszkieletu komórki umożliwiają wnikanie wirusa z pominięciem endocytozy [13, 14, 15]. W przebiegu zakażenia EBV zwiększone wydzielanie IL - 6, TNF -  $\alpha$  czy IL - 1 jest wynikiem zwiększonej aktywności limfocytów CD8+, będącej następstwem swoistej odpowiedzi komórkowej. Z kolei zwiększona aktywność cytokin stymuluje indukcję sekrecji cząstek adhezyjnych. Uważa się, że ta zwiększona aktywność cytotoksycznych limfocytów CD 8+ odpowiada za nasilenie większości objawów mononukleozy zakaźnej [15]. W związku z tym można przypuszczać, że stężenie w/w. cytokin wykazuje zależność ze stopniem uszkodzenia hepatocytów czy leukocytozą.

## 1.3. Cykl życiowy EBV

W przebiegu zakażenia pierwotnego może dojść do szybkiej replikacji wirionów potomnych i ich uwolnienia w przebiegu cyklu litycznego wirusa, co skutkuje śmiercią zakażonej komórki. Wirus może też przejść w cykl latentny i w postaci utajonej bytować w limfocytach B, replikując się wraz z materiałem genetycznym gospodarza.



Rycina 4. Cykl życiowy wirusa EBV u pacjentów immunokompetentnych [16].

Cykl latencji dotyczy bezobjawowej lub bardzo łagodnie przebiegającej infekcji, w trakcie której zajęte limfocyty B ulegają immortalizacji [13,17,18]. W tej fazie genom wirusa przyjmuje formę kolistą, pozachromosomalnego episomu. Cykl lityczny trwa znacznie dłużej podczas ostrej infekcji pierwotnej, ale może wynikać również z reaktywacji wirusa.

Materiał genetyczny wirusa podczas cyklu litycznego przybiera postać liniową. Ekspresja dotyczy tych genów, których białka uczestniczą w replikacji wirusowego DNA, tworzeniu kapsydu oraz umożliwiają rozprzestrzenianie zakażenia. Są to m.in. geny tzw. antygenów wczesnych EA (ang. *Early Antygen*), antygenów MA (ang. *Membrane Antygen*) i białek kapsydu VCA (ang. *Viral Capsid Antigen Complex*). Te białka stymulują odpowiedź humoralną organizmu, co ma znaczenie dla diagnostyki serologicznej zakażenia EBV [13].

#### **1.4. Przebieg kliniczny zakażenia EBV**

Obecność markerów zakażenia wirusem Epsteina - Barr dotyczy ponad 95% dorosłych, natomiast w krajach rozwiniętych u około 50% dzieci do 5 roku życia stwierdza się obecność przeciwciał świadczących o tym zakażeniu [19, 20]. Zakażenie pierwotne EBV u dzieci jest zwykle bezobjawowe. Infekcja u młodzieży i dorosłych może prowadzić do rozwoju mononukleozy zakaźnej, przebiegającej najczęściej z triadą objawów: gorączką, limfadenopatią szyjną i zapaleniem gardła. Łagodne zwiększenie aktywności aminotransferaz (do około 3 x powyżej górnej granicy normy - GGN) obserwuje się u około 90% pacjentów zakażonych EBV i w głównej mierze ma ono charakter asymptomatyczny [21 - 26]. Aktywność aminotransferaz przekraczająca 10 - krotnie GGN występuje zdecydowanie rzadziej i wymaga rozszerzenia diagnostyki hepatologicznej [24, 25, 26]. Systematyczne zwiększanie aktywności ALT i AST najczęściej obserwuje się w trakcie drugiego tygodnia choroby, natomiast normalizację w kolejnych 2 - 6 tygodniach [26]. Kofteridis i wsp. obserwowali zwiększanie aktywności enzymów wątrobowych już w pierwszym tygodniu choroby, z maksymalną aktywnością w drugim tygodniu i tendencją do normalizacji od trzeciego tygodnia [24]. Splenomegalia i hepatomegalia są częstym odchyleniem i dotyczą odpowiednio około 25 i 12% dzieci [27]. U osób immunokompetentnych przebieg ostrej infekcji EBV jest najczęściej bezobjawowy. EBV w formie latentnej pozostaje w limfocytach B i może przyczyniać się do występowania nawracających objawów klinicznych wynikających z okresowej reaktywacji zakażenia. Przewlekłe aktywne zakażenie EBV (CAEBV; ang. *Chronic Active EBV*) jest

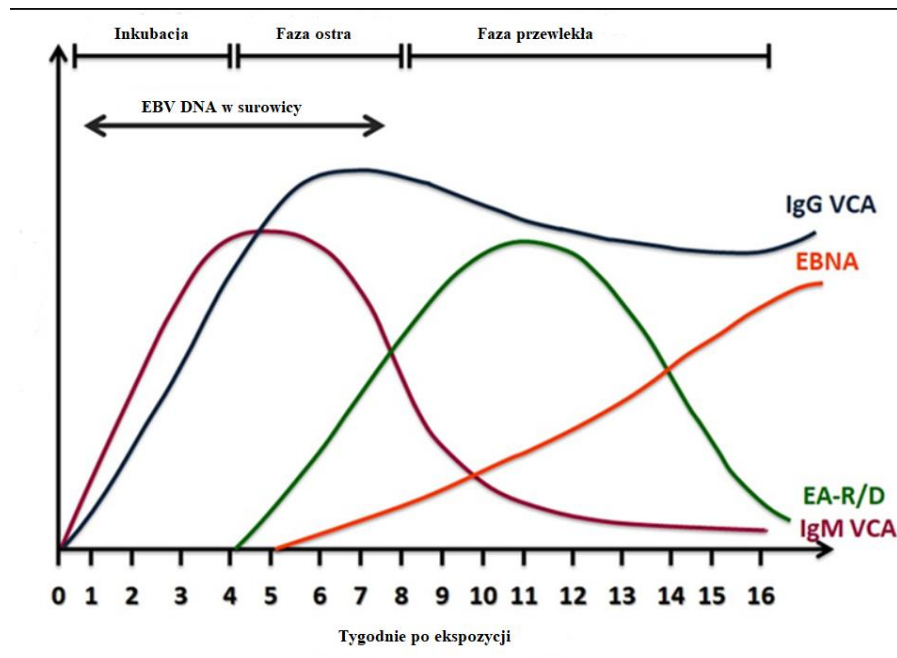
przykładem przewlekłej mononukleozopodobnej infekcji z obecnością wysokiego miana przeciwciał przeciwko antygenom EBV, które sugerują aktywną replikację. Charakteryzuje się nawracającą gorączką, limfadenopatią, hepatosplenomegalią oraz zwiększeniem aktywności aminotransferaz. Ta postać kliniczna przewlekłego zakażenia EBV była pierwotnie opisywana u dzieci, jednak w ostatnich latach wraz z rozwojem metod diagnostycznych coraz częściej jest raportowana także u dorosłych [28].

Mechanizm rozwoju zapalenia wątroby indukowanego zakażeniem EBV nie jest jasny. Wirus nie działa bezpośrednio na komórki wątroby czy epithelium dróg żółciowych. Badania dowodzą, że za uszkodzenie komórek wątroby odpowiedzialne są cytokiny prozapalne takich jak interferon gamma czy TNF -  $\alpha$  [29, 30], za których sekrecję odpowiedzialne są limfocyty T CD 8+.

Ciężkie cholestatyczne zapalenie wątroby charakteryzujące się zwiększeniem aktywności ALP, GGTP czy hiperbilirubinemią jest rzadko spotykane w przebiegu ostrej fazy zakażenia EBV i dotyczy około 5 - 6,6% pacjentów [22, 24, 25, 26, 30]. Klinicznie jawne zażółcenie powłok skórnych może być związane nie tylko z cholestazą, ale także z niedokrwistością hemolityczną, będącą następstwem zakażenia wirusem Epsteina - Barr [22, 26]. Niezmiernie rzadko w przebiegu zakażenia EBV obserwuje się niewydolność wątroby czy zapalenie trzustki wklajające cholestatyczne zapalenie wątroby [23, 30, 31, 32]. Niezwykle rzadkie jest także piorunujące zapalenie wątroby (FHF; ang. *Fulminant Hepatic Failure*). Dotyczy ono głównie pacjentów z niedoborami odporności, np. zakażonych HIV, po przeszczepach narządów, czy pacjentów z zespołem limfoproliferacyjnym sprzężonym z chromosomem X (zespół Duncana) [25, 26, 33, 34]. Ostre bezkamicze zapalenie pęcherzyka żółciowego (AAC; ang. *Acute Acalculous Cholecystitis*) jest zdefiniowane jako zapalenie pęcherzyka żółciowego bez obecności złożeń. U pacjentów pediatrycznych stanowi ono 50 - 70% wszystkich przypadków ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego. [22, 30, 35 - 38]. W patogenezie indukowanego zakażeniem EBV bezkamiczego zapalenia pęcherzyka żółciowego w populacji pediatrycznej należy uwzględnić także zespół Gilberta. Występuje on u 11 - 16% osobników rasy kaukaskiej. Jest dziedziczną i łagodną hiperbilirubinemią spowodowaną mutacją w genie UGT1A1 kodującym enzym UDP - glukuronylotransferazę (UDPG) [19, 22, 32, 39]. W około 40% przypadków choroba spowodowana jest mutacją polegającą na insercji dwunukleotydu TA w regionie promotorowym genu UGT1A1. Mutacja prowadzi do upośledzenia sprzęgania bilirubiny w hepatocytach.

## 1.5. Diagnostyka zakażenia EBV

W populacji pediatrycznej zakażenie wirusem Epsteina - Barr ma bardzo szeroką symptomatologię. Od najczęściej obserwowanego przebiegu bezobjawowego do rzadko stwierdzanej ostrej niewydolności wątroby przebiegającej z ciężką cholestazą. Dlatego tak istotna jest znajomość możliwych powikłań hepatologicznych towarzyszących zakażeniu EBV, które w nielicznych przypadkach mogą być stanem zagrażającym zdrowiu i życiu dziecka. Objawy kliniczne podobne do objawów mononukleozy zakaźnej mogą być wywołane przez szereg innych patogenów, np. wirus CMV, HIV, *Toxoplasma gondii*. W związku z powyższym rozpoznanie mononukleozy zakaźnej o etiologii EBV powinno być oparte nie tylko na obrazie klinicznym, ale również na badaniach laboratoryjnych i serologicznych. Przeciwciała heterofilne u dzieci między 2 a 5 rokiem życia są obecne jedynie u 50%, w grupie poniżej 2 roku życia jedynie u 10 - 30% [40]. Te nieswoiste przeciwciała syntetyzowane są w początkowej fazie zakażenia. W przebiegu swoistej odpowiedzi humoralnej produkowane są przeciwciała skierowane przeciwko wszystkim antygenom wirusa. W diagnostyce laboratoryjnej największe znaczenia mają przeciwciała przeciwko antygenowi kapsydu (VCA), antygenowi wczesnemu (EA) oraz antygenowi jądrowemu (EBNA) [15]. Wykorzystanie przeciwciał przeciwko swoistym antygenom białkowym w diagnostyce zakażenia EBV jest możliwe z uwagi na charakterystyczne zależności czasowe. Ostłą fazę mononukleozy zakaźnej można rozpoznać w przypadku stwierdzenia obecności przeciwciał IgM przeciwko antygenowi kapsydowemu VCA oraz antygenowi wczesnemu. W większości przypadków wykrycie obecności przeciwciał przeciwko VCA w klasie IgM testem jakościowym jest wystarczające do prawidłowego zdiagnozowania pierwotnego zakażenia EBV [40]. Należy jednak pamiętać, że w przypadkach w których obserwujemy niedobory funkcjonalne limfocytów, oparcie diagnostyki jedynie na badaniach serologicznych jest niewystarczające. U immunoniekompetentnych pacjentów ocena wysokości wirerii EBV DNA w diagnozowaniu oraz monitorowaniu nowotworów i chorób limfoproliferacyjnych indukowanych zakażeniem EBV jest już dobrze udokumentowana i wykorzystywana jako czynnik prognostyczny [19, 41, 42, 43].



Rycina 5. Odpowiedź serologiczna w zakażeniu EBV [16].

Wśród pacjentów immunokompetentnych ocena wirerii EBV DNA zwłaszcza w przypadku infekcji pierwotnej nie jest z reguły wykonywana. Z uwagi jednak na duży odsetek fałszywie dodatnich wyników badań serologicznych w grupie najmłodszych dzieci badania molekularne mogą stać się istotnym elementem w diagnostyce różnicowej. Potwierdzeniem diagnostycznego znaczenia PCR DNA EBV są badania opisujące zależność pomiędzy wysokością wirerii a koniecznością hospitalizacji czy długością utrzymywania się objawów [44 - 47].

## 2. CYTOKINY I CZĄSTKI ADHEZYJNE

### 2.1. Cząstka adhezyjna s - ICAM - 1

Zakażenia wirusowe, m.in. wirusem Epsteina - Barr mogą być jednym z czynników przyczyniających się do uszkodzenia endothelium i wzrostu adhezji leukocytów. Proces adhezji zarówno leukocytów jak i monocytów jest związany z obecnością cząstek adhezyjnych tj. ICAM - 1 (ang. *intercellular adhesion molecule - 1*) i VCAM - 1 (ang. *vascular cel adhesion molecule - 1*) [48]. Cząstka ICAM - 1 należy do nadrodziny immunoglobulin. Występuje na powierzchni komórek śródbłonna, limfocytów B i T, monocytów i fibroblastów. Jest regulatorem oddziaływań międzykomórkowych, w szczególności adhezji leukocytów do



śródbłonna i ich diapedezy przez jego barierę [49, 50]. Zbudowana jest z pięciu domen immunoglobulinopodobnych, których ligandem jest integryna  $\beta 2$ . Wykazano, że rozpuszczalna w surowicy postać ICAM (s - ICAM, ang. *soluble* - ICAM) może stanowić ważny czynnik prognostyczny w przebiegu chorób nowotworowych. Potwierdzono znaczenie s - ICAM - 1 jako czynnika prognostycznego m.in. w raku pierwotnym wątroby czy chłoniaku Hodgkina [51, 52, 53, 54]. Indukcja sekrecji ICAM - 1 i zwiększenie stężenia jego formy rozpuszczalnej w surowicy jest wynikiem działania mediatorów stanu zapalnego, np. TNF -  $\alpha$ , IL - 1, interferonu  $\gamma$  oraz lipopolisacharydu bakteryjnego (LPS) uwalnianych z aktywowanych stanem zapalnym komórek Kupffera oraz uszkodzonych hepatocytów [55, 56, 57, 58]. W przebiegu cholestazy zewnątrzwątrobowej udokumentowano zależność między wzrostem stężenia bilirubiny i kwasów żółciowych a zwiększoną sekrecją cząstki adhezyjnej ICAM - 1 [58].

## 2.2. Czynniki martwicy nowotworu

Czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ), określany również jako kachektyna, czy też inicjujący czynnik różnicujący (DIF, ang. *Differentiation - Inducing Factor*) jest prozapalną wielofunkcyjną cytokiną, wytwarzaną głównie przez monocyty, makrofagi, limfocyty T, komórki tuczne. Istnieją dwie formy tej prozapalnej cytokiny. Pierwsza jest formą błonową o masie cząsteczkowej 26 kDa, druga to forma sekrecyjna o masie 17 kDa. Gen kodujący TNF -  $\alpha$  jest zlokalizowany w segmencie 6p23 - 6q12 na chromosomie 6. TNF -  $\alpha$  wpływa na komórki efektorowe poprzez białka receptorowe tj p53 i p75. Receptor p53 (CD120 -  $\alpha$ , TNFR1, ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*) odpowiada za cytotoksyczność czynników martwicy nowotworu, jest typowy dla komórek zawierających jądro komórkowe, ma podobne powinowactwo do formy sekrecyjnej i błonowej TNF -  $\alpha$ . Receptor p75 (CD - 120 -  $\beta$ , TNFR2, ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor 2*) odpowiada za stymulację limfocytów T, obecny jest na fibroblastach, komórkach śródbłonna, limfocytach i makrofagach, wykazuje powinowactwo do formy błonowej czynnika martwicy nowotworu [59, 60]. Istotny jest wpływ TNF -  $\alpha$  na regulację immunologiczną, będący wynikiem utrzymywania równowagi pomiędzy funkcją prozapalną i przeciwzapalną. Wpływ na komórki układu odpornościowego wynika zarówno z bezpośredniego działania, jak również jest efektem synergii z takimi cytokinami jak IL - 6 czy IL - 1. Nasilenie reakcji zapalnej i stymulacja produkcji białek ostrej fazy w wątrobie przez czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  wynika z pobudzenia chemotaksji i fagocytozy makrofagów,

monocytów i neutrofilów i zwiększenia ich przylegania do komórek śródbłonka poprzez zwiększenie sekrecji cząstki adhezyjnej ICAM - 1 [61, 62]. Produkcja białek ostrej fazy w wątrobie, m.in. CRP pod wpływem TNF  $\alpha$  pozwala wykorzystywać osoczowe stężenia CRP do monitorowania reakcji zapalnej zależnej od TNF -  $\alpha$ .

### **2.3. Interleukina 6**

Interleukina 6 jest glikozylowanym polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym 21 - 28 kDa, zbudowanym z 4 helis połączonych pętlami. Gen kodujący IL - 6 znajduje się na chromosomie 7 i zawiera 5 segmentów kodujących (eksonów) [63]. Jest cytokiną o plejotropowym działaniu, której wytwarzanie indukuje wiele czynników, tj. IL - 1, TNF -  $\alpha$ , interferony, wirusy i bakteryjne lipopolisacharydy [64]. Oddziałuje na komórki poprzez receptory zbudowane z różnych łańcuchów  $\alpha$  oraz wspólnego łańcucha  $\beta$ . Łańcuch  $\alpha$  wiąże swoiście cytokinę, natomiast łańcuch  $\beta$  przekazuje sygnał aktywacyjny do wnętrza komórki. IL - 6 oddziałuje na komórki hematopoetyczne, neuronalne, hepatocyty i komórki nabłonka dróg żółciowych [65]. Jest głównym czynnikiem inicjującym syntezę białek ostrej fazy, których zdecydowana większość wytwarzana jest w wątrobie. IL - 6 w hepatocytach za pośrednictwem białka STAT3 (ang. *Signals Transducers and Activator of Transcription 3*) indukuje transkrypcję genu kodującego hepcydynę, która hamuje uwalnianie żelaza z makrofagów i fagocytów tym samym wpływając również na metabolizm żelaza. Wpływa także na migrację i przeżycie leukocytów w tkankach, ograniczając wydzielanie cytokin prozapalnych. Stymuluje napływ limfocytów T do zajętych procesem zapalnym tkanek, promując jednocześnie aktywację chemokin odpowiedzialnych za ich adhezję [63, 66, 67].

## **3. MiRNA**

### **3.1. Budowa i funkcje**

MiRNA to grupa małych niekodujących, endogennych, jednoniciowych RNA o długości od 20 do 22 nukleotydów, które biorą udział w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym [68, 69]. Geny kodujące prekursor miRNA są zlokalizowane na wszystkich chromosomach, ale ich rozmieszczenie nie jest równomierne, np. u człowieka aż 28% zidentyfikowanych genów miRNA znajduje się jedynie na czterech chromosomach: 1, 19, 10

i 2 [70, 71]. MiRNA i ich geny docelowe wspólnie kontrolują procesy życiowe, ponieważ uczestniczą w złożonych sieciach regulacyjnych i kontrolują ekspresję genów we wszystkich procesach biologicznych, w tym w rozwoju komórek, odpowiedzi immunologicznej i śmierci komórek. Cechą charakterystyczną miRNA jest ich swoistość wobec danej tkanki, komórki. Są obecne w różnych płynach ustrojowych takich jak: osocze, mocz, ślina, łzy, mleko. Tym samym mikroRNA mogą być wykorzystane jako biomarkery uszkodzenia narządów np. miRNA - 208 jako wskaźnik uszkodzenia kardiomiocytów, czy miRNA - 122 jako czynnik prognostyczny uszkodzenia wątroby [68]. Dotychczas zidentyfikowano ponad 2500 ludzkich, dojrzałych miRNA. Większość wirusów RNA oraz Poxivirusy zaliczane do DNA - wirusów replikują w obrębie cytoplazmy. Uważa się, że te grupy wirusów nie kodują wirusowego miRNA, ponieważ wniknięcie materiału RNA wirusa do jądra spowodowałoby rozszczepienie i zniszczenie genomu wirusowego RNA. Panuje pogląd, że wirusy z szybkim litycznym cyklem replikacji są w mniejszym stopniu zdolne do kodowania miRNAs. Zdolność takiej syntezy jest najprawdopodobniej zarezerwowana głównie dla wirusów DNA z jądrowym cyklem replikacji i ze zdolnością do pozostawania w fazie latencji oraz możliwością indukcji zakażenia przewlekłego. Takie cechy są charakterystyczne dla herpeswirusów. Do wirusów z rodziny *Herpesviridae* kodujących miRNAs zalicza się wirusy: cytomegalii (CMV), Epsteina - Barr (EBV), Kaposi's Sarcoma - Herpesvirus (KSHV), Murine gammaherpesvirus - 68 (MHV - 68) [70]. Udowodniono nadekspresję komórkową miRNA w obwodowych limfocytach B w przebiegu latentnej fazy zakażenia EBV. Dwa z nich: miR - 155 i miR - 21 jako potencjalnie onkogenne mogą tłumaczyć wpływ wirusa Epsteina - Barr na proces kancerogenezy [72].

### **3.2. Ekspresja miRNA w patogenezie chorób wątroby**

Główną funkcją miRNA jest posttranskrypcyjna regulacja ekspresji genów poprzez degradację mRNA lub hamowanie translacji. W rzeczywistości wiele z nich działa jako supresor onkogenu lub nowotworu. Te struktury molekularne uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych komórki, jak również w aktywacji odpowiedzi immunologicznej, której miRNA są istotnym elementem. Wirusy mogą nasilać lub zmniejszać ekspresję miRNA, celem uniknięcia eliminacji. Przykładem jest zakażenie HCV, które powoduje wzrost produkcji IFN typu I w hepatocytach, co przyczynia się zwiększenia ekspresji miR - 196, miR - 296, miR - 351, miR - 432 oraz miR - 448, które bezpośrednio wiążą RNA wirusa i hamują jego replikację.

Z kolei zwiększenie ekspresji miRNA - 122 poprzez integrację z 5'UTR genomu wirusa przyczynia się do zwiększenia wirerii [73, 74, 75]. Nieprawidłowa ekspresja miRNA w tkance wątrobowej ma wpływ na patogenezę chorób wątroby, raka wątrobowokomórkowego, stłuszczenia czy zapalenia wątroby.

### 3.2.1. MiRNA - 122

W chorobach wątroby podstawowym miRNA jest miR - 122, które stanowi ~70% miRNA w tkance wątroby [76]. Zostało udowodnione, że miR - 122 występuje w ilości 66.000 kopii/hepatocyt, co czyni go jednym z najbardziej aktywnych miRNA w jakiegokolwiek tkance [77]. Znajduje się na dodatniej nici chromosomu 18q21.31.

**Tabela 1. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - 122 [78].**

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	hsa - miR - 122 - 5p
AACGCCAUUAUCACACUAAAUA	hsa - miR - 122 - 3p

Wykazano, że podwyższone poziomy krążącego miR - 122 odgrywają kluczową rolę w regulacji metabolizmu cholesterolu i kwasów tłuszczowych w wątrobie, korelują z nasileniem apoptozy hepatocytów w przebiegu wirusowego, alkoholowego, chemicznego czy polekowego uszkodzenie wątroby i zwiększoną aktywnością aminotransferaz [79, 80]. Pierwsza odkryta interakcja miRNA - wirus dotyczy miR - 122 i HCV. Interakcja tego miRNA z 5'UTR genomu wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) sprzyja replikacji wirusa, a rywalizacja z komórkowym białkiem wiążącym poly(rC) (ang. *poly(rC) - binding protein 2*, *PCBP2*) o wiązanie HCV RNA promuje powstawanie wirionów [70, 71, 73]. Obniżenie replikacji wirusa HBV odbywa się natomiast poprzez bezpośredni wpływ miRNA - 122 na polimerazę DNA i region HBx [73]. Dostępne są badania, w których wykazano, że dysregulacja ekspresji miR - 122 wiąże się ze zwiększeniem inwazyjności guza i progresją HCC (ang. *Hepatocellular Carcinoma*) [73, 81].

### 3.2.2. MiRNA - 21

MiR - 21 jest przykładem jednego z pierwszych microRNA opisanych u człowieka, którego onkogenne właściwości zostały potwierdzone w badaniach nad kancerogenezą [73]. MiR - 21, jedyny miRNA, w przypadku którego stwierdzono nadekspresję w prawie każdym typie guza

litego, znajduje się w nieulegającym translacji regionie 3' (UTR) genu białka błonowego wakuoli 1 (VMP1, ang. *vacuole membrane protein 1*) na chromosomie 17q23.2.3.

**Tabela 2. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - 21 [78].**

UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	hsa - miR - 21 - 5p
CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	hsa - miR - 21 - 3p

Pre - miR - 21 jest dalej przetwarzane przez kompleks RNazy III, który generuje miR - 21 - 5p (tzw. nić prowadząca) i miR - 21 - 3p (tzw. nić pasażerska), każdy o długości ~ 22 nukleotydów. MiR - 21 - 5p został szeroko przeanalizowany jako czynnik predykcyjny rozwoju raka jelita grubego. Zwiększenie jego ekspresji wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nawrotu nowotworu i gorszym rokowaniem. Istnieją także doniesienia, że podobną rolę onko - miRNA w diagnostyce raka jelita grubego można przypisać miRNA - 21 - 3p [82]. Ekspresja miR - 21 ulega zwiększeniu także w chorobach wątroby. Jego nadekspresję opisywano m.in. w grupie pacjentów z PBC (ang. *Primary Biliary Cirrhosis*), w którego przebiegu dochodzi do zniszczenia drobnych wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych, co w konsekwencji prowadzi do przewlekłej cholestazy i niewydolności narządu [83]. W cholestatycznych chorobach wątroby nadekspresja miR - 21 może wynikać ze zmian w składzie puli kwasów żółciowych w wątrobie. Kwasy żółciowe modulują ekspresję miR - 21 w hepatocytach, np. kwas deoksycholowy (DCA, ang. *Deoxycholic Acid*) hamuje ekspresję miR - 21. Jego obniżone stężenie u pacjentów ze schyłkową przewlekłą cholestazą przyczynia się do nadekspresji miR - 21, która prowadzi również do niezrównoważonej proliferacji/apoptozy komórek i upośledza homeostazę metaboliczną [84]. Coraz więcej dowodów wskazuje na ważną rolę miR - 21 w innych schorzeniach hepatologicznych takich jak wirusowe zapalenie wątroby, niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD, ang. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*), alkoholowa choroba wątroby (ALD, ang. *Alcoholic Liver Disease*) i rak wątrobowokomórkowy (HCC).

### **3.2.3. MiRNA - 199a**

MiR - 199a zlokalizowany jest na chromosomie 19p13.2. Odgrywa ważną rolę w wielu chorobach wątroby, w tym polekowym uszkodzeniu wątroby (DILI, ang. *Drug Induced Liver Injury*), NAFLD i HCC. MiR - 199a może być wykorzystany do regulacji replikacji HBV [85], oceny

postępu włóknienia wątroby. Udokumentowano również, że zmniejszenie ekspresji miR - 199a wiąże się z niekorzystnym rokowaniem dla HCC [86].

**Tabela 3. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - miR - 199a [78].**

CCCAGUGUUCAGACUACCGUUC	hsa - miR - 192 - 5p
ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	hsa - miR - 192 - 3p

MiRNA - 199a - 5p jest przebadanym i istotnym biomarkerem, który wiarygodnie odzwierciedla progresję choroby i umożliwia monitorowanie efektów leczenia [87].

### 3.2.4. MiRNA - 26b

MiRNA - 26b należy do rodziny miR - 26 i zlokalizowany jest w intronie genu *Ctdsp2* (ang. *Carboxy - terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 2*), na chromosomie 2q35. Stwierdzono, że jego ekspresja jest istotnym czynnikiem predykcyjnym rozwoju różnych nowotworów złośliwych, tj. raka jänika, prostaty, wątrobowokomórkowego. Ostatnie badania wykazały, że miR - 26b - 5p hamuje proliferację, migrację i inwazję wewnątrzwątrobowych komórek raka dróg żółciowych poprzez hamowanie *S100A7* (ang. *S100 Calcium - Binding Protein A7*) [88]. Postawiono hipotezę, że miR - 26b działa jako gen supresorowy guza uczestnicząc w regulacji apoptozy, różnicowaniu komórek, inwazjii wrażliwości na promieniowanie, prawdopodobnie poprzez wyciszanie genów docelowych [89].

**Tabela 4. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - 26b [78].**

UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	hsa - miR - 26b - 5p
CCUGUUCUCCAUAUACUUGGCU	hsa - miR - 26b - 3p

MiR - 26b znajduje się na chromosomie 2q35, regionie który często ulega delecji w HCC. W związku z powyższym podczas infekcji HBV obniżony poziom miR - 26b może odgrywać ważną rolę w indukowanym wirusem rozwoju HCC. Jednak funkcjonalna interakcja między miR - 26b a zakażeniem HBV nie została zbadana [90].

### 3.2.5. MiRNA - 34a

W ramach rodziny miR - 34 wyodrębnić możemy trzy podgrupy. MiR - 34a nie jest specyficzny dla określonej tkanki, podczas gdy ekspresja miR - 34b/c charakteryzuje się specyficznością tkankową wobec jąder, jajowodów, płuc lub mózgu.

**Tabela 5. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - 34a [78].**

UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	hsa - miR - 34a - 5p
CAAUCAGCAAGUAUACUGCCC	hsa - miR - 34a - 3p

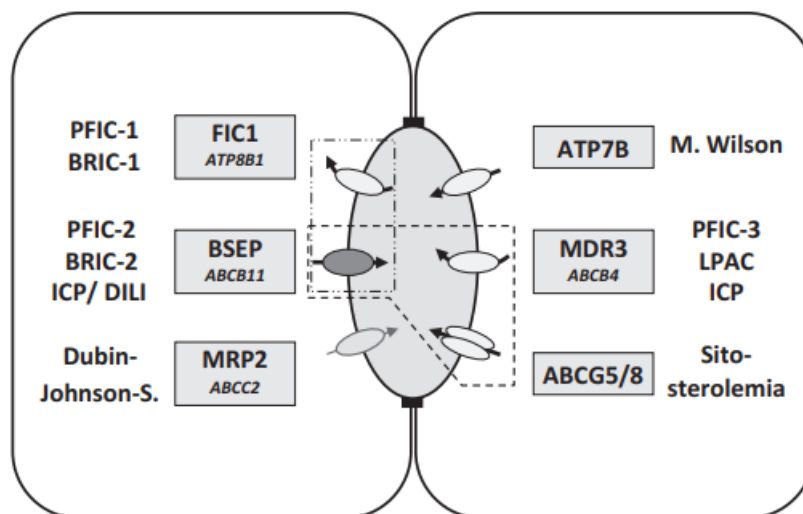
MiRNA - 34a zlokalizowany jest na chromosomie 1p36.22, reguluje metabolizm lipoprotein oraz promuje stłuszczenie wątroby i hipolipidemię w sposób zależny od receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PPAR, ang. *Peroxisome Proliferator - Activated Receptor*). Istnieje również funkcjonalny związek między nieprawidłowo podwyższonym miR - 34a a zaburzoną ekspresją rodziny cytochromu P450 i rodziny czynnika wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *Fibroblast Growth Factors*), co wskazuje na znaczenie miR - 34a w zaburzeniach metabolicznych. Z tego względu miRNA - 34a może stać się istotnym czynnikiem predykcyjnym rozwoju NAFLD [91].

## 4. TRANSPORTER BŁONOWY BSEP

### 4.1. Budowa i funkcje

Pompa eksportu soli żółciowych (BSEP) odpowiada za transport soli żółciowych z hepatocytów do kanalików żółciowych. Składa się z 1321 aminokwasów o masie cząsteczkowej ~160 kDa. Gen ABCB11 kodujący białko BSEP zlokalizowany jest na chromosomie 2q24 - 31 i składa się z 27 kodujących i 1 niekodującego eksonu [92]. Jego ekspresja uzależniona jest głównie od receptora FXR (receptor farnesoidowy X, ang. *farnesoid receptor X*), którego dysfunkcja przyczynia się do rozwoju cholestazy i miażdżycy [93]. Nieprawidłowe działanie tego transportera skutkuje postępującą rodzinną wewnątrzwątrobową cholestazą typu 2 (PFIC2, ang. *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*), łagodną nawracającą wewnątrzwątrobową cholestazą typu 2 (BRIC2, ang. *Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis 2*) oraz wewnątrzwątrobową cholestazą ciężarnych (ICP, ang. *Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy*). Chociaż BSEP prawie wyłącznie transportuje sole

żółciowe, udokumentowano wpływ wielu leków mogących działać jako inhibitory BSEP przyczyniając się do rozwoju cholestatycznego polekowego uszkodzenia [94].



**Rycina 6. Rodzaje transporterów kanalikowych i związane z nimi jednostki chorobowe [92].**

Transporter BSEP jest glikoproteiną P o aktywności ATP - azy i należy do rodziny transporterów ABC. Charakteryzuje się bardzo dużą swoistością, ponieważ przenosi tylko skoniugowane kwasy żółciowe i ulega ekspresji prawie wyłącznie w wątrobie. Stężenie kwasów żółciowych w hepatocycie ma wpływ na ilość transportera w obrębie błony komórkowej. Zmniejszenie ilości transportera BSEP prowadzi do zwiększenia liczby innych transporterów, które w warunkach fizjologicznych na powierzchni hepatocyta występują w niewielkich ilościach. Do tej grupy zalicza się białka MRP2 (ang. *multidrug resistance protein 2*, białko oporności wielolekowej 2) oraz Osta/b, które usuwają kwasy żółciowe do krążenia ogólnego [8].

#### **4.2. Mutacje genetyczne BSEP**

Udokumentowano, że polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *Single - Nucleotide Polymorphism*) wpływa na aktywność BSEP [95]. Do tej pory opisano 86 polimorfizmów w BSEP w populacji rasy białej, koreańskiej i Afroamerykanów. Wśród nich 50 zlokalizowanych jest w eksonach i intronach, a także w regionach flankujących 5' [96]. Mutacje genetyczne



w BSEP mogą powodować zmianę funkcji BSEP i późniejszą chorobę wątroby. Te mutacje powodują szereg łagodnych do ciężkich, postępujących postaci cholestazy wewnątrzwątrobowej. Ponadto cytokiny prozapalne takie jak IL - 6 i TNF -  $\alpha$  zmniejszają ekspresję białka BSEP tym samym zaburzając homeostazę kwasów żółciowych [97, 98]. Stwierdzono, że duża liczba mutacji zakłóca fałdowanie BSEP lub jego prawidłowe przemieszczanie do błony kanalikowej. Mutacje te są związane z fenotypowym spektrum autosomalnych recesywnych cholestatycznych chorób wątroby, np. mutacje E297G (c.890AG) i D482G (c.1445AG) odpowiadają za około 60% przypadków PFIC2 w populacji europejskiej. Dla BRIC 2 zidentyfikowano 7 mutacji w obrębie ABCB 11: E186G (c.557AG), E297G (c.889AG), A570T (c.1708GA), T923P (c.2767AC), A926P (c.2776GC), R10550C (c.3148CT), R1128H (c.3383GA) [99].

Do tej pory udokumentowane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP) zmniejszające ekspresję BSEP i mające wpływ na rozwój wtórnej cholestazy (np. polekowej, DILI) to m.in. c.1331T>C (p.V444A) w eksonie 13 i c.2029A>G (p.M677V) w eksonie 17, których częstotliwość przekracza 0,5% [100]. Polimorfizm c.1331 T > C (p.V444A) (SNP rs2287622) jest punktową tranżycją tyminy z pozycji 1331 na cytozynę, co w konsekwencji prowadzi do wbudowania alaniny w pozycji 444 zamiast waliny. Badania potwierdziły dla SNP rs2287622 następujące genotypy: TT (VV), CC (VA) i TC (AA) [101]. Udowodniono, że stężenia kwasów żółciowych w surowicy u nosicieli genotypu 1331CC są wyższe niż te u nosicieli genotypu 1331TT, natomiast allel 1331C występuje częściej u pacjentów z DILI i ICP niż allel 1331T [102, 103]. Osoby z niskim lub bardzo niskim poziomem BSEP mają wyższą częstotliwość allelu C niż osoby z prawidłowymi poziomami BSEP [104]. Istnieją badania kliniczne, które wykazały, że u pacjentów z cholestazą wewnątrzwątrobową lub cholestazą idiopatyczną w czasie ciąży polimorfizm V444A odpowiada za zahamowanie transportu kwasów żółciowych z hepatocytów. Inne sugerują, że polimorfizm BSEP V444A może być związany z rozwojem zakażenia HCV, progresją włóknienia wątroby i długoterminową odpowiedzią na leczenie [94, 101], jak również z polekowym uszkodzeniem wątroby [103].

## II. CEL NAUKOWY

Zasadniczym celem pracy była analiza powikłań hepatologicznych wśród dzieci zakażonych EBV ze szczególnym uwzględnieniem:

1. wysokości wirerii EBV DNA,
2. stężeń wybranych cytokin: TNF -  $\alpha$ , IL - 6, s - ICAM - 1,
3. ekspresji miRNA: miR - 122 - 5p, miR - 21 - 3p, miR - 34a - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 199a - 5p,
4. wyselekcjonowanych polimorfizmów genu ABCB11: rs11568364, rs2287622

jako możliwych czynników predykcyjnych uszkodzenia wątroby.

Zaplanowane badania miały na celu weryfikację następujących hipotez badawczych:

### HIPOTEZY

1. Wysokość wirerii EBV DNA wpływa na ryzyko wystąpienia powikłań hepatologicznych.
2. Ocena stężenia cytokin może być przydatna jako potencjalny marker prognostyczny powikłań hepatologicznych w przebiegu zakażenia wirusem Epsteina - Barr.
3. Analiza ekspresji miRNA jako nieinwazyjnych markerów molekularnych może być użyteczna w monitorowaniu powikłań hepatologicznych zakażenia EBV.
4. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP) mają wpływ na wystąpienie powikłań hepatologicznych w przebiegu zakażenia EBV.

### III. PACJENCI

Badanie przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (Uchwała Komisji Bioetycznej nr 673/2018).

Badaniem objęto 68 dzieci, w tym 36 dziewcząt i 32 chłopców w wieku od 1 do 18 roku życia hospitalizowanych od 01.12.2018 roku do 31.12.2020 roku w Oddziale Pediatrii, Chorób Infekcyjnych i Hepatologii Wojewódzkiego Szpitala Obserwacyjno - Zakaźnego (WSOZ) z potwierdzonym serologicznie i molekularnie zakażeniem wirusem Epsteina - Barr.

Grupę badaną utworzyło 54 dzieci, u których obserwowano powikłania hepatologiczne. W jej ramach wyodrębniono dwie podgrupy: ze zwiększoną aktywnością ALT i GGTP, do której zakwalifikowano 33 pacjentów (Grupa IA) oraz 21 - osobową podgrupę pacjentów ze zwiększoną aktywnością ALT i prawidłową GGTP (Grupa IB). Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 14 zakażonych EBV dzieci z prawidłową aktywnością ALT i GGTP (Grupa II). Grupę porównawczą stanowiło 13 zdrowych dzieci, u których badaniem molekularnym wykluczono obecność materiału genetycznego EBV (Grupa III).

U wszystkich dzieci przeprowadzono badanie podmiotowe, przedmiotowe. W trakcie zbierania wywiadu brano pod uwagę:

1. Wiek i płeć
2. Objawy kliniczne:
  - gorączka
  - limfadenopatia
  - ból gardła
3. Czas trwania objawów przed hospitalizacją
4. Czas hospitalizacji

U analizowanych dzieci wykonano badania laboratoryjne oceniające:

1. Miano VCA IgM i wysokość wirerii EBV DNA.
2. Aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT).
3. Aktywność gamma - glutamylotranspeptydazy (GGTP).
4. Stężenie białka C - reaktywnego (CRP).
5. Morfologię krwi obwodowej:
  - Leukocyty (limfocyty i monocyty)
6. Stężenie interleukiny - 6 (IL - 6).
7. Stężenie czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ).
8. Stężenie rozpuszczalnej cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (s - ICAM - 1).
9. Ekspresję wybranych miRNA: miR - 122 - 5p, miR - 21 - 3p, miR - 34a - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 199a - 5p. MiR - 484 i miR - 16 - 5p zostały użyte w charakterze miRNA normalizacyjnych.
10. Polimorfizm rs11568364 i rs2287622 genu ABCB11.

#### **IV. METODYKA BADAŃ**

Badania morfologii krwi obwodowej, biochemiczne i serologiczne przeprowadzono w Laboratorium WSOZ Stężenie IL - 6, TNF -  $\alpha$  i s - ICAM - 1 w surowicy, ekspresję wybranych miRNA oraz analizę SNP wykonano w wykonano w Laboratorium Zakładu Immunologii, Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Oznaczenie wirerii EBV DNA przeprowadzono w Instytucie Genetyki Sądowej w Bydgoszczy.

##### **1. Diagnostyka zakażenia EBV**

Przeciwciała przeciwko wirusowi EBV zostały wykryte za pomocą testu LIAISON® EBV IgM (DiaSorin) przy użyciu technologii chemiluminescencji immunologicznej (CLIA). Test przeprowadzono na analizatorze LIAISON® XL. Zakres oznaczenia: 10 - 160 U/mL IgM anty - EBV. Próbkę zawierające przeciwciała IgM anty - EBV w stężeniach powyżej 40 U/mL - wynik dodatni, w zakresie 20 - 40 U/mL - wynik niejednoznaczny, < 20 u/mL - ujemny.

Izolację materiału genetycznego EBV DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit. Do określenia ilościowego oznaczania wysokości

wiremii EBV DNA zastosowano metodę PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real - time PCR*) z wykorzystaniem sond TaqMan zgodnie z protokołem producenta. Poziom czułości 16 kopii/ml.

## **2. Aktywność ALT, GGTP i stężenie białka CRP w surowicy**

Aktywność ALT i GGTP oznaczono zgodnie z protokołami producenta za pomocą standardowego testu enzymatyczno - kolorymetrycznego (COBAS INTEGRA 400/800, Roche). W Tabeli 6 przedstawiono wartości referencyjne dla aktywności ALT i GGTP.

Stężenie CRP (ang. *C - Reactive Protein*) oznaczono metodą immunoturbimetryczną z użyciem mysich przeciwciał przeciw ludzkiemu CRP, zgodnie z protokołem producenta (COBAS INTEGRA 400/800, Roche). Wartość referencyjna dla CRP wynosiła poniżej 5 mg/l.

**Tabela 6. Zakresy referencyjne wybranych parametrów laboratoryjnych [105].**

<b>Parametr</b>	<b>Wiek</b>	<b>Norma (IU/l)</b>
<b>ALT</b>	1 doba	<31
	2 - 5 doba	<49
	6 doba - 6 miesiąc	<56
	7 - 12 miesiąc	<54
	1 - 3 lata	<33
	4 - 6 lat	<29
	7 - 12 lat	<39
	13 - 17 lat	<25
	Kobiety > 17 lat	<31
	Mężczyźni > 17 lat	<41
<b>GGTP</b>	1 doba	<151
	2 - 5 doba	<185
	6 doba - 6 miesiąc	<204
	7 - 12 miesiąc	<34
	1 - 3 lata	<18
	4 - 6 lat	<23
	7 - 12 lat	<17
	13 - 17 lat	<33
	Kobiety > 17 lat	<32
	Mężczyźni > 17 lat	<49

### **3. Liczba leukocytów, monocytów, limfocytów**

Próbki poddano analizie za pomocą fluorescencyjnej cytometrii przepływowej (FFC, ang. *Fluorescence Flow Cytometry*) w oparciu o analizator XS - 1000i (Sysmex, Polska). Do identyfikacji i analizy leukocytów, limfocytów i monocytów zastosowano procedurę 5DIFF. Uzyskane wyniki interpretowano w oparciu o zakresy referencyjne stosowane w laboratorium WSOZ, które opisano w Tabeli 7.

**Tabela 7. Zakres wartości referencyjnych obowiązujących w laboratorium WSOZ.**

<b>Parametr</b>	<b>Zakres referencyjny</b>	
<b>WBC (tys. /<math>\mu</math>l)</b>	0-6 lat:	4,5 - 13,0
	6-13 lat:	4,0 - 12,0
	Kobiety > 13 lat:	4,0 - 10,0
	Mężczyźni > 13 lat:	4,0 - 10,0
<b>Limfocyty (tys. /<math>\mu</math>l)</b>	0-6 lat:	1,50 - 8,00
	6-13 lat:	1,00 - 6,50
	Kobiety > 13 lat:	0,80 - 4,50
	Mężczyźni > 13 lat:	0,80 - 4,50
<b>Monocyty (tys. /<math>\mu</math>l)</b>	0-6 lat:	1,50 - 8,00
	6-13 lat:	1,00 - 6,50
	Kobiety > 13 lat:	0,80 - 4,50
	Mężczyźni > 13 lat:	0,80 - 4,50

#### **4. Analiza stężenia IL - 6 i TNF - $\alpha$ i s - ICAM - 1 w surowicy**

Ocenę stężeń IL - 6 i TNF -  $\alpha$  przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną w oparciu o komercyjny zestaw ELISA (Cusabio Biotech, USA) zgodnie z protokołem producenta przy użyciu analizatora Etimax 3000 (DiaSorin). Wartości referencyjne zarówno dla IL - 6 jak i TNF -  $\alpha$  wyniosły 7,8 pg/ml - 500 pg/ml.

Ocenę stężenia s - ICAM - 1 przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną w oparciu o komercyjny zestaw ELISA (Wuhan Fine Biotech, China) zgodnie z protokołem producenta. Badanie wykonano przy użyciu automatycznego analizatora Etimax 3000 (DiaSorin). Wartość referencyjna wyniosła 0,781 - 50 ng/ml.

#### **5. Izolacja i analiza ekspresji miRNA z krwi obwodowej**

Materiał do badań względnego profilu ekspresji miRNA stanowiły surowice krwi hospitalizowanych pacjentów. Probówki do analiz molekularnych niezwłocznie zamrażano i przechowywano w temp -80°C. Ekstrakcję miRNA przeprowadzono w oparciu o komercyjny zestaw miRNeasy Serum/Plasma Kit.

Część wyizolowanego miRNA przepisywano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano przy użyciu odczynników z zestawu TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit.

Badaniu ekspresji zostało poddanych 8 miRNA. Z pośród nich miR - 484 oraz miR - 16 - 5p zostały użyte w charakterze miRNA normalizacyjnych.

Profil miRNA poddany analizie obejmował 5 cząsteczek możliwych do detekcji w osoczu ludzkim, które mają potencjalny związek ze wzrostem biochemicznych wykładników uszkodzenia wątroby. Panel miRNA wybranych do analizy obejmował m. in. cząsteczki, które

- wykazują wpływ na replikację wirusów hepatotropowych (HBV, HCV) (miR - 122, miR - 199a)
- przyczyniają się do niezrównoważonej proliferacji/apoptozy komórek i upośledzenia homeostazy dróg żółciowych (miR - 21, miR - 26b)
- regulują geny zaangażowane w proces włóknienia (miR - 21, miR - 199a) i stłuszczenia wątroby (miR - 34a).

Analizę ekspresji przeprowadzono w oparciu o reakcję PCR w czasie rzeczywistym (real - time PCR) za pomocą zestawu TaqMan® Fast Advanced Master Mix oraz dedykowanych dla poszczególnych miRNA zestawów primerów i sond TaqMan® Advanced miRNA Assay.

## **6. Izolacja DNA z krwi obwodowej i genotypowanie**

Celem analiz genotypowania przeprowadzono izolację DNA z krwi obwodowej. Ekstrakcję genomowego DNA przeprowadzono za pomocą komercyjnego zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit. Proces ekstrakcji DNA wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Oczyszczone DNA przechowywano w temp. 4 °C do czasu dalszych analiz. Uzyskane izolaty przechowywano w temperaturze -20°C.

Ilość i czystość wyekstrahowanego DNA oceniano na podstawie pomiaru absorbancji w spektrofotometrze NanoDrop ND 2000. Stężenie DNA obliczano wykorzystując zależność: absorbancja równa 1 przy fali o długości 260 nm odpowiada 50 ng/μl DNA.

Do określenia zmienności pojedynczego nukleotydu w genie kodującym ABCB11 zastosowano metodę PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real - time PCR*) z wykorzystaniem sond TaqMan.



W niniejszym badaniu analizowano dwa polimorfizmy genu ABCB11: rs11568364 oraz rs2287622 przy pomocy komercyjnie dostępnych zestawów TaqMan® SNP Assays.

## **7. Analiza statystyczna**

Analizę statystyczną przeprowadził dr hab. n. med. Krzysztof Domagalski, prof. UMK. Wszystkie dane charakteryzujące badaną grupę pacjentów, zarówno kliniczne jak i genetyczne, poddano analizie statystycznej. Wartości badanych parametrów mierzone były jako zmienne kategoryjne i ilościowe. Zmienne kategoryjne opisano przy pomocy liczebności i odsetka (%), zaś zmienne ilościowe przy pomocy mediany i 25 oraz 75 percentyla (Q1- Q3), ze względu na brak zgodności rozkładu większości analizowanych zmiennych z rozkładem normalnym. Różnice rozkładów zmiennych kategoryjnych oceniano używając testu chi - kwadrat Pearsona lub z wykorzystaniem testu dokładnego Fishera, w przypadku grup o małej liczebności. Dla porównywania zmiennych ilościowych stosowano testy nieparametryczne dla grup niezależnych, takich jak test U Manna - Whitney' a dla dwóch grup lub test Kruskala - Wallisa, w przypadku porównywania więcej niż dwóch grup jednocześnie. Jako poziom istotności testów statystycznych przyjęto wartość  $p < 0,05$ . Wyniki analiz przedstawiono w tabelach oraz w formie rycin. Analizę statystyczną oraz ryciny wykonano za pomocą arkusza kalkulacyjnego Excel firmy Microsoft oraz programu IBM SPSS statistics (wersja 22).

## **V. WYNIKI**

### **1. Charakterystyka kliniczna pacjentów**

Charakterystykę kliniczną pacjentów z mononukleozą zakaźną analizowanych w badaniu przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka kliniczna pacjentów zakażonych EBV z powikłaniami hepatologicznymi (IA, IB) i z grupy kontrolnej (II).

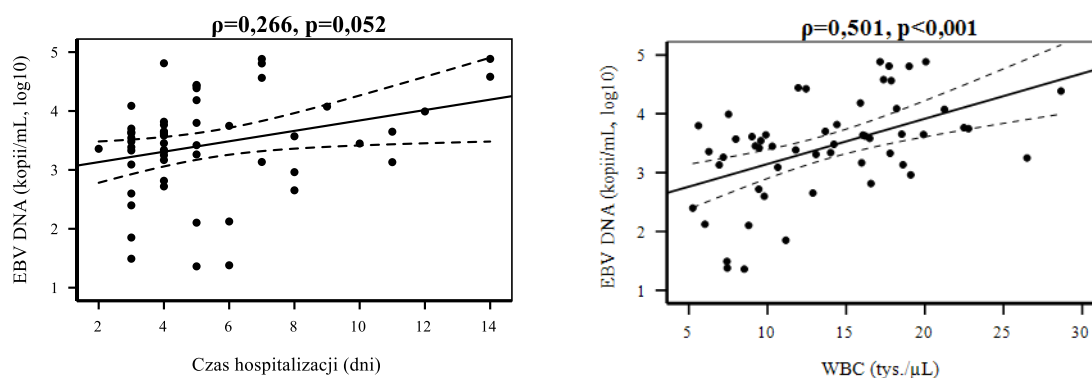
Cecha kliniczna	IA N=33		IB N=21		II N=14		IAvsII	IBvsII	
	n	%	n	%	n	%	P value	P value	
<b>Płeć</b>	K	22	67	10	48	5	36	0,05	0,486
	M	11	33	11	52	9	64		
<b>Wiek (lata)</b>	<5	2	6	0	0	3	21	0,215	0,073
	5 - 10	10	30	7	33	5	36		
	>10	21	64	14	67	6	43		
<b>Hospitalizacja (dni)</b>	<7	22	67	18	86	12	86	0,288	1,00
	=>7	11	33	3	14	2	4		
<b>Ból gardła</b>	tak	33	100	20	95	14	100	-	1,00
	nie	0	0	1	5	0	0		
<b>Gorączka</b>	tak	29	87	14	67	13	93	0,657	0,108
	nie	4	13	7	33	1	7		
<b>Limfadenopatia</b>	tak	33	100	18	86	14	100	0,702	0,259
	nie	0	0	3	14	0	0		
<b>Czas objawów (dni)</b>	<10	20	79	13	62	11	79	0,242	0,366
	=>10	13	39	8	38	3	21		

W każdej z analizowanych grup przeważały dzieci powyżej 10 roku życia, nie uzyskano jednak istotności statystycznej pomiędzy grupami z powikłaniami hepatologicznymi a grupą kontrolną. W grupie IA stwierdzono istotnie statystycznie wyższy odsetek dziewcząt niż w grupie II ( $p=0,05$ ). W zakresie pozostałych analizowanych objawów klinicznych nie wykazano istotnych statystycznie różnic.

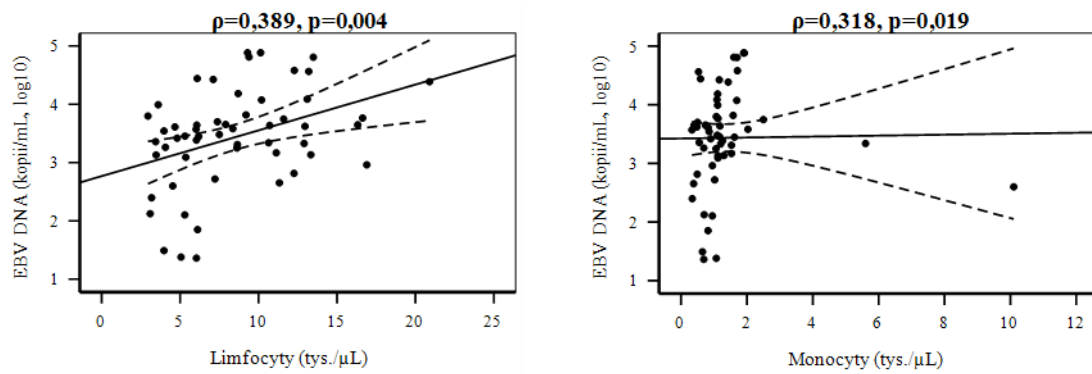
## 2. Wiremia EBV DNA a wybrane parametry laboratoryjne i czas hospitalizacji

W grupie badanej 54 dzieci z rozpoznaniem zapaleniem wątroby potwierdzono związek pomiędzy wysokością wiremii EBV DNA a czasem hospitalizacji ( $\rho=0,266$ ,  $p=0,052$ ), liczbą leukocytów ( $\rho=0,501$ ,  $p<0,001$ ), limfocytów ( $\rho=0,389$ ,  $p=0,004$ ), monocytów ( $\rho=0,318$ ,  $p=0,019$ ), stężeniem CRP ( $\rho=0,327$ ,  $p=0,016$ ) i TNF -  $\alpha$  ( $\rho=0,380$ ,  $p=0,005$ ) (Ryciny 7, 8, 9).

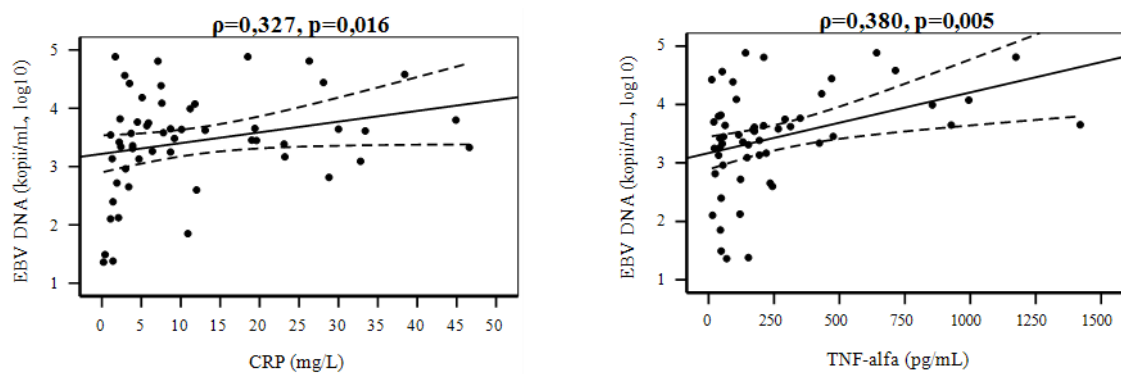
Wyższa wiremia wiązała się z wydłużeniem czasu hospitalizacji, zwiększeniem liczby leukocytów, limfocytów, monocytów, stężenia CRP i TNF -  $\alpha$ .



Rycina. 7. Korelacje pomiędzy wiremią EBV DNA, czasem hospitalizacji i liczbą leukocytów.



Rycina 8. Korelacje pomiędzy wiramią EBV DNA, liczbą limfocytów i monocytów.



Rycina 9. Korelacje pomiędzy wiramią EBV DNA, stężeniem CRP i TNF - α.

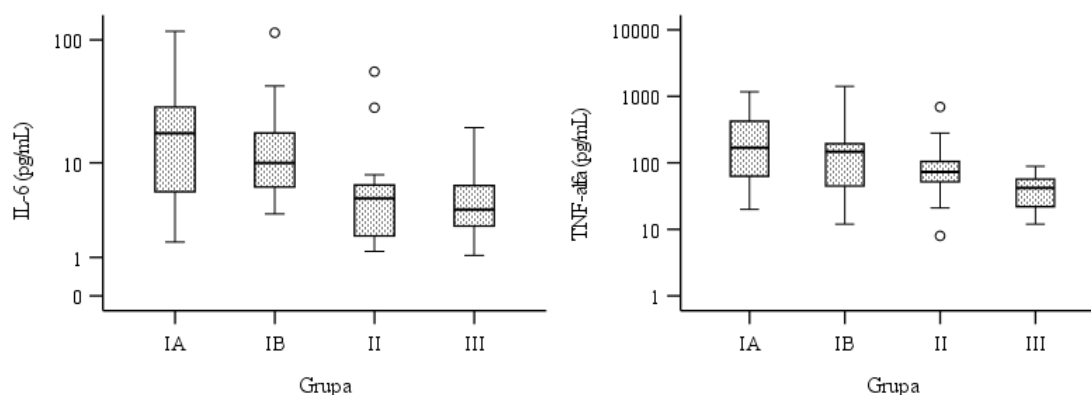
### 3. Cytokiny i wybrane parametry laboratoryjne

W wyniku przeprowadzonych analiz zaobserwowano, że stężenia IL - 6, TNF - α i s - ICAM - 1 były wyższe u dzieci zakażonych w porównaniu do pacjentów niezakażonych (odpowiednio 9,6 vs 3,7 pg/ml,  $p=0,006$ ; 121,0 vs 42,0 pg/ml,  $p=0,001$ ; 10,0 vs 5,8 ng/ml,  $p=0,074$ ) (Tabela 9).

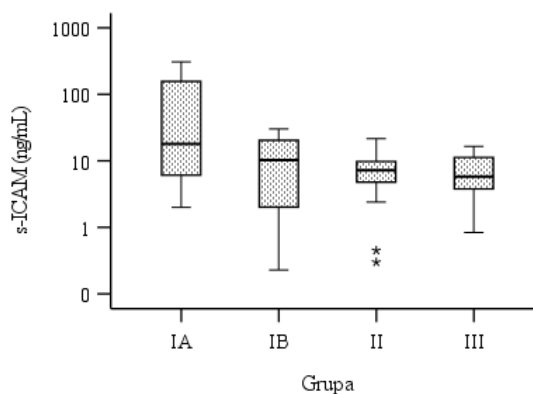
**Tabela 9. Stężenie wybranych cytokin w grupie dzieci zakażonych i niezakażonych (Grupa III) EBV.**

	Zakażeni EBV N=68	III N=13	P value
	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	
IL - 6 (pg/ml)	9,6 (4,9 - 26,5)	3,7 (2,5 - 6,3)	0,006
TNF - α (pg/ml)	121,0 (52,0 - 255,0)	42,0 (22,0 - 57,0)	0,001
s - ICAM - 1 (ng/ml)	10,0 (4,6 - 26,0)	5,8 (3,8 - 11,3)	0,074

W grupie dzieci zakażonych EBV stężenia IL - 6, TNF - α i s - ICAM - 1 były najwyższe w grupie IA a najniższe w grupie II.



**Rycina 10. Mediany stężeń IL - 6 i TNF - α dla analizowanych grup.**



**Rycina 11. Mediany stężeń s - ICAM - 1 dla poszczególnych analizowanych grup.**

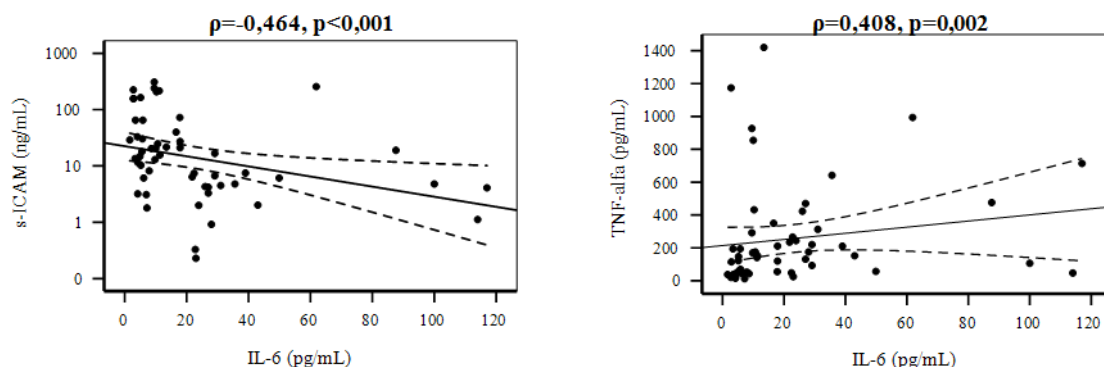
Mediany stężeń wybranych parametrów laboratoryjnych przedstawiono w Tabeli 10.

**Tabela 10. Wartości mediany (Q1-Q3) dla badanych parametrów w grupie IA (n=33), grupie IB (n=21) i grupie II (n=14).**

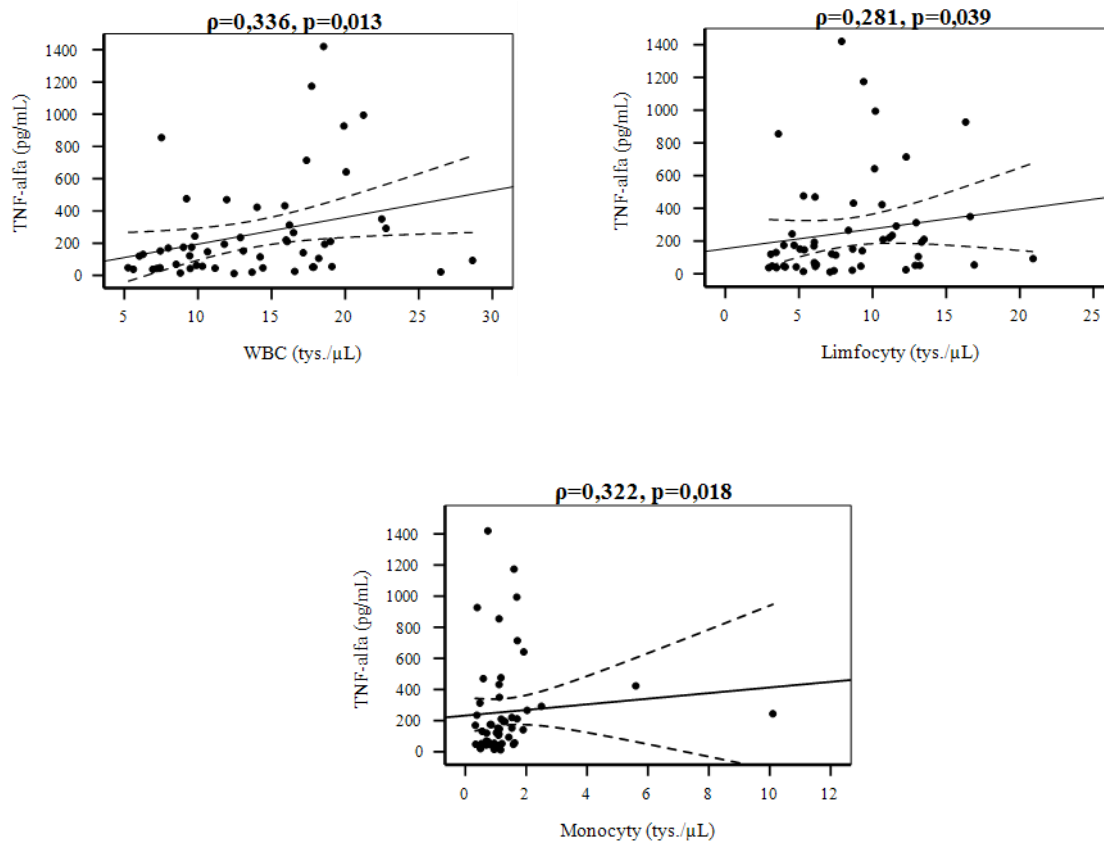
	<b>Grupa IA</b>	<b>Grupa IB</b>	<b>Grupa II</b>	<b>P value IA vs II</b>	<b>P value IB vs II</b>
<b>Wiek (lata)</b>	14,5 (6,5 - 17,0)	14,3 (8,8 - 16,5)	8,5 (5,9 - 14,5)	0,087	0,089
<b>Czas hospitalizacji (dni)</b>	5,0 (4,0 - 8,0)	4,0 (3,0 - 5,0)	5,0 (4,0 - 6,0)	0,860	0,229
<b>Czas objawów (dni)</b>	6,0 (4,0 - 11,0)	7,0 (3,0 - 10,0)	4,5 (3,0 - 8,0)	0,304	0,302
<b>EBV DNA (kopii/l)</b>	4341,0 (1778,0 - 12233,0)	2134,0 (653,0 - 4090,0)	1797,0 (1306,0 - 7670,0)	0,329	0,544
<b>EBV DNA (kopii/ml, log10)</b>	3,6 (3,2 - 4,1)	3,3 (2,8 - 3,6)	3,2 (3,1 - 3,9)	0,329	0,544
<b>ALT (IU/l)</b>	186,0 (113,0 - 345,0)	58,0 (49,0 - 85,0)	22,0 (13,0 - 26,0)	<0,001	<0,001
<b>WBC (tys./<math>\mu</math>l)</b>	15,9 (9,8 - 18,2)	11,2 (8,8 - 16,5)	11,7 (9,2 - 14,9)	0,209	0,920
<b>Limfocyty (tys./<math>\mu</math>l)</b>	9,30 (6,0 - 11,6)	6,0 (4,6 - 8,6)	6,7 (3,8 - 10,1)	0,125	0,814
<b>Monocyty (tys./<math>\mu</math>l)</b>	1,1 (0,6 - 1,6)	1,1 (0,8 - 1,3)	0,9 (0,7 - 1,3)	0,625	0,906
<b>GGTP (IU/l)</b>	93,0 (65,0 - 125,0)	21,0 (15,0 - 26,0)	11,5 (10,0 - 16,0)	<0,001	0,002
<b>CRP (mg/l)</b>	7,6 (3,7 - 18,5)	6,4 (2,1 - 19,4)	12,1 (4,9 - 19,0)	0,306	0,219
<b>IL - 6 (pg/ml)</b>	17,8 (5,5 - 29,1)	8,1 (6,1 - 17,9)	4,8 (1,9 - 6,4)	0,005	0,008
<b>TNF - <math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	170,0 (63,0 - 423,0)	147,0 (45,0 - 194,0)	74,0 (52,0 - 105,0)	0,031	0,429
<b>s - ICAM - 1 (ng/mL)</b>	18,0 (6,1 - 157,0)	10,3 (2,0 - 20,4)	7,2 (4,8 - 9,8)	0,021	0,400

Wykazano istotnie statystycznie wyższe stężenie IL - 6 w grupie IA i IB niż w II (mediana odpowiednio 17,8 vs 4,8 pg/ml,  $p=0,005$ ; 8,1 vs 4,8 pg/ml,  $p=0,008$ ) oraz istotnie statystycznie wyższe stężenia TNF -  $\alpha$  i s - ICAM - 1 w grupie IA niż II (odpowiednio 170,0 vs 74,0 pg/ml,  $p=0,031$ ; 18,0 vs 7,2 ng/ml,  $p=0,021$ ). Aktywność ALT w grupie IA i IB była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie II (odpowiednio 186,0 vs 22,0 IU/l,  $p<0,001$ ; 58,0 vs 22,0 IU/l,  $p<0,001$ ). W grupie IA i IB aktywność GGTP była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie II (mediana 93,0 vs 11,5 IU/l,  $p<0,001$ ; 21,0 vs 11,5 IU/l,  $p=0,002$ ). W grupie IB aktywność GGTP mieściła się nadal w zakresie normy dla wieku i nie była istotna klinicznie.

W grupie pacjentów z zapaleniem wątroby w przebiegu zakażenia EBV stwierdzono ujemną korelację pomiędzy stężeniem s - ICAM - 1 a IL - 6 ( $\rho=-0,464$ ,  $p<0,001$ ) oraz dodatnią zależność pomiędzy stężeniem TNF -  $\alpha$  a liczbą leukocytów ( $\rho=0,336$ ,  $p=0,013$ ), limfocytów ( $\rho=0,281$ ,  $p=0,039$ ), monocytów ( $\rho=0,322$ ,  $p=0,018$ ) i stężeniem IL - 6 ( $\rho=0,408$ ,  $p=0,002$ ) (Ryciny 12, 13). Wraz ze wzrostem stężenia s - ICAM - 1 obserwowano obniżanie stężenia IL - 6. Ze wzrostem stężenia TNF -  $\alpha$  stwierdzano zwiększanie liczby leukocytów, limfocytów, monocytów i stężenia IL - 6.



**Rycina 12. Korelacje pomiędzy stężeniem IL - 6, s - ICAM - 1 i TNF -  $\alpha$ .**

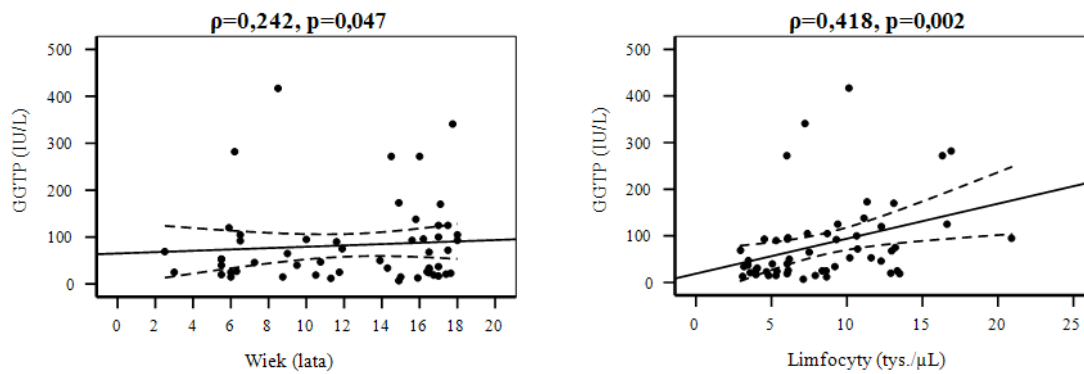


**Rycina 13. Korelacje pomiędzy stężeniem TNF -  $\alpha$ , liczbą leukocytów, limfocytów i monocytów.**

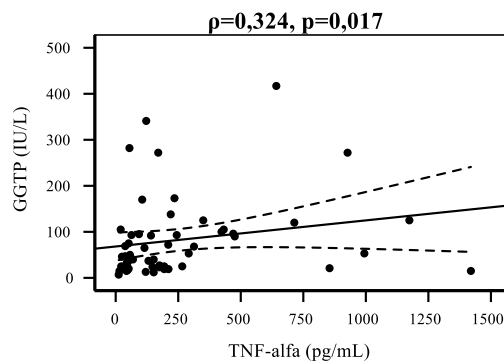
### **3.1. Analiza zależności parametrów hepatologicznych i cytokin**

W grupie dzieci z zapaleniem wątroby wykazano dodatnią korelację pomiędzy aktywnością GGTP a wiekiem dzieci ( $\rho=0,242$ ,  $p=0,047$ ), ilością limfocytów ( $\rho=0,418$ ,  $p=0,002$ ) i stężeniem TNF -  $\alpha$  ( $\rho=0,324$ ,  $p=0,017$ ) (Rycina 14, 15). Wyższą aktywność GGTP obserwowano u dzieci starszych. Wraz ze wzrostem aktywności GGTP obserwowano zwiększenie liczby limfocytów i stężenia TNF -  $\alpha$ .



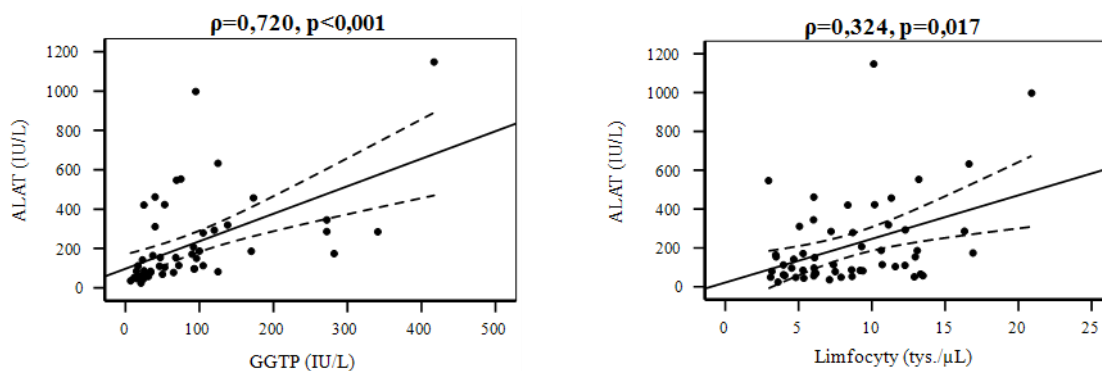


Rycina 14. Korelacje pomiędzy aktywnością GGTP, wiekiem i liczbą limfocytów.

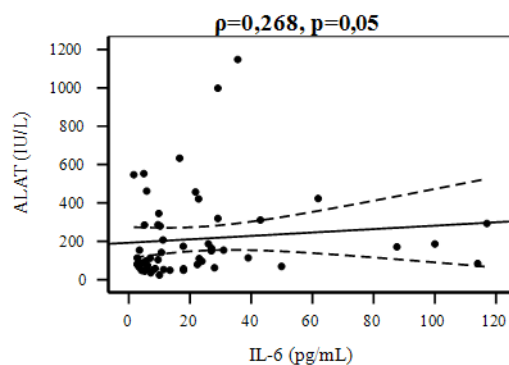


Rycina 15. Korelacja pomiędzy aktywnością GGTP a stężeniem TNF -  $\alpha$ .

Wykazano ponadto dodatnią istotną statystycznie korelację pomiędzy aktywnością ALT i GGTP ( $\rho=0,720$ ,  $p<0,001$ ), liczbą limfocytów ( $\rho=0,324$ ,  $p=0,017$ ) oraz stężeniem IL - 6 ( $\rho=0,268$ ,  $p=0,05$ ) (Rycina 16, 17). Wraz ze wzrostem aktywności ALT obserwowano zwiększenie aktywności GGTP, liczby limfocytów i stężenia IL - 6.



Rycina 16. Korelacje pomiędzy aktywnością ALT, GGTP i liczbą limfocytów



Rycina 17. Korelacja pomiędzy aktywnością ALT i stężeniem IL – 6.

#### 4. MiRNA a wybrane parametry laboratoryjne

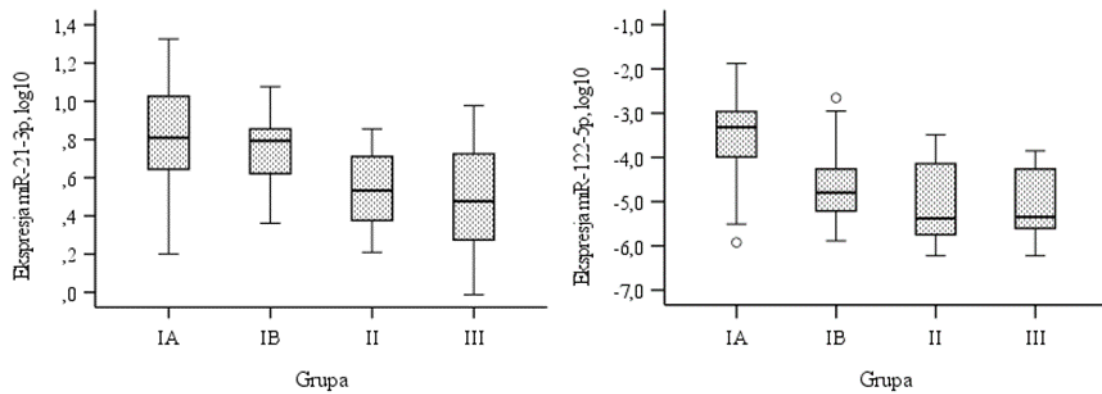
##### 4.1. Zakażenie EBV a ekspresja miRNA

W grupie pacjentów zakażonych (n=68) i niezakażonych (n=13) wirusem Epsteina - Barr przeprowadzono analizę ekspresji pięciu wybranych miRNA w osoczu. Dla czterech miRNA potwierdzono istotnie wyższą ekspresję w grupie dzieci zakażonych EBV, tj. dla miR - 21 - 3p, p=0,011 (2 - krotnie); miR - 122 - 5p, p=0,015 (14 - krotnie); miR - 26b - 5p, p=0,02 (1,5 - krotnie); miR - 34a - 5p, p=0,036 (9 - krotnie). Dla miR - 199a - 5p nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy grupami (p=0,089) (Tabela 11).

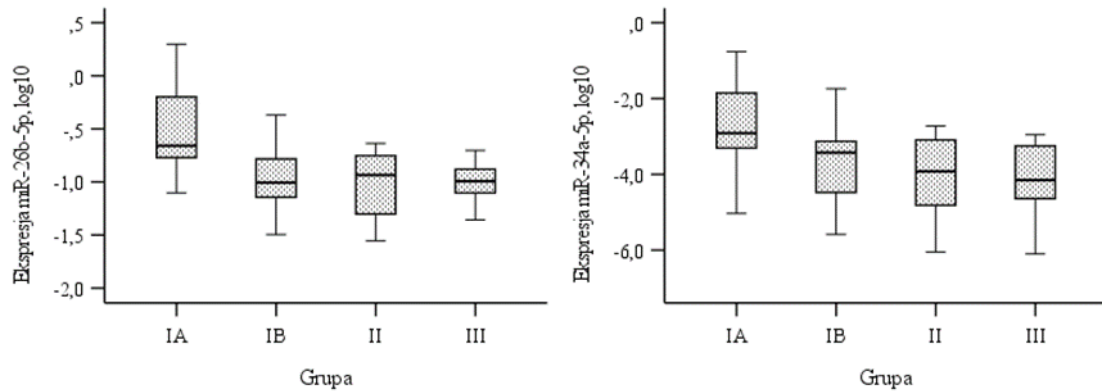
Tabela 11. Analiza ekspresji wybranych miRNA w grupie dzieci zakażonych i niezakażonych (Grupa III) EBV.

Ekspresja (log10)	Zakażeni EBV N=68	III N=13	P value
	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	
miR - 21 - 3p	0,7 (0,5 - 0,9)	0,5 (0,3 - 0,7)	0,011
miR - 122 - 5p	-4,2 (-5,2 - -3,3)	-5,3 (-5,6 - -4,3)	0,015
miR - 26b - 5p	-0,8 (-1,0 - -0,6)	-0,9 (-1,1 - -0,88)	0,021
miR - 34a - 5p	-3,2 (-4,1 - -2,7)	-4,1 (-4,6 - -3,3)	0,036
miR - 199a - 5p	-2,3 (-2,5 - -1,9)	-2,5 (-2,7 - -2,2)	0,089

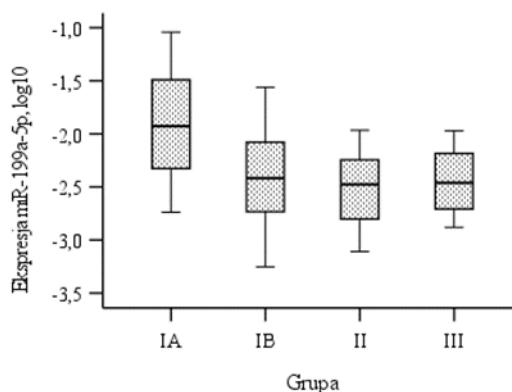
Ekspresja miR - 122 - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 34a - 5p i miR - 199a - 5p była najwyższa w grupie IA. Jednakową ekspresję miR - 21 - 3p wykazano w grupie IA i IB. Najniższą ekspresję dla miR - 26b - 5p obserwowano w grupie IB, dla pozostałych analizowanych miRNA w grupie II (Ryciny 18,19, 20).



Rycina 18. Ekspresja miR - 21 i miR - 122 dla poszczególnych analizowanych grup.



Rycina 19. Ekspresja miR - 26b i miR - 34a dla poszczególnych analizowanych grup.



**Rycina 20. Ekspresja miR - 199a dla poszczególnych analizowanych grup.**

Mediany ekspresji wybranych miRNA w grupie dzieci zakażonych EBV z obecnością i bez powikłań hepatologicznych przedstawiono w Tabeli 12. Stwierdzono istotnie zwiększoną ekspresję miR - 21 - 3p, miR - 122 - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 34a - 5p, miR - 199a - 5p u chorych z grupy IA w porównaniu do grupy II (odpowiednio  $p=0,002$ ,  $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,003$ ,  $p<0,001$ ).

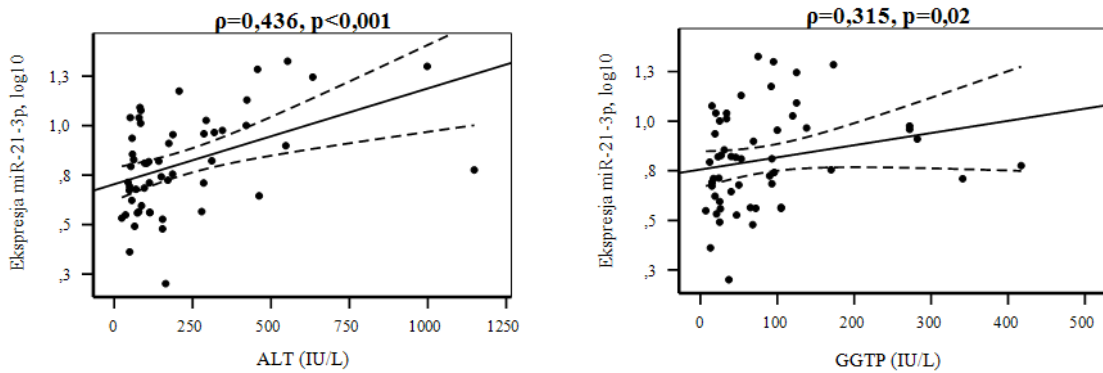
**Tabela 12. Wartości mediany (Q1 - Q3) ekspresji wybranych miRNA zakażonych EBV z powikłaniami hepatologicznymi (IA, IB) i z grupy kontrolnej (II).**

Ekspresja (log10)	Grupa IA N=33	Grupa IB N=21	Grupa II N=14	P value IAvsII	P value IBvsII
miR - 21 - 3p	0,8 (0,6 - 1,0)	0,8 (0,6 - 0,9)	0,5 (0,4 - 0,7)	0,002	0,556
miR - 122 - 5p	-3,3 (-3,9 - -2,9)	-4,8 (-5,2 - -4,26)	-5,4 (-5,7 - -4,1)	<0,001	0,047
miR - 26b - 5p	-0,7 (-0,8 - -0,2)	-1,0 (-1,1 - -0,78)	-0,9 (-1,3 - -0,7)	<0,001	0,649
miR - 34a - 5p	-2,91 (-3,3 - -1,8)	-3,42 (-4,5 - -3,1)	-3,9 (-4,8 - -3,1)	0,003	0,419
miR - 199a - 5p	-1,9 (-2,3 - -1,5)	-2,4 (-2,7 - -2,1)	-2,5 (-2,8 - -2,2)	<0,001	0,439

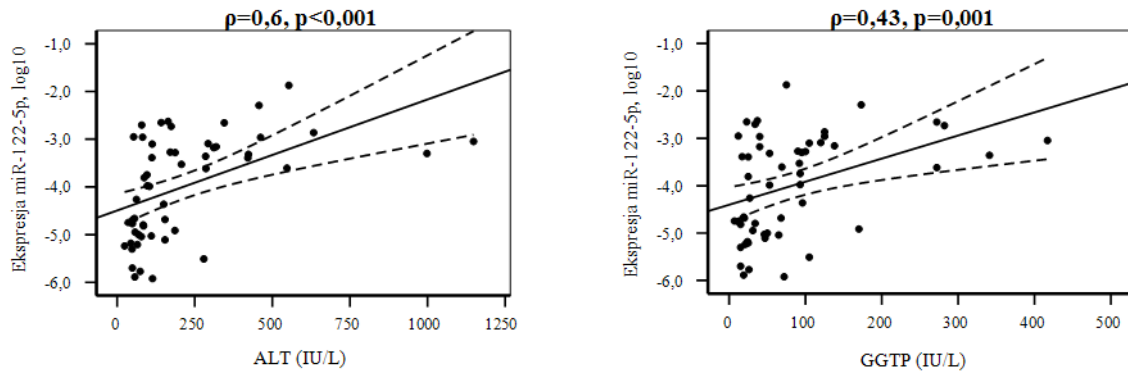
#### 4.2. Zależność ekspresji miRNA, aktywności ALT i GGTP

W grupie 54 dzieci z rozpoznaniem zapaleniem wątroby wykazano istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy analizowanymi miRNA a aktywnością ALT i GGTP: miR - 21 - 3p ( $p=0,436$ ,  $p<0,001$ ;  $p=0,315$ ,  $p=0,02$ ), miR - 122 - 5p ( $p=0,6$ ,  $p<0,001$ ;  $p=0,43$ ,  $p=0,001$ ),

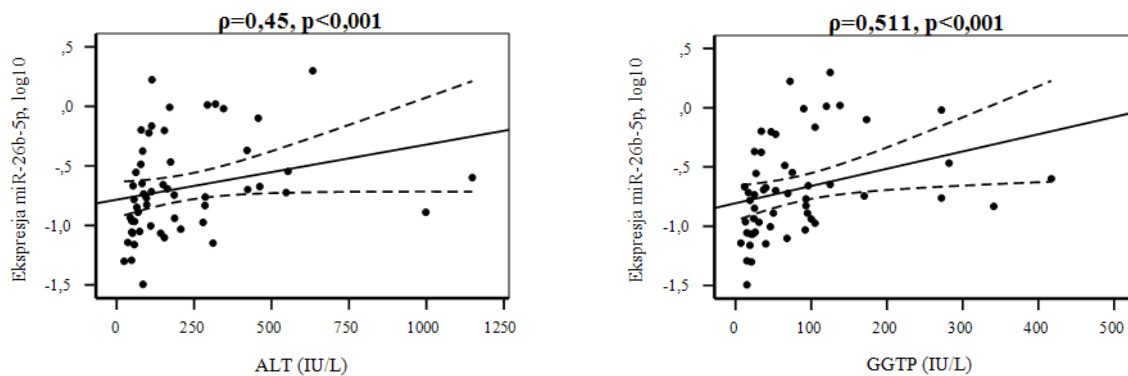
miR - 26b - 5p ( $\rho=0,45$ ,  $p<0,001$ ;  $\rho=0,511$ ,  $p<0,001$ ), miR - 34a ( $\rho=0,592$ ,  $p<0,001$ ;  $\rho=0,463$ ,  $p<0,001$ ), miR - 199a - 5p ( $\rho=0,283$ ,  $p=0,038$ ;  $\rho=0,327$ ,  $p=0,016$ ). (Rycina 21, 22, 23, 24, 25). Wraz ze zwiększeniem aktywności ALT i GGTP obserwowano wzrost ekspresji miR - 21 - 3p, miR - 122 - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 34a - 5p, miR - 199a - 5p.



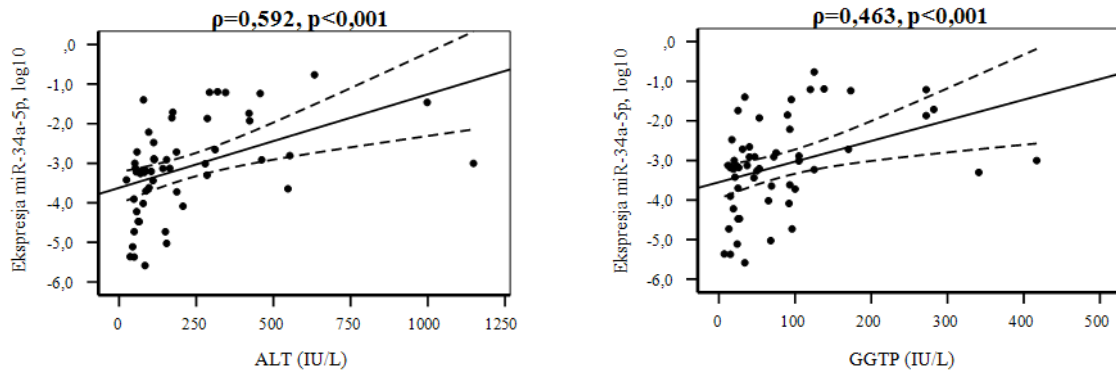
Rycina 21. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 21, aktywnością ALT i GGTP.



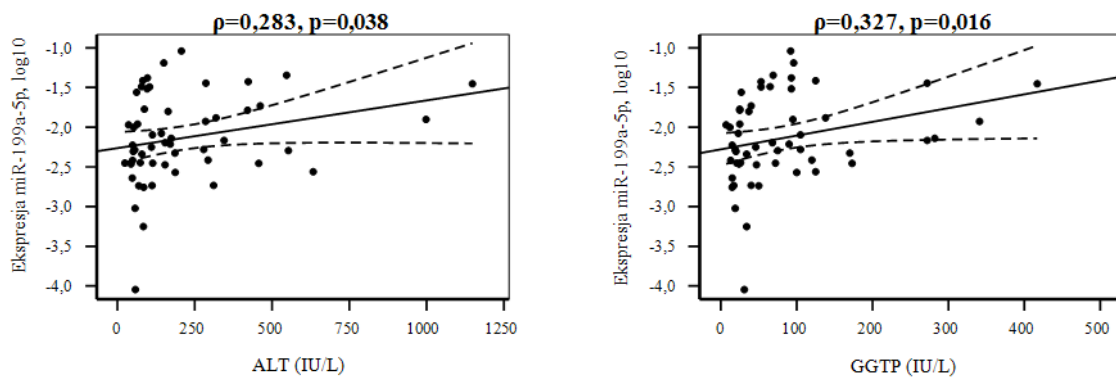
Rycina 22. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 122, aktywnością ALT i GGTP.



Rycina 23. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 26b, aktywnością ALT i GGTP.



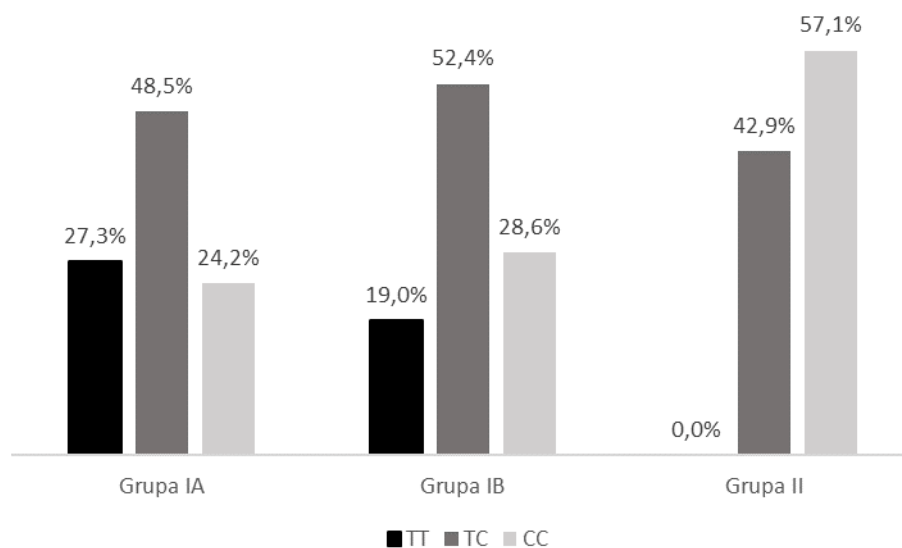
Rycina 24. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 34a, aktywnością ALT i GGTP.



Rycina 25. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 199a, aktywnością ALT i GGTP.

## 5. Rozkład genotypów i alleli dla polimorfizmu 1331T > C genu ABCB11

Na podstawie przeprowadzonego genotypowania określono rozkład alleli i genotypów w grupie IA, IB i II dla dwóch markerów genu ABCB11 o numerach referencyjnych rs11568364 i rs2287622. Dla markera rs11568364 genotyp heterozygotyczny AG uzyskano tylko u jednego pacjenta z zapaleniem wątroby i uszkodzeniem bieguna żółciowego. U pozostałych 67 poddanych analizie dzieci obserwowano wariant homozygotyczny AA. W związku z powyższym nie uwzględniono tego polimorfizmu w dalszych analizach. Dla markera rs2287622 w grupie II nie obserwowano genotypu homozygotycznego TT. W grupie IA i IB najczęściej spotykano wariant heterozygotyczny TC, w odróżnieniu do grupy II, w której najczęściej występował genotyp CC (Rycina 26).



**Rycina 26. Rozkład genotypów dla markera rs2287622.**

Znaczenie markera rs2287622 dla rozwoju powikłań hepatologicznych określono na podstawie częstości występowania alleli oraz genotypów tego markera w poszczególnych analizowanych grupach pacjentów (Tabela 13).

Tabela 13. Rozkład genotypów i alleli dla polimorfizmu 1331T > C genu ABCB11.

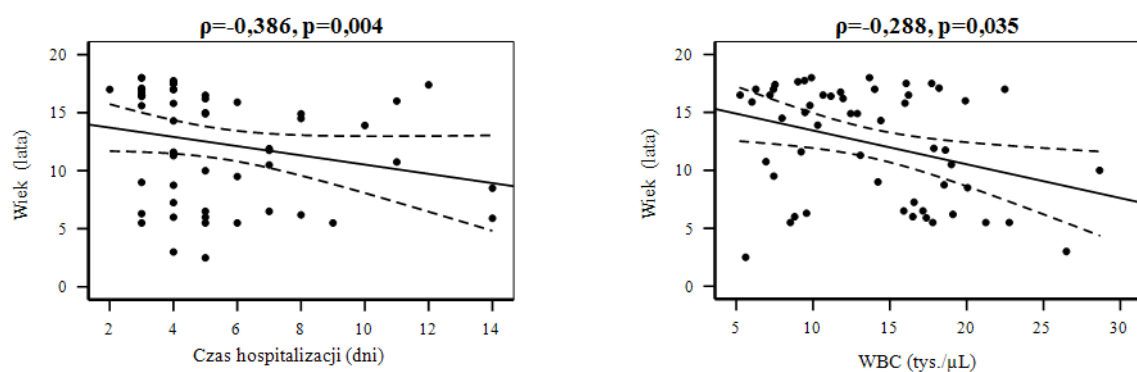
rs2287622	Grupa IA N=33 n(%)	Grupa IB N=21 n (%)	Grupa II N=14 n (%)	P value (IAvsII)	OR (95%CI)	P value (IBvsII)	OR (95%CI)
<b>Genotypy</b>							
TT	9 (27,3)	4 (19,0)	0 (0,0)	<b>0,042</b>	-	0,133	-
TC	16 (48,5)	11 (52,4)	6 (42,9)	0,724	-	0,581	-
CC	8 (24,2)	6 (28,6)	8 (57,1)	<b>0,045</b>	<b>0,24</b> <b>(0,06 - 0,90)</b>	0,159	-
łącznie	33 (100)	21 (100)	14 (100)				
<b>Allele</b>							
T	34 (51,5)	19 (45,2)	6 (21,4)	<b>0,007</b>	<b>3,89</b> <b>(1,40 - 10,84)</b>	<b>0,042</b>	<b>3,03</b> <b>(1,02 - 8,99)</b>
C	32 (48,5)	23 (54,8)	22 (78,6)				
łącznie	66 (100)	42 (100)	28 (100)				



Pacjenci posiadający genotyp TT znacznie częściej ( $p=0,042$ ) prezentowali zapalenie wątroby z uszkodzeniem bieguna żółciowego w porównaniu do pacjentów o genotypie TC lub CC. Genotyp CC około 4 - krotnie zmniejszał to ryzyko ( $OR=0,24$ ;  $95\%CI=0,06 - 0,90$ ) w porównaniu do pacjentów posiadających co najmniej jeden allel T. Dla pacjentów z zapaleniem wątroby bez współtowarzyszącego uszkodzenia bieguna żółciowego nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy genotypami w porównaniu do grupy pacjentów bez powikłań hepatologicznych. Istotne statystycznie różnice w rozkładzie alleli uzyskano zarówno dla pacjentów z grupy IA jak i IB. Obserwowany poziom istotności statystycznej w tych grupach wyniósł odpowiednio  $p=0,007$  i  $p=0,042$ . Pacjenci z grupy IA wykazują najwyższą częstość występowania allelu T markera rs2287622 w porównaniu do dzieci z grupy IB i II (odpowiednio 51,5 vs 45,2% vs 21,4%). Obliczono, że posiadanie allelu T rs2287622 zwiększa 3 - krotnie ( $OR=3,03$ ;  $95\% CI=1,020 - 8,99$ ) ryzyko zapalenia wątroby oraz blisko 4 - krotnie ( $OR=3,89$ ;  $95\%CI=1,40 - 0,84$ ) możliwość wystąpienia zapalenia wątroby z cholestazą u pacjentów zakażonych EBV.

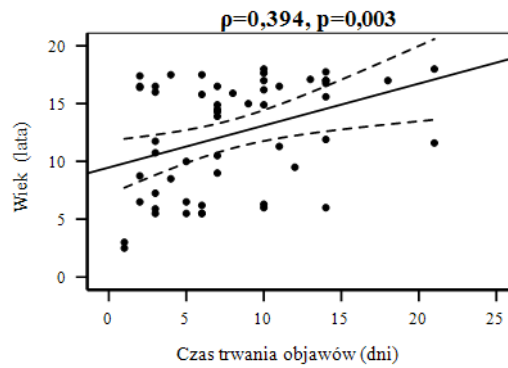
## 6. Wpływ wieku na przebieg zakażenia EBV

W analizowanej grupie pacjentów z powikłaniami hepatologicznymi wykazano ujemną korelację pomiędzy wiekiem dziecka a czasem hospitalizacji ( $\rho=-0,386$ ,  $p=0,004$ ), liczbą leukocytów ( $\rho=-0,288$ ,  $p=0,035$ ) (Rycina 27). Wykazano, że grupie najmłodszych dzieci czas hospitalizacji był najdłuższy, a liczba leukocytów najwyższa.



Rycina 27. Korelacja pomiędzy wiekiem, czasem hospitalizacji i liczbą leukocytów.

Potwierdzono także dodatnią korelację pomiędzy wiekiem dziecka a czasem trwania objawów klinicznych poprzedzających hospitalizację ( $\rho=0,394$ ,  $p=0,003$ ) (Rycina 28). Wykazano, że wraz z wiekiem wydłużał się czas zgłaszanych w warunkach ambulatoryjnych dolegliwości.



**Rycina 28. Korelacja pomiędzy wiekiem i czasem trwania objawów klinicznych poprzedzających hospitalizację.**

## VI. DYSKUSJA

Zakażenia EBV u dzieci są zwykle asymptomatyczne. Infekcja u młodzieży i dorosłych może prowadzić do rozwoju mononukleozy zakaźnej, przebiegającej najczęściej z triadą objawów: gorączką, limfadenopatią szyjną i zapaleniem gardła [17, 21]. W ostrej fazie pierwotnych zakażeń EBV często obserwuje się wzrost aktywności enzymów wątrobowych. Łagodne do umiarkowanego zwiększenie aktywności aminotransferaz dotyczy 80 - 90% pacjentów. Ciężkie cholestatyczne zapalenie wątroby występuje w zaledwie 5% przypadków [22, 30]. W przeprowadzonej analizie powikłania hepatologiczne dotyczyły 54/68 (80%) chorych. W tej grupie u 33/54 wykazano uszkodzenie bieguna żółciowego objawiającego się zwiększeniem aktywności GGTP. Czynniki predykcyjne uszkodzenia hepatocytów w przebiegu mononukleozy zakaźnej pozostają nieznane [44]. W związku z cholestatycznym uszkodzeniem wątroby dochodzi do zaburzenia transportu kwasów żółciowych. Zaburzenie ukrwienia komórek wątroby będące konsekwencją cholestazy w znaczącym stopniu przyczynia się do zahamowania aktywności białkowych transporterów żółci, czego wyrazem może być podwyższenie stężenia TNF -  $\alpha$ , IL - 1 $\beta$  oraz IL - 6 [5]. Hornef i wsp. wykazali istotnie statystycznie wyższe stężenie TNF -  $\alpha$  oraz IL - 6 u pacjentów z mononukleozą zakaźną pod wpływem stymulacji LPS (lipopolisacharyd) w porównaniu z grupą kontrolną [106]. W badaniu własnym potwierdzono, że w grupie dzieci zakażonych EBV bez powikłań hepatologicznych jak i tych z zapaleniem wątroby i współtowarzyszącym uszkodzeniem bieguna żółciowego stężenie IL - 6, TNF -  $\alpha$  jest istotnie wyższe niż u pacjentów niezakażonych EBV. Ponadto w grupie tych dzieci wykazano dodatnią korelację pomiędzy tymi parametrami. Potwierdza to tezę o aktywacji komórek śródbłonna i związanej z nią zwiększonej ekspresji cytokin prozapalnych wskutek uszkodzenia hepatocytów będącego następstwem zakażenia EBV [5, 37, 107].

Interleukina 6 wydzielana jest głównie przez komórki układu odpornościowego, czyli m.in. limfocyty B i T. Stymuluje między innymi sekrecję białek ostrej fazy w hepatocytach, wpływa na różnicowanie limfocytów B oraz na aktywację limfocytów T. W związku z powyższym wzrost ekspresji stężenia IL - 6 może przyspieszać replikację EBV i ekspansję zakażonych wirusem Epsteina - Barr limfocytów B [107, 108]. Wczesną odpowiedzią na infekcję i uszkodzenia tkanek jest reakcja ostrej fazy, charakteryzująca się gwałtownym wytwarzaniem wielu białek. Większość białek ostrej fazy jest wytwarzana w wątrobie, a głównym czynnikiem indukujących

ich syntezę jest IL - 6, która aktywuje hepatocyty. W niektórych badaniach wykazano, że IL - 6 jest bardziej odpowiednim czynnikiem rokowniczym w przypadkach ciężkiego ogólnoustrojowego stanu zapalnego u pacjentów ze współtowarzyszącymi ciężkimi zaburzeniami czynności wątroby, niż liczba leukocytów czy stężenie CRP [109]. Istnieją doniesienia, w których udowodniono, że wzrost stężenia CRP ma związek ze zwiększoną śmiertelnością u pacjentów z marskością wątroby [110, 111]. Badanie przeprowadzone przez Remmlera i wsp. wskazuje, że nie tylko stężenie CRP, ale także liczba leukocytów i stężenie IL - 6 można uznać za czynnik predykcyjny zgonu pacjenta z niewydolnością wątroby w przebiegu marskości [111]. Wskazuje on jednocześnie, że stężenie interleukiny 6 ma największe, porównywalne ze skalą MELD (ang. *Model of End - Stage Liver Disease*), znaczenie w monitorowaniu stopnia niewydolności wątroby. W badaniach własnych wykazano istotnie wyższe stężenie interleukiny 6 zarówno w grupie dzieci zakażonych EBV z zapaleniem wątroby jak i tych z uszkodzeniem hepatocytów i bieguna żółciowego. W grupie chorych z powikłaniami hepatologicznymi w przebiegu zakażenia EBV wykazano ponadto dodatnią korelację pomiędzy aktywnością ALT a stężeniem interleukiny 6. Uzyskane dane własne potwierdzają możliwość wykorzystania IL - 6 jako czynnika predykcyjnego uszkodzenia hepatocytów w przebiegu zakażenia EBV.

W przebiegu zapalenia wątroby uszkodzenie hepatocytów wynika m.in. z zaburzenia ukrwienia, do którego przyczynia się uszkodzenie endothelium. W wyniku uszkodzenia śródbłonna zachodzi nie tylko wzmożona ekspresja IL - 6, ale również TNF -  $\alpha$ . W badaniu własnym zarówno w całej grupie zakażonej EBV, jak również w podgrupie dzieci z powikłaniami hepatologicznymi w przebiegu zakażenia EBV wykazano dodatnią korelację pomiędzy wysokością wirerii EBV DNA a liczbą leukocytów, stężeniem CRP i TNF -  $\alpha$ , jak również pomiędzy stężeniem TNF -  $\alpha$  i IL - 6. Uszkodzenie endothelium prowadzi także do wzrostu adhezji leukocytów i zwiększenia sekrecji s - ICAM - 1 [112]. Znaczenie s - ICAM - 1 u pacjentów z cholestazą zewnątrz- i wewnątrzwątrobową opisano w wielu badaniach, w których potwierdzono istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem s - ICAM - 1 a aktywnością GGTP, ALP, AST czy stężeniem bilirubiny [57, 113]. Tomaszewicz i wsp. potwierdzili istotne statystycznie zwiększenie stężenia s - ICAM - 1 u pacjentów z mononukleozą zakaźną w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej [114]. W badaniu własnym nie wykazano istotnie wyższych stężeń s - ICAM - 1 w grupie pacjentów zakażonych EBV w porównaniu do niezakażonych. Potwierdzono jednak, że stężenie cząstki adhezyjnej

było najwyższe w grupie dzieci zakażonych EBV z towarzyszącym zapaleniem wątroby i uszkodzeniem bieguna żółciowego w porównaniu do pacjentów bez powikłań hepatologicznych. Uzyskane dane własne, podobnie jak badania przeprowadzone przez Hornefa i Tomasiewicza [106, 114], sugerują wpływ zakażenia wirusem Epsteina - Barr na stężenie TNF -  $\alpha$ , IL - 6 i s - ICAM - 1 oraz możliwość ich wykorzystania jako czynników predykcyjnych rozwoju powikłań hepatologicznych wśród dzieci zakażonych EBV.

Wysokość wirerii EBV DNA jest ważnym czynnikiem predykcyjnym ciężkości przebiegu zakażenia u pacjentów immunoniekompetentnych. Koreluje ze stopniem zaawansowania choroby, służy także do oceny odpowiedzi na leczenie [19, 41, 42, 43]. W grupie chorych immunokompetentnych w rutynowej diagnostyce zakażenia EBV nie zaleca się w chwili obecnej oceny wirerii EBV DNA. W badaniu własnym w grupie 54 immunokompetentnych dzieci z powikłaniami hepatologicznymi w przebiegu zakażenia EBV analizowano korelacje pomiędzy aktywnością ALT, GGTP, długością trwania objawów, wybranymi elementami układu białokrwinkowego i wysokością wirerii EBV DNA. Wykazano, że pacjenci z wyższą wirerią charakteryzują się krótszym czasem objawów poprzedzających hospitalizację, wyższą leukocytozą i limfocytozą. Nie wykazano zależności pomiędzy wysokością wirerii EBV DNA a aktywnością GGTP. Podobnie jak w badaniu przeprowadzonym przez Banko, Bauer, Pitetti i Kimurę nie potwierdzono również korelacji pomiędzy wysokością wirerii i aktywnością ALT [44, 45, 47, 115].

W badaniu własnym w grupie dzieci zakażonych EBV z zapaleniem wątroby potwierdzono że zwiększenie aktywności GGTP koreluje ze zwiększeniem liczny limfocytów i stężeniem TNF -  $\alpha$ . Obserwacje te sugerują, że ryzyko wystąpienia powikłań hepatologicznych zwiększa się wraz z narastaniem limfocytozy i stężenia TNF -  $\alpha$ . Dane te są zgodne z przedstawionym przez Shaklima - Zemera patomechanizmem cholestatycznego zapalenia wątroby [30]. Zgodnie z tą teorią EBV nie niszczy bezpośrednio komórek wątroby ani nabłonka dróg żółciowych. Zakażone wirusem limfocyty T CD8+ gromadzą się w wątrobie i aktywują prozapalne cytokiny, takie jak interferon  $\gamma$  czy czynnik martwicy nowotworu, które bezpośrednio uszkodzają hepatocyty. Ponadto w grupie 17 dzieci z cholestatycznym zapaleniem wątroby indukowanym zakażeniem EBV, analizowanych przez Shaklima - Zemera, wiek pięciu pacjentów nie przekraczał 4 lat. Ta analiza jak i badanie własne, w którym wykazano, że wśród 54 pacjentów z powikłaniami hepatologicznymi w przebiegu zakażenia EBV jedynie 2/54 chorych było < 5

roku życia, sugerują częstsze występowanie powikłań hepatologicznych mononukleozy zakaźnej w grupie dzieci starszych.

Rzadsze występowanie zaburzeń hepatologicznych w najmłodszej grupie pacjentów, w której odsetek wyników fałszywie dodatnich w zakresie oznaczanie przeciwciał heterofilnych czy swoistych skierowanych przeciwko antygenowi kapsydowemu (VCA IgM) jest najwyższy potwierdza, że oznaczanie wirerii EBV DNA może być pomocne w diagnostyce różnicowej w tej grupie wiekowej [116, 117]. Shi i wsp. w swoim badaniu podkreślali istotę oznaczania wirerii EBV DNA, zwłaszcza u pacjentów do 7 r.ż manifestujących objawy mogące sugerować jednostkę chorobową indukowaną zakażeniem EBV [118]. Istnieją doniesienia, które potwierdzają zależność między wiekiem, w którym doszło do pierwotnego EBV, ciężkością ostrej choroby i późniejszym ryzykiem raka wywołanego przez EBV lub chorób autoimmunologicznych [119]. Piroiu i wsp. sugerują, iż młodszy wiek w momencie pierwotnego zakażenia EBV wśród kenijskich niemowląt był związany z podwyższonym poziomem wirerii EBV w późniejszym okresie niemowlęcym. Dało to podstawę do wysunięcia tezy, że ta grupa dzieci była w większym stopniu narażona na rozwój endemicznego chłoniaka Burkitta [120]. W naszym badaniu nie wykazano związku pomiędzy wysokością wirerii EBV DNA a wiekiem dzieci zakażonych wirusem Epsteina - Barr z towarzyszącymi powikłaniami hepatologicznymi. Jednak potwierdzono, iż dzieci z wyższą wirerią charakteryzowały się wyższym stężeniem CRP, liczbą leukocytów i dłuższym czasem hospitalizacji. Wyniki te sugerują możliwość wykorzystywania wirerii EBV DNA do przewidywania ciężkości ostrego zakażenia EBV i selekcji pacjentów wymagających hospitalizacji.

Od czasu odkrycia, cząsteczki miRNA znajdują się w sferze zainteresowania wielu naukowców. Dotychczas u ludzi zidentyfikowano ponad 700 miRNA. Charakterystyczny profil zmian w poziomach ekspresji miRNA może być pomocny we wczesnej diagnostyce wielu różnych schorzeń m.in. hematologicznych, kardiologicznych czy hepatologicznych [121]. Mogą one wpływać na replikacje wirusów, modulować odpowiedź przeciwwirusową, a tym samym wpływać na stopień uszkodzenia wątroby. Są to cząsteczki stabilne i możliwe do oznaczenia w płynach ustrojowych, w związku z czym stanowią potencjalne źródło nieinwazyjnych markerów prognostycznych.

Wirus Epsteina - Barr jest wirusem onkogennym, mającym zdolność latencji. Koduje miRNA ukierunkowane zarówno na geny wirusowe, jak i gospodarza zaangażowane w odpowiedź immunologiczną. Obniżenie ekspresji miRNA kodowanych przez EBV zwiększa odpowiedź

cytotoksycznych limfocytów T CD8+ i CD4+ w zainfekowanych komórkach gospodarza. Ponadto EBV jest w stanie rozregulować ekspresję różnych miRNA gospodarza, które regulują procesy związane z układem immunologicznym i szlaki sygnałowe związane z odpowiedzią na zakażenie. Wśród miRNA regulowanych przez EBV są miR - 155 i miR - 21, z których oba mogą działać jako progresywne onco - miR, tj. miRNA, które predysponują komórki do transformacji. Z kolei miR - 34a w wyniku zakażenia EBV jest aktywowany przez czynnik transkrypcyjny gospodarza p53 i uczestniczy w zatrzymaniu wzrostu i apoptozie komórek [122]. Godshalk i wsp. udowodnili, że zakażenie de novo i immortalizacja pierwotnych limfocytów B powoduje zaburzenie ekspresji komórkowej miRNA [123].

W badaniu własnym nie wykazano związku pomiędzy wysokością wirerii EBV DNA a ekspresją miR - 122 - 5p. Uzyskanie wyniki potwierdzają natomiast istnienie dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją miR - 122 a aktywnością ALT i GGTP. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Rodeburg i wsp., którzy wykazali znaczny wzrost miR - 122 w surowicy pacjentów w stanie krytycznym z uszkodzeniem wątroby. Przeprowadzone analizy wykazały dodatnie korelację miR - 122 w surowicy z aktywnością AST, ALT i GGTP, natomiast nie stwierdzono korelacji między ekspresją miR - 122 a liczbą leukocytów, stężeniem CRP i interleukiny 6 [124]. W badaniach własnych w grupie z powikłaniami hepatologicznymi zakażenia EBV również nie wykazano korelacji miR - 122 ze stężeniem CRP i cytokin prozapalnych. Natomiast w grupie wszystkich dzieci zakażonych EBV stwierdzono dodatnią zależność pomiędzy stężeniem interleukiny 6 a ekspresją miR - 122. Zwiększenie aktywności ALT czy AST może być efektem uszkodzenia innych niż wątroba narządów, zwłaszcza mięśni szkieletowych, zmniejszając tym samym ich wartość diagnostyczną. Zwiększenie ekspresji miR - 122 jest bardziej specyficzne dla chorób wątroby z uwagi na syntezę w większości odbywającą się w wątrobie. W związku z powyższym uzyskane wyniki sugerują możliwość wykorzystania ekspresji miR - 122 jako swoistego dla uszkodzenia wątroby czynnika predykcyjnego.

W badaniach własnych u dzieci z powikłaniami hepatologicznymi w przebiegu zakażenia EBV obserwowano się dodatnią korelację pomiędzy ekspresją miR - 21 a aktywnością ALT i GGTP, a także pomiędzy stężeniem IL - 6 a aktywnością ALT. W grupie pacjentów zakażonych EBV z zapaleniem wątroby i uszkodzeniem bieguna żółciowego ekspresja miR - 21 była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie zakażonej EBV bez powikłań hepatologicznych. Uzyskane wyniki mogą sugerować możliwość wykorzystania zarówno stężenia IL - 6 jak i ekspresji

miR - 21 jako czynników ryzyka rozwoju powikłań hepatologicznych towarzyszących zakażeniu wirusem Epsteina - Barr.

Istnieją dowody, że miRNA - 34a - 5p może służyć jako potencjalny biomarker marskości wątroby, ponieważ jego ekspresja jest podwyższona w surowicy pacjentów z marskością wątroby i istotnie koreluje z aktywnością AST i ALT [125, 126]. Wyniki te sugerować mogą przydatność miR - 34a jako czynnika prognostycznego progresji do marskości i rozwoju HCC. W badaniu własnym zaobserwowano istotnie statystycznie wyższą ekspresję miR - 34a w grupie dzieci zakażonych EBV w porównaniu z grupą dzieci zdrowych. W grupie dzieci z zapaleniem wątroby i uszkodzeniem bieguna żółciowego ekspresja miR - 34a była istotnie podwyższona w porównaniu z dziećmi zakażonymi EBV bez powikłań hepatologicznych. Ponadto w grupie wszystkich 54 pacjentów z powikłaniami hepatologicznymi uzyskano dodatnią korelację pomiędzy aktywnością ALT i GGTP a ekspresją miR - 34a. Uzyskane dane są zbieżne z wynikami przedstawionymi w badaniu Farag i wsp. dotyczącym analizy 34 pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie stłuszczeniem wątroby oraz 28 chorych z niealkoholowym stłuszczeniowym zapaleniem wątroby. Ekspresja analizowanych miRNA była istotnie wyższa w analizowanych grupach w porównaniu z osobnikami zdrowymi. Zaobserwowano istotny statystycznie związek między aktywnością AST, ALT a ekspresją miR - 34a i miR - 122 oraz ujemną korelację ze stężeniem albumin i liczbą płytek krwi. Ponadto stwierdzono istotną dodatnią korelację między stężeniem CRP a aktywnością aminotransferaz, GGTP oraz ekspresją miR - 122 i miR - 34a [127]. Badanie Faraga i wsp. sugeruje znaczącą wartość predykcyjną oraz specyficzność miR - 34a w diagnozowaniu stłuszczenia wątroby. Zwłaszcza w połączeniu z analizą stężenia CRP i ekspresją miR - 122 czyniąc z nich panel prognostyczny o wyższej swoistości niż FIB - 4, dający możliwość uniknięcia biopsji wątroby. Użycie tych markerów w rutynowej praktyce klinicznej zwiększyłoby możliwość oceny włóknienia wątroby w warunkach ambulatoryjnych na poziomie podstawowej opieki zdrowotnej.

Dowiedziano, że ekspresja miR - 26b w HCC jest obniżona i wiąże się z gorszym rokowaniem. W badaniach własnych ekspresja miR - 26b była 1,5 - krotnie wyższa w grupie dzieci zakażonych EBV w porównaniu do osobników zdrowych. W grupie pacjentów z powikłaniami hepatologicznymi wykazano pozytywną zależność pomiędzy ekspresją miR - 26b a aktywnością ALT i GGTP, co może sugerować wpływ zwiększonej ekspresji miR - 26b na rozwój powikłań hepatologicznych u dzieci zakażonych EBV.



Murakami jak i Messner i wsp. w swoich analizach wykazali, że nadekspresja miR - 199a była istotnie związana z postępowaniem włóknienia wątroby i może być wykorzystana jako nieinwazyjny biomarker progresji włóknienia wątroby [128, 129]. Zang i wsp. w swoim badaniu wykazali istotny statystycznie wzrost ekspresji miR - 199a w przebiegu NASH [130]. Balasubramaniyan i wsp. jako pierwsi w swojej analizie wykazali wpływ miR - 199a - 5p na ekspresję ABCB11/Abcb11. Potwierdzili także, że ekspresja miR - 199a ulega zwiększeniu w zaburzeniach cholestatycznych wątroby [131]. Dai i wsp. w swoim badaniu przeanalizowali bezpośrednio wpływ miRNA na geny stresu ER (ang. *Endoplasmic Reticulum Stress*) w hepatocytach. Badanie ujawniło bezpośredni związek między miRNA a wątrobowym stresem ER i wykazało, że miR - 199a - 5p tłumił przedłużony stres ER, w ten sposób zapobiegając apoptozie hepatocytów [132]. W badaniach własnych wykazano, że ekspresja miR - 199a w grupie dzieci zakażonych EBV z powikłaniami hepatologicznymi istotnie koreluje z aktywnością ALT i GGTP. Uzyskana w badaniu zależność potwierdza znaczenie ekspresji miR - 199 w utrzymaniu homeostazy wątroby i możliwość jego wykorzystania jako nieinwazyjnego biomarkera uszkodzenia hepatocytów, a zwłaszcza współtowarzyszących powikłań cholestatycznych. Przeprowadzona analiza sugeruje możliwość wykorzystania ekspresji miR - 122 - 5p, miR - 21 - 3p, miR - 34a - 5p, miR - 26b - 3p i miR - 199a - 5p jako czynników predykcyjnych powikłań hepatologicznych wśród dzieci zakażonych EBV.

ABCB11 (pompa eksportu soli żółciowych), zaliczana do transporterów ABC jest specyficzną dla wątroby grupą białek transportowych odpowiedzialnych za eksport sprzężonych kwasów żółciowych z hepatocyta do kanalików żółciowych. Ekspresja genu BSEP jest głównie regulowana przez farnesoidowy receptor X. Ekspresja i aktywacja FXR w komórce jest kluczem do transkrypcji i aktywacji genu ABCB11. Homozygotyczne mutacje powodujące utratę funkcji genu ABCB11 powodują rozwój PFIC2 i BRIC2 [133]. Stwierdzono również, że polimorfizm jest powiązany z innymi dziedzicznymi i nabytymi formami cholestazy, takimi jak łagodna nawracająca cholestaza wewnątrzwątrobowa i cholestaza polekowa. Sugeruje to rolę tego polimorfizmu jako czynnika ryzyka dla różnych stanów cholestatycznych, które do tej pory były traktowane jako różne jednostki chorobowe. Wewnątrzwątrobowa cholestaza ciężarnych (ICP, ang. *Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy*) oraz cholestaza indukowana antykoncepcją (CIC, ang. *Oral Contraceptive - Induced Cholestasis*) to dwie nabyte formy cholestazy, które dotyczą wcześniej zdrowych, młodych kobiet. Mają charakter odwracalny, co sugeruje, że żeńskie hormony płciowe odgrywają kluczową rolę w tych postaciach cholestazy. Istnieje wiele

doniesień potwierdzających związek pomiędzy polimorfizmem ABCB11 a ICP. W przeprowadzonych badaniach własnych w grupie z uszkodzeniem bieguna żółciowego dziewczynki stanowiły istotnie statystycznie wyższy odsetek niż w grupie zakażonej EBV bez powikłań hepatologicznych. W badaniu Piątka i wsp. w grupie 96 kobiet z ICP wykazano wyższą częstotliwość homozygotycznego genotypu 1331CC. Dane te są zgodne z wynikami Meier i wsp. i wskazują, że wszystkie pacjentki z ICP i CIC były homozygotycznymi nosicielkami allelu C w pozycji 1331 [134, 103]. Najniższe stężenie kwasów żółciowych obserwowali u pacjentek z genotypem 1331TT, a najwyższe z genotypem 1331CC. Autorzy wykazali, że dysfunkcja transportera kwasów żółciowych BSEP wynikająca z obecności genotypu 1331CC ABCB11 może prowadzić do rozwoju cholestazy podczas doustnej antykoncepcji. Jak dotąd nie przeprowadzono w populacji polskich dzieci badań dotyczących związku między polimorfizmem BSEP, zakażeniem EBV i ryzykiem rozwoju powikłań hepatologicznych. Podobnych analiz nie opisano również w dostępnym piśmiennictwie anglojęzycznym. W badaniach własnych wykazano, że obecność allelu T dla markera rs2287622 zwiększa 3 - krotnie ryzyko zapalenia wątroby oraz blisko 4 - krotnie możliwość wystąpienia zapalenia wątroby z cholestazą u pacjentów zakażonych EBV. Ponadto w grupie pacjentów z zapaleniem wątroby i uszkodzeniem bieguna żółciowego w przebiegu zakażenia EBV potwierdzono przewagę homozygotycznego genotypu 1331TT. Uzyskane dane nie wiążą genotypu homozygotycznego 1333CC ze zwiększeniem częstości powikłań hepatologicznych wśród pacjentów zakażonych EBV, jednak mogą sugerować, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu markera rs2287622 prowadzący do powstania homozygotycznej mutacji zaburza funkcję genu ABCB11 prowadząc do upośledzenia funkcji transportera błonowego i tym samym przyczynia się do zwiększenia częstości powikłań hepatologicznych u chorych zakażonych wirusem Epsteina - Barr.

Ograniczeniem badania jest niewielka liczebność grupy badanej. Nieuwzględnienie w analizach markera rs11568364 wynikało ze zbyt jednorodnej grupy. U 67 poddanych analizie dzieci obserwowano bowiem wariant homozygotyczny AA. Potwierdzenie uzyskanych rezultatów będzie wymagało dalszych badań, przeprowadzonych na większej liczbie pacjentów.

## VII. WNIOSKI

1. Nie wykazano związku pomiędzy wysokością wirerii a ryzykiem rozwoju powikłań hepatologicznych.
2. Wydaje się, że wzrost stężenia IL - 6, TNF -  $\alpha$  i s - ICAM - 1 w przebiegu zakażenia EBV może wskazywać na ryzyko wystąpienia zapalenia wątroby ze współtowarzyszącym uszkodzeniem bieguna żółciowego.
3. Zwiększona ekspresja miR - 21 - 3p, miR - 122 - 5p, miR - 26b - 5, miR - 34a - 5p i miR -199a - 5p u dzieci zakażonych EBV wydaje się być czynnikiem ryzyka wystąpienia powikłań hepatologicznych przebiegających z uszkodzeniem bieguna żółciowego.
4. Polimorfizm rs2287622 genu ABCB11 wykazuje wpływ na wystąpienie powikłań hepatologicznych w przebiegu zakażenia EBV u dzieci. Obecność allelu T dla markera rs2287622 zwiększa 3 - krotnie prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia wątroby oraz blisko 4 - krotnie możliwość wystąpienia zapalenia wątroby z cholestazą.

## VIII. STRESZCZENIE

Zapalenie wątroby w przebiegu EBV charakteryzuje się najczęściej łagodnym, samoograniczającym się przebiegiem. Jednak możliwość wystąpienia również ciężkich powikłań hepatologicznych wskazuje na potrzebę określenia predyktorów uszkodzenia wątroby.

Celem pracy była analiza powikłań hepatologicznych wśród dzieci zakażonych EBV ze szczególnym uwzględnieniem stężeń wybranych cytokin: TNF -  $\alpha$ , IL - 6, s - ICAM - 1, ekspresji miR - 21 - 3p, miR - 122 - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 34a - 5p, , miR - 199a - 5p oraz wysokości wirerii EBV DNA. Ponadto analizie poddano wpływ zmienności genetycznej rs11568364 oraz rs2287622 genu ABCB11 na ryzyko wystąpienia powikłań hepatologicznych.

Badaniu poddano łącznie 68 pacjentów z potwierdzonym serologicznie i molekularnie zakażeniem EBV. W tej grupie powikłania hepatologiczne stwierdzono u 54 dzieci, które podzielono na 2 podgrupy. W pierwszej, liczącej 33 pacjentów, stwierdzono zwiększoną aktywność ALT i GGTP. Do drugiej zakwalifikowano 21 dzieci ze zwiększoną aktywnością ALT, bez uszkodzenia bieguna żółciowego. Przeprowadzone analizy wykazały istotnie statystycznie wyższe stężenie IL - 6, TNF -  $\alpha$  i s - ICAM - 1 w grupie dzieci z zapaleniem wątroby i uszkodzeniem bieguna żółciowego w porównaniu do grupy pacjentów bez powikłań hepatologicznych. Ponadto w grupie 54 dzieci z powikłaniami hepatologicznymi wykazano dodatnią istotną statystycznie korelację pomiędzy aktywnością ALT i stężeniem IL - 6 oraz pomiędzy aktywnością GGTP a stężeniem TNF -  $\alpha$ . Na podstawie badania własnego wykazano związek pomiędzy ekspresją miR - 21 - 3p, miR - 122 - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 34a - 5p i miR - 199a - 5p a obecnością powikłań hepatologicznych przebiegających z uszkodzeniem bieguna żółciowego w przebiegu zakażenia EBV. Wykazano przewagę homozygotycznego genotypu 1331TT w grupie pacjentów z zapaleniem wątroby i uszkodzeniem cholangiocytołów. Wykazano, że obecność allelu T dla markera rs2287622 zwiększa 3 - krotnie prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia wątroby oraz blisko 4 - krotnie możliwość wystąpienia zapalenia wątroby z cholestazą u pacjentów zakażonych EBV. W niniejszej pracy ustalono, że w grupie dzieci z powikłaniami hepatologicznymi w przebiegu zakażenia EBV wysokość wirerii EBV DNA wiąże się ze znamienne statystycznym wzrostem stężenia CRP, TNF -  $\alpha$ , liczby leukocytów, limfocytów i monocytów. Nie wykazano związku pomiędzy wysokością wirerii a ryzykiem rozwoju powikłań hepatologicznych.

## IX. SUMMARY

Hepatitis in the course of EBV is usually characterised by a mild, self-limiting course. However, the possibility that severe hepatological complications may also occur indicates the need to determine the predictors of liver damage.

The aim of this study was to analyse hepatological complications among children infected with EBV, with particular emphasis on the concentrations of selected cytokines: TNF -  $\alpha$ , IL - 6 and s - ICAM - 1, and expressions of miR - 21 - 3p, miR - 122 - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 34a - 5p, miR - 199a - 5p, and EBV DNA viral load. In addition, genetic variations rs11568364 and rs2287622 of the ABCB11 gene were analysed for their risk of hepatological complications.

A total of 68 patients with serologically and molecularly confirmed EBV infections were studied. In this group, hepatological complications were found in 54 children, who were divided into two subgroups. In the first subgroup, consisting of 33 patients, increased ALT and GGTP activity was found. The second subgroup included 21 children with increased ALT activity without damage to the bile pole. The conducted analyses showed a statistically significantly higher concentration of IL - 6, TNF -  $\alpha$  and s - ICAM - 1 in the group of children with hepatitis and bile pole damage compared to the group of patients without hepatological complications. Moreover, in the group of 54 children with hepatological complications, a statistically significant positive correlation was found between ALT activity and IL - 6 concentration, and between GGTP activity and TNF -  $\alpha$  concentration. Based on the present author's study, a relationship was found between the expression of miR - 21 - 3p, miR - 122 - 5p, miR - 26b - 5p, miR - 34a - 5p and miR - 199a - 5p, and the presence of hepatological complications with bile-pole damage in the course of EBV infection. The advantage of the homozygous 1331TT genotype was demonstrated in the group of patients with hepatitis and cholangiocyte damage. It has been shown that the presence of the T allele for the rs2287622 marker increases the probability of hepatitis three times and the possibility of hepatitis with cholestasis almost four times in EBV - infected patients. In this study, it was established that in a group of children with hepatological complications during EBV infection, the level of EBV DNA viral load was associated with a statistically significant increase in the concentration of CRP, TNF -  $\alpha$  and the number of leukocytes, lymphocytes and monocytes. There was no relationship between viral load and the risk of hepatological complications.

## X. PIŚMIENNICTWO

1. **Hartleb M.**, *Interpretacja badań laboratoryjnych w chorobach wątroby*. Wrocław 2019.
2. **Boyer J.** *Bile Formation and Secretion*. *Compr Psychol*, 2013; 3(3): 1035 - 1078.
3. **Chiang J.** *Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors and mechanisms*. *J Hepatol*, 2004; 40(3): 539 - 551.
4. **Kosters A., Karpen S.** *The role of inflammation in cholestasis - clinical and basic aspects*. *Semin Liver Dis*, 2010; 30(2): 186 - 194.
5. **Tanaka Y., Chen Ch., Maher J., Klaassen C.** *Kupffer cell - mediated downregulation of hepatic transporter expression in rath hepatic ischemia - reperfusion*. *Transplantation*, 2006; 27; 82(2): 258 - 266.
6. **Hebanowska A.** *Bile acid biosynthesis and its regulation*. *Postępy Hig Med Dosw*, 2010; 64: 544 - 554.
7. **Chand N., Sanyai A.** *Sepsis - induced cholestasis*. *Hepatology*, 2007; 45(1): 230 - 41.
8. **Hamilton JR., Sass - Kortsak A.** *Jaundice associated with severe bacterial infection in young Infant*, *J. Pediatr*, 1963; 63: 121 - 132.
9. **Mulder J., Karpen SJ., Tietge UJ., Kuipers F.** *Nuclear receptors: mediators and modifiers of inflammation - induced cholestasis*. *Front Biosci*, 2009;14:2599 - 2630.
10. **Dawson PA., Lan T., Rao A.** *Bile acid transporters*. *J Lipid Res*, 2009; 50(12): 2340 - 2357.
11. **Koleśnik M., Dworżańska A.** *Wirus Epsteina - Barr w wybranych chorobach nowotworowych*. *Postępy Biochemii*, 2020; 66(4): 385 - 389.
12. **Roszkowiak B., Niemir Z.** *Udział wirusa Epsteina - Barr w patogenezie tocznia rumieniowatego układuowego i chorób nerek*. *Postępy Hig Med Dosw*, 2004; 58: 390 - 397.
13. **Bocian J., Januszkiewicz - Lewandowska D.** *Zakażenia EBV - cykl życiowy, metody diagnostyki i chorobotwórczość*. *Postępy Hig Med Dosw*, 2011; 65: 286 - 298.
14. **Żuk - Wasek A.** *Charakterystyka białek wirusa Epsteina - Barr - ich udział w zakażeniu latentnym i powiązanie z procesami nowotworzenia*. *Post. Mikrobiol*, 2012;51(3): 191 - 201.
15. **Leś K., Przybylski M., Łazińska B.** *Diagnostyka laboratoryjna mononukleozy zakaźnej u chorych leczonych ambulatoryjnie*. *Postępy Nauk Medycznych*, 2015; t. XXVIII: 42 - 47.
16. **Smatti M., Al - Sadeq D., Ali N. i wsp.** *Epstein - Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP - 1 Oncogene Among Healthy Population: An Update*. *Front Oncol*, 2018; 8: 211.

17. **Cohen J.** *Epstein - Barr Virus Infection.* N Engl J Med, 2000; 343: 481 - 492.
18. **Sixbey J., Vesterinen E., Nedrud J. i wsp.** *Replication of Epstein - Barr virus in epithelial cells infected in vitro.* Nature, 1983; 306: 480 - 483.
19. **Colombini E., Guzzo I., Morolli .F i wsp.** *Viral load of EBV DNAemia is a predictor of EBV-related post-transplant lymphoproliferative disorders in pediatric renal transplant recipients.* Pediatr Nephrol, 2017; 32(8): 1433 - 1442.
20. **Yang SI., Geong JH., Kim JY.** *Clinical characteristic of primary Epstein - Barr virus hepatitis with elevation of alkaline phosphatase and  $\gamma$  - glutamyltransferase in children.* Yonsei Med J, 2014; 55(1): 107 - 112.
21. **Arya S., Saini A., El - Baba M. i wsp.** *Epstein - Barr virus-associated acute acalculous cholecystitis: a rare occurrence but favorable outcome.* Clin Pediatr, 2010; 49(8): 799 - 804.
22. **Attilakos A., Prassouli A., Hadjigeorgiou G. i wsp.** *Acute acalculous cholecystitis in children with Epstein - Barr virus infection: a role for Gilbert's syndrome?* Int J Infect Dis, 2009; 13(4): 161 - 4.
23. **Negro F.** *The paradox of Epstein - Barr virus - associated hepatitis.* J Hepatol, 2006; 44(5): 839 - 41.
24. **Kofteridis D., Koulentaki K., Valachis A. i wsp.** *Epstein - Barr Virus hepatitis.* Eur J Intern Med, 2011; 22: 73 - 76.
25. **Kimura H., Nagasaka T., Hoshino Y. i wsp.** *Severe hepatitis caused by Epstein - Barr virus without infection of hepatocyte.* Hum Pathol, 2001; 32(7): 757 - 62.
26. **Crum N.** *Epstein - Barr Virus Hepatitis: Case Series and Review.* South Med J, 2006; 99(5): 544 - 7.
27. **Yang SI., Geong JH., Kim JY.** *Clinical characteristics of Primary Epstein-Barr Virus Hepatitis with elevation of Alkaline Phosphatase and  $\gamma$  - Glutamyltransferase in Children.* Yonsei Med J, 2014; 55(1): 107 - 12.
28. **Kimura H., Cohen J.** *Chronic active Epstein - Barr virus disease.* Front Immunol, 2017; 8: 1867.
29. **Gehring A., Sun D., Bertoletti A.** *The Level of Viral Antigen Presented by Hepatocytes Influences CD8 T-Cell Function.* J Virol, 2007; 81(6): 2940 - 2949.
30. **Shaklim - Zemer V., Shahar - Nissan K., Ashkenazi - Hoffung L.** *Cholestatic Hepatitis Induced by Epstein - Barr Virus in a Pediatric Population.* Clin Pediatr, 2015; 54 (12): 1153 - 7.

31. **Kang SJ., Yoon KH., Hwang JB.** *Epstein - Barr virus infection with acute pancreatitis associated with cholestatic hepatitis.* *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2013; 16(1): 61 - 4.
32. **Kottanattu L., Lava S., Helbing R. i wsp.** *Pancreatitis and cholecystitis in primary acute symptomatic Epstein - Barr virus infection - Systematic review of literature.* *J Clin Virol*, 2016; 82:51 - 55.
33. **Gugig R., Rosenthal P.** *Fulminant hepatic failure in children.* *Future Medicine, Therapy*, 2008; 5(4): 451 - 463.
34. **Feranchak A., Tyson R., Narkewicz M. i wsp.** *Fulminant Epstein - Barr Viral hepatitis: Orthotopic Liver Transplantation and review of the Literature.* *Liver Transpl Surg*, 1998; 4(6): 469 - 76.
35. **Mazur - Melewska K., Derwich A., Mania A. i wsp.** *Epstein -Barr virus infection with acute acalculous cholecystitis in previously healthy children.* *Int J Clin Pract*, 2019; 73(9): 1 - 6.
36. **Styczyński J., Gil L., Kyrzczak - Krzemień S. i wsp.** *Strategy of management in Epstein-Barr virus infections in hematology, oncology and transplantology. Guidelines of Polish Federation of Bone Marrow Transplant Centers.* *Acta Haematologica Polonica*, 2012; 43 (1): 48 - 53.
37. **Alkhoury F., Diaz D., Hidalgo J.** *Acute acalculous cholecystitis in the pediatric population associated with Epstein - Barr Virus Infection. Case report review of the literature.* *Int J Surg Case Rep*, 2015; 11: 50 - 52.
38. **Poddighe D., Sazonov V.** *Acute acalculous cholecystitis in children.* *World J Gastroenterol*, 2018; 24(43): 4870 - 4879.
39. **Kobayashi HA., Hong KW., Lee JS.** *A case of acute cholecystitis without cholelithiasis caused by Epstein - Barr virus in a healthy young woman.* *Int J Infect Dis*, 2016; 90(3): 330 - 5.
40. **De Paschale M., Clerici P.** *Serological diagnosis of Epstein - Barr virus infection: Problems and solutions.* *World J Virol*, 2012; 1(1): 31 - 43.
41. **Kimura H., Kwong YL.** *EBV viral loads in diagnosis, monitoring, and response assessment.* *Front Oncol*, 2019; 9: 62.
42. **Kimura H., Ito Y., Suzuki R., Nishiyama Y.** *Measuring Epstein - Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV - associated disease.* *Rev Med Virol*, 2008; 18(5): 305 - 319.



43. **Tan E., Selvaratnam G., Kananathan R., Sam Ch.** *Quantification of Epstein - Barr virus DNA load, interleukin - 6, interleukin - 10, transforming growth factor - 61 and stem cel factor in plasma of patient with nasopharyngeal carcinoma.* BMC Cancer, 2006; 6(1): 227.
44. **Banko A., Lazarevic I., Stevanovic G. i wsp.** *Analysis of the variability of Epstein - Barr virus gebes in infectious mononucleosis: investigation of the potential correlation with biochemical parameters of hepatic involvement.* J Med Biochem, 2016; 35(3): 337 - 346.
45. **Bauer C., Aberle S., Popow - Kraupp T. i wsp.** *Serum Epstein - Barr virus DNA load in Primary Epstein - Barr virus infection.* J Med Virol, 2005; 75(1): 54 - 58.
46. **Yamamaoto M., Kimura H., Hironaka T. i wsp.** *Detection and Quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein - Barr virus - associated diseases.* J Clin Microbiol, 1995; 33(7): 1765 - 1768.
47. **Pitetti R., Laus S., Wadowsky R.** *Clinical evaluation of quantitative real time polymerase chain reaction assay for diagnosis of primary Epstein - Barr virus infection in children.* Pediatr Infect Dis J, 2003; 22(8): 736 - 9.
48. **Jarosz A., Nowicka G.** *Molekuly adhezyjne - potencjalny marker zmian w obrębie komórek śródbłonna sprzyjających rozwojowi miażdżycy.* Postępy Nauk Medycznych, 2001; 2: 39 - 42.
49. **Witkowska AM., Borawska MH.** *Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview.* Eur Cytokine Netw, 2004; 15(2): 91 - 8.
50. **Wilczyński J., Banasik M., Głowacka E. i wsp.** *Występowanie międzykomórkowej cząstki adhezyjnej - 1 (ICAM - 1) na powierzchni limfocytów krwi obwodowej ciężarnych z nadciśnieniem indukowanym ciążą.* Gin Pol, 2002; 73: 6.
51. **Kwiatkowski P., Godlewski J., Śliwińska - Jewsiewicka A. i wsp.** *Cząsteczki adhezyjne w procesie nowotworzenia i przrutowania.* Pol. Ann Med, 2009; 16(1): 128 - 137.
52. **Hakansson A., Gustafsson B., Krysander L. i wsp.** *Expression of ICAM - 1 during IFN - alpha - based treatment of metastatic malignant melanoma: Relation to Tumor-Infiltrating Mononuclear Cells and Regressive Tumor Changes,* Journal Interferon Cytokine Res, 1999; 19(2): 171 - 177.
53. **Hamazaki K., Gochi A., Shimamura H. i wsp.** *Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in hepatocellular carcinoma.* J Gastroenterol, 1996; 43(7): 229 - 234.

54. **Horst AK., Ito WD., Dabelstein J. i wsp.** *Carcinoembryonic antygen - related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo.* J Clin Invest, 2006; 116: 1596 - 1605.
55. **Dinarello C.** *Proinflammatory cytokines.* Chest, 2000; 118(2): 503 - 508.
56. **Zóhrens G., Armbrust T., Pirzer U. i wsp.** *Intercellular adhesion molecule -1 concentration in sera of patients with acute and chronic liver disease: relationship to disease activity and cirrhosis.* Hepatology, 1993; 18(4): 798 - 802.
57. **Thomson A., Satoh S., Nüssler A. i wsp.** *Circulating intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM - 1) in autoimmune liver disease and evidence for the production of ICAM - 1 by cytokine - stimulated human hepatocytes.* Clin Exp Immunol, 1994; 95: 83 - 90.
58. **Gulubova M.** *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in the liver of patients with extrahepatic cholestasis.* Acta Histochem, 1998; 100(1): 59 - 74 .
59. **Badowska - Kozakiewicz A.** *Biologiczna rola czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  w fizjologii i patofizjologii.* Przegląd menopauzalny, 2013;2: 136 - 141.
60. **Grabarek B., Bednarczyk M., Mazurek U.** *The characterization of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), its role in cancerogenesis and cardiovascular system diseases and possibilities of using this cytokine as a molecular marker.* Folia Biologica et Oecologica, 2017; 13: 1 - 8.
61. **Krobowicz A.** *Biology of tumor necrosis factor type alpha (TNF - alpha).* Pol Merkur Lekarski, 2006; 21: 358 - 61.
62. **Lubecka - Macura A., Kohut M.** *Nadrodzina TNF - mechanizmy działania, funkcje biologiczne i możliwości terapeutyczne.* Przegląd Gastroenterologiczny, 2010; 5(6): 303 - 309.
63. **Kontny E., Maśliński W.** *Interleukina 6 - znaczenie biologiczne i rola w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów.* Reumatologia, 2009; 1: 24 - 33.
64. **Park JY., Pillinger MH.** *Interleukin - 6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.* Bull NYU Hosp Jt Dis, 2007; 65: 4 - 10.
65. **Sewnath ME., van der Poll T., van Noorden C. i wsp.** *Cholestatic interleukin - 6 - deficient mice succumb to endotoxin - induced liver injury and pulmonary inflammation.* Am J Respir Crit Care Med, 2004; 169(3): 413 - 20.
66. **Jones SA.** *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL - 6.* J Immunol, 2005; 175: 3463 - 3468.

67. **Schmidt - Arras D., Rose - John S.** *IL - 6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy.* J Hepatol, 2016; 64: 1403 - 1415.
68. **Stachurska A., Stachurski P., Małecki M.** *MikroRNA w chorobach układu sercowo - naczyniowego.* Choroby Serca i Naczyń, 2011; 8(3): 158 - 164.
69. **Bartel DP.** *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function.* Cell, 2004; 116: 281 - 297.
70. **Calin GA., Croce CM.** *MicroRNA signatures in human cancers.* Nat Rev Cancer, 2006; 6: 857 - 866.
71. **Cullen BR.** *Viruses and microRNAs.* Nat Genet, 2006; 38: 25 - 30.
72. **Cameron J., Fewell C., Yin Q.** *Epstein - Barr virus growth/latency III program alters cellular microRNA expression.* Virology, 2008; 382(2): 257 - 66.
73. **Murakami Y., Kawada N.** *MicroRNAs in hepatic pathophysiology.* Hepatol Res, 2017; 47(1): 60 - 69.
74. **Pedersen I., Cheng G., Wieland S. i wsp.** *Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism.* Nature, 2007; 449(7164): 919 - 922.
75. **Mitchell P., Parkin R., Kroh E.** *Circulating microRNAs as stable blood - based markers for cancer detection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008; 105(30): 10513 - 8.
76. **Szeląg S., Kurzawski M.** *Rola mikroRNA w patogenezie i przebiegu chorób wątroby.* Pomeranian J Life Sci, 2016; 62(3): 5 - 15.
77. **Jopling C.** *Liver - specific microRNA - 122 Biogenesis and function.* RNA Biol, 2012; 9(2): 137 - 142 .
78. **MirBase.** [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org).
79. **Roderburg Ch., Benz F., Cardenas D. i wsp.** *Elevated miR - 122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases.* Liver Int, 2015; 35(4): 1172 - 84.
80. **Schueller F., Roy S., Vucur M. i wsp.** *The Role of miRNAs in the Pathophysiology of Liver Diseases and Toxicity.* Int J Mol Sci, 2018; 19(1): 261.
81. **Bharali D., Banerjee B, Bharadwaj M. i wsp.** *Expression Analysis of MicroRNA - 21 and MicroRNA - 122 in Hepatocellular Carcinoma.* J Clin Exp Hepatol, 2019; 9(3): 294 - 30.
82. **Jiao W., Leng X., Zhou Q. i wsp.** *Different miR - 21-3p isoforms and their different features in colorectal cancer.* Int J Cancer, 2017; 141(10): 2103 - 2111.
83. **Tan Y., Pan T., Yun Ye. i wsp.** *Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers of Primary Biliary Cirrhosis.* PLoS One, 2014; 9(10): e111424.

84. **Afonso M., Rodrigues P., Simão A. i wsp.** miRNA - 21 ablation protects against liver injury and necroptosis in cholestasis. *Cell Death Differ*, 2018; 25(5): 857 - 872.
85. **Zhang Ch., Ye B., Wei J. i wsp.** *MiR - 199a - 5p regulates rat liver regeneration and hepatocyte proliferation by targeting TNF -  $\alpha$  TNFR1/TRADD/CASPASE8/CASPASE3 signalling pathway.* *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019; 47(1): 4110 - 4118.
86. **Amr K., Ezzat W., Elhosary Y. i wsp.** *The potential role of miRNAs 21 and 199 - a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma.* *Gene*, 2016; 575(1): 66 - 70.
87. **Broermann A., Schmid R., Gabrielyan O. i wsp.** *Exosomal miRNAs as Potential Biomarkers to Monitor Phosphodiesterase 5 Inhibitor Induced Anti - Fibrotic Effects on CCl<sub>4</sub> Treated Rats.* *Int J Mol Sci*, 2020; 22(1): 382.
88. **Fan F., Lu J., Yu W. i wsp.** *MicroRNA - 26b - 5p regulates cell proliferation, invasion and metastasis in human intrahepatic cholangiocarcinoma by targeting S100A7.* *Oncol Lett*, 2018; 15(1): 386 - 392.
89. **Zhao B., Zhang J., Chen X. i wsp.** *Mir - 26b inhibits growth and resistance to paclitaxel chemotherapy by silencing the CDC6 gene in gastric cancer.* *Arch Med Sci*, 2019; 15(2): 498 - 503.
90. **Zhao F., Xu G., Zhou Y. i wsp.** *MicroRNA - 26b inhibits hepatitis B virus transcription and replication by targeting the host factor CHORDC1 protein.* *J Biol Chem*, 2014 Dec; 289(50): 35029 - 4.
91. **Liu XL., Pan Q., Zhang RN. i wsp.** *Disease - specific miR - 34a as diagnostic marker of non - alcoholic steatohepatitis in a Chinese population.* *World J Gastroenterol*, 2016; 22(44): 9844 - 9852.
92. **Kubitz R., Dröge C., Stind J. i wsp.** *The bile salt export pump (BSEP) in health and disease.* *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2012; 36(6): 536 - 53.
93. **Chen Y., Song X., Valanejad L. i wsp.** *Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid X receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma.* *Hepatology*, 2013; 57(4): 1530 - 41.
94. **Lei JH., Yang X., Xiao XQ. i wsp.** *A preliminary investigation on single nucleotide polymorphism rs2287622 of bile salt export pump gene in patients with chronic hepatitis C virus infection in Hunan, China.* *BMC Gastroenterology*, 2017; 17: 42.
95. **Soroka CJ., Boyer L.** *Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: Therapeutic implications of BSEP mutations.* *Mol Aspects Med*, 2014; 37: 3 - 14.

96. **Lam P., Soroka CJ., Boyer J.** *The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease* Semin Liver Dis, 2010; 30(2): 125 - 33.
97. **Chen Y., Song X., Valanejad L. i wsp.** *Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid X receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma.* Hepatology, 2013; 57: 1530 - 1541.
98. **Diao L., Li N., Brayman TG i wsp.** *Regulation of MRP2/ABCC2 and BSEP/ABCB11 Expression in Sandwich Cultured Human and Rat Hepatocytes Exposed to Inflammatory Cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ .* JBC, 2010; 41(8): 31185 - 31192.
99. **Sohail MI., Dönmez - Cakil Y., Szöllösi D. i wsp.** *The Bile Salt Export Pump: Molecular Structure, Study Models and Small-Molecule Drugs for the Treatment of Inherited BSEP Deficiencies.* Int J Mol Sci, 2021; 22(2): 784.
100. **Stieger B.** *Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis.* Drug Metab Rev, 2010; 42(3): 437 - 45.
101. **Lang C., Meier Y., Stieger B. i wsp.** *Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug - induced liver injury.* Pharmacogenet Genomics, 2007;17(1): 47 - 60.
102. **Kim SR., Saito Y., Itoda M. i wsp.** *Genetic variations of the ABC transporter gene ABCB11 encoding the human bile salt export pump (BSEP) in a Japanese population.* Drug Metab Pharmacokinet, 2009; 24(3): 277 - 81.
103. **Meier Y., Zodan T., Lang C. i wsp.** *Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331T>C polymorphism in the bile salt export pump.* World J Gastroenterol, 2008;14(1): 38 - 45.
104. **Byrne J., Strautnieks S., Ihrke G. i wsp.** *Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre - messenger RNA splicing.* Hepatology, 2009; 49(2): 553 - 67.
105. **Koberstein, W. Heil, B. Zawta R.** *Zakresy referencyjne dla rozważań przedanalizycznych dorosłych i dzieci.* 2002 Roche.
106. **Hornef M., Wagner H., Kruse A., Kirchner H.** *Cytokine Production in a whole - blood assay after Epstein - Barr virus infection in vivo.* Clin Diag Lab Immunol, 1995;2(2): 209 - 213.
107. **Tanner JE., Alfieri C., Chatila TA. I wsp.** *Induction of interleukin - 6 after stimulation of human B - cell CD21 by Epstein - Barr virus glycoproteins gp350 and gp220.* J Virol, 1996; 70 (1): 570 - 575.

108. **Gabay C.** *Interleukin - 6 and chronic inflammation.* Arthritis Res Ther, 2006; 8: 1 - 6.
109. **Jalan R., Saliba J., Pavesi M. i wsp.** *Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute - on-chronic liver failure.* J Hepatol, 2014; 61(5): 1038 - 47.
110. **Cervoni JP, Thévenot T., Weil D. i wsp.** *C - Reactive protein predicts short - term mortality in patients with cirrhosis.* J Hepatol, 2012; 56(6): 1299 - 304.
111. **Remmler J., Schneider Ch., Treuner - Kaueroff T. i wsp.** *Increased Level of Interleukin 6 Associates With Increased 90 - day and 1 - year Mortality in Patients With End - stage Liver Disease.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2018; 16(5): 730 - 737.
112. **Czerwiec K., Myślińska D., Wądołowska A. i wsp.** *Charakterystyka mediatorów zapalenia - rola cytokin prozapalnych.* Ann Acad Med Gedan, 2016; 46: 53 -58.
113. **Polzien F., Ramadori G.** *Increased intercellular adhesion molecule - 1 serum concentration in cholestasis.* J Hepatol, 1996; 25(6): 877 - 886.
114. **Tomasiewicz K., Modrzewska R., Łyczak A. i wsp.** *Levels of soluble intracellular adhesion molecules 1 (sICAM - 1), soluble receptors for interleukin 2 (sIL - 2R) and anti - Epstein - Barr viral capsid antigen (anti - VCA IgM) in blood serum during the course of infectious mononucleosis.* Wiadomości Lekarskie, 2001; 54: 171 - 8.
115. **Kimura H., Nishikawa K., Hoshino Y. i wsp.** *Monitoring of cel - free viral DNA in primary Epstein - Barr virus infection.* Med Microbiol Immunol, 2000; 188(4): 197 - 202.
116. **Häusler M., Scheithauer S., Ritter K. i wsp.** *Molecular diagnosis of Epstein - Barr virus.* Expert Rev Mol Diagn, 2003; 3(1): 81 - 92.
117. **Kalicki B., Maślany A., Milart J.** *Przebieg i diagnostyka zakażenia EBV u dzieci - obserwacje kliniczne.* Pediatr Med Rodz, 2001; 7(3): 247 - 252.
118. **Shi J., Ma W., Li W.** *Epidemiologic features of children with Epstein - Barr virus associated diseases in Hangzhou, China.* J Med Virol, 2020; 91(8): 1277 - 1282.
119. **Dunmirea S., Vergheseb P., Balfour JH.** *Primary Epstein - Barr virus infection.* J Clin Virol 2018; 102: 84 - 92.
120. **Piriou E., Asito A., Sumba P. i wsp.** *Early age at time of primary Epstein - Barr virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the etiology of endemic Burkitt lymphoma.* J Infect Dis, 2012; 205(6): 906 - 13.
121. **Kupczyk M., Kuna P.** *MicroRNAs - new biomarkers of respiratory tract diseases.* Pneumonol Alergol Pol, 2014; 82(2): 183 - 190.

122. **Forte E., Salinas R., Chang Ch. i wsp.** *The Epstein - Barr Virus (EBV) - Induced Tumor Suppressor MicroRNA MiR-34a Is Growth Promoting in EBV - Infected B Cells.* J Virol, 2012; 86(12): 6889 - 98.
123. **Godshalk S., Bhaduri - McIntosh S., Slack F.** *Epstein - Barr virus - mediated dysregulation of human microRNA expression.* Cell Cycle, 2008; 7(22): 3595 - 600.
124. **Roderburg Ch., Benz F., Cardenas D. i wsp.** *Elevated miR - 122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases.* Liver Int, 2015; 35(4): 1172 - 84.
125. **do Amaral AE., Rode M., Cisilotto J. i wsp.** *MicroRNA profiles in serum samples from patients with stable cirrhosis and miRNA - 21 as a predictor of transplant - free survival.* Pharmacol Res, 2018; 134: 179 - 192.
126. **Mohr R., Özdirik B., Lambrecht J. i wsp.** *From Liver Cirrhosis to Cancer: The Role of Micro - RNAs in Hepatocarcinogenesis.* Int J Mol Sci, 2021; 22(3): 1492.
127. **Farag NM., Hassanin TM., Abouelhasan M.** *Serum Mir - 34A and Mir - 122 as an early non-invasive diagnostic marker for simple steatosis and NASH in comparison to FIB - 4.* JICMR, 2022; 11(3): 1 - 6.
128. **Murakami Y., Toyoda H., Tanaka M. i wsp.** *The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR - 199 and 200 families.* PLoS One, 2011; 6(1): e16081.
129. **Messner CJ., Schmidt S., Özkul D. i wsp.** *Identification of miR - 199a - 5p, miR - 214 - 3p and miR-99b-5p as Fibrosis-Specific Extracellular Biomarkers and Promoters of HSC Activation.* Int J Mol Sci, 2021; 22(18): 9799.
130. **Zhang B., Wang R., Du J. i wsp.** *Upregulated microRNA - 199a-5p inhibits nuclear receptor corepressor 1 translation in mice with non - alcoholic steatohepatitis.* Mol Med Rep, 2014; 10(6): 3080 - 6.
131. **Balasubramaniyan N., Devereaux M., Orlicky D. i wsp.** *MiR - 199a - 5p inhibits the expression of ABCB11 in obstructive cholestasis.* J Biol Chem, 2021; 297(6): 101400.
132. **Dai BH., Geng L., Wang Y. i wsp.** *MicroRNA - 199a-5p protects hepatocytes from bile acid-induced sustained endoplasmic reticulum stress.* Cell Death Dis, 2013; 4: e604.
133. **Strautnieks S., Bull L., Knisely A. i wsp.** *A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis.* Nat Gene, 1998; 20(3): 233 - 8

134. **Piątek K., Kurzawińska G., Magiełda J. i wsp.** The role of ABC transporters' gene polymorphism in the etiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ginekol Pol*, 2018; 89(7):393 - 397.



## SPIS RYCIN

Rycina 1. Schematyczna prezentacja lokalizacji enzymów wskaźnikowych i wątrobowych białek w obrębie hepatocytu.....	8
Rycina 2. Transport kwasów żółciowych do kanalika żółciowego.....	9
Rycina 3. Schemat budowy wirusa EBV.....	10
Rycina 4. Cykl życiowy wirusa EBV u pacjentów immunokompetentnych .....	11
Rycina 5. Odpowiedź serologiczna w zakażeniu EBV .....	15
Rycina 6. Rodzaje transporterów kanalikowych i związane z nimi jednostki chorobowe .....	23
Rycina 7. Korelacje pomiędzy wiremią EBV DNA, czasem hospitalizacji i liczbą leukocytów.....	34
Rycina 8. Korelacje pomiędzy wiremią EBV DNA, liczbą limfocytów i monocytów .....	35
Rycina 9. Korelacje pomiędzy wiremią EBV DNA, stężeniem CRP i TNF - $\alpha$ .....	35
Rycina 10. Mediany stężeń IL - 6 i TNF - $\alpha$ dla analizowanych grup.....	36
Rycina 11. Mediany stężeń s - ICAM - 1 dla poszczególnych analizowanych grup .....	36
Rycina 12. Korelacje pomiędzy stężeniem IL - 6, s - ICAM - 1 i TNF - $\alpha$ .....	38
Rycina 13. Korelacje pomiędzy stężeniem TNF - $\alpha$ , liczbą leukocytów, limfocytów i monocytów .....	39
Rycina 14. Korelacje pomiędzy aktywnością GGTP, wiekiem i liczbą limfocytów.....	40
Rycina 15. Korelacja pomiędzy aktywnością GGTP a stężeniem TNF - $\alpha$ .....	40
Rycina 16. Korelacje pomiędzy aktywnością ALT, GGTP i liczbą limfocytów .....	40
Rycina 17. Korelacja pomiędzy aktywnością ALT i stężeniem IL - 6.....	41
Rycina 18. Ekspresja miR - 21 i miR - 122 dla poszczególnych analizowanych grup.....	42
Rycina 19. Ekspresja miR - 26b i miR - 34a dla poszczególnych analizowanych grup.....	42
Rycina 20. Ekspresja miR - 199a dla poszczególnych analizowanych grup .....	43
Rycina 21. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 21, aktywnością ALT i GGTP.....	44
Rycina 22. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 122, aktywnością ALT i GGTP.....	44
Rycina 23. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 26b, aktywnością ALT i GGTP.....	44
Rycina 24. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 34a, aktywnością ALT i GGTP.....	45
Rycina 25. Korelacja pomiędzy ekspresją miR - 199a, aktywnością ALT i GGTP .....	45
Rycina 26. Rozkład genotypów dla markera rs2287622 .....	46

Rycina 27. Korelacja pomiędzy wiekiem, czasem hospitalizacji i liczbą leukocytów .....	48
Rycina 28. Korelacja pomiędzy wiekiem i czasem trwania objawów klinicznych poprzedzających hospitalizację.....	49

## SPIS TABEL

Tabela 1. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - 122 .....	19
Tabela 2. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - 21 .....	20
Tabela 3. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - miR - 199a .....	21
Tabela 4. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - 26b .....	21
Tabela 5. Sekwencje genetyczne izoform miRNA - 34a .....	22
Tabela 6. Zakresy referencyjne wybranych parametrów laboratoryjnych .....	29
Tabela 7. Zakres wartości referencyjnych obowiązujących w laboratorium WSOZ .....	30
Tabela 8. Charakterystyka kliniczna pacjentów zakażonych EBV z powikłaniami hepatologicznymi (IA, IB) i z grupy kontrolnej (II).....	33
Tabela 9. Stężenie wybranych cytokin w grupie dzieci zakażonych (n=68) i niezakażonych (Grupa III, n=13) EBV .....	36
Tabela 10. Wartości mediany (Q1-Q3) dla badanych parametrów grupie IA (n=33), grupie IB (n=21) i grupie II (n=14).....	37
Tabela 11. Analiza ekspresji wybranych miRNA w grupie dzieci zakażonych i niezakażonych (Grupa III) EBV .....	41
Tabela 12. Wartości mediany (Q1 - Q3) ekspresji wybranych miRNA zakażonych EBV z powikłaniami hepatologicznymi (IA, IB) i z grupy kontrolnej (II) .....	43
Tabela 13. Rozkład genotypów i alleli dla polimorfizmu 1331T > C genu ABCB11 .....	47

**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**  
**Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy**  
**KOMISJA BIOETYCZNA**

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

**KB 673/2018**

Bydgoszcz, 30.10.2018r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

**Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy**

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **30.10.2018 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

**prof. dr hab. n. med. Małgorzata Pawłowska**  
**Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Wieków Rozwojowego**  
**Wojewódzki Szpital Obserwacyjno-Zakaźny im. Tadeusza Browicza w Bydgoszczy**

z zespołem w składzie

- **lek. med. Justyna Moppert, dr n. med. Krzysztof Domagalski,**

w sprawie badania:

**„Analiza wykładników cholestazy towarzyszącej zapaleniom wątroby u dzieci z uwzględnieniem czynników predykcyjnych jej wystąpienia (w tym zmienności genetycznej) i ryzyka chroniczacji.”**

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

**Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku**

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od ich rodziców/opiekunów prawnych osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- **UWAGA!** W przypadku małoletnich, którzy ukończyli 16 lat życia oraz młodszych małoletnich, którzy są w stanie z rozeznanem wypowiedzieć się, co do swojego udziału w badaniu obowiązuje również konieczność uzyskania świadomej zgody od nich;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby (rodziców/opiekunów prawnych), a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych. Kierownik

badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

**Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (30.10.2018 r.) do końca 2020 r.**

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

prof. dr hab. n. med. Małgorzata Pawłowska  
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Wieków Rozwojowego  
Wojewódzki Szpital Obserwacyjno-Zakaźny im. Tadeusza Browicza w Bydgoszczy  
ul. Św. Floriana 12, 85-030 Bydgoszcz

**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**  
**Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy**

**KOMISJA BIOETYCZNA**

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

**KB 673/2018**

Bydgoszcz, 24.09.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

**Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy**

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **24.09.2019 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- rozszerzenie zakresu badań o oznaczanie wirerii PCR EBV u pacjentów z zapaleniem wątroby oraz potwierdzonym serologicznie zakażeniem EBV, a także umożliwienie rozszerzenia zakresu badań o ocenę polimorfizmu genu BSEP (abcb1l), ekspresji microRNA i cytokin prozapalnych (II - 1 beta, TNF alfa, II- 6, s - ICAM 1) w surowicy wśród grupy kontrolnej.

W zakresie metodyki badań zmianie ulegnie jedynie ilość krwi niezbędnej do badań (dodatkowo 1,2 ml). Pobranie tej próbki krwi nie spowoduje zwiększonego ryzyka dla pacjenta w porównaniu do pobierania krwi do innych badań kontrolnych. Nie ulega zmianie liczebność oraz skład grupy badanej. Grupa kontrola będzie natomiast składała się z dzieci w wieku 0-18 lat hospitalizowanych w Oddziale Pediatrii, Hepatologii i Chorób Infekcyjnych Wojewódzkiego Szpitala Obserwacyjno-Zakaźnego w Bydgoszczy z przyczyn nieinfekcyjnych i będzie liczyła ok. 50 osób.

którą złożyła:

**prof. dr hab. n. med. Małgorzata Pawłowska**  
**Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Wieków Rozwojowego**  
**Wojewódzki Szpital Obserwacyjno-Zakaźny im. Tadeusza Browicza w Bydgoszczy**

w sprawie badania:

**„Analiza wykładników cholestazy towarzyszącej zapaleniom wątroby u dzieci z uwzględnieniem czynników predykcyjnych jej wystąpienia (w tym zmienności genetycznej) i ryzyka chroniczacji.”**

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 30.10.2018 r.

**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**  
**Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy**  
**KOMISJA BIOETYCZNA**

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

**KB 673/2018**

Bydgoszcz, 24.11.2020 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

**Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy**

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **24.11.2020 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- przedłużenie okresu badania do grudnia 2021 roku,
- odstępnie od oznaczania IŁ- 1 P u pacjentów poddanych analizie. Powyższa prośba jest wynikiem przeprowadzonych wstępnie oznaczeń u części pacjentów, u których uzyskane wyniki nie potwierdzały żadnej istotności statystycznej pomiędzy IŁ- 1 P a pozostałymi cytokinami, cząstką adhezyjną s-ICAM-1 i poziomem wirerii EBV DNA. Ograniczenie kosztów związanych z zakupem odczynników niezbędnych do oznaczanie IŁ- 1 p pozwoliłoby na zwiększenie puli pacjentów poddanych analizie w zakresie pozostałych interleukin (IL-6, TNF-a) i s-ICAM-1, dla których wstępne analizy są bardzo obiecujące. Użyliśmy bowiem potwierdzenie wzajemnych korelacji pomiędzy wspomnianymi cytokinami prozapalnymi i cząstką adhezyjną wśród pacjentów z zapaleniem wątroby indukowanym zakażeniem EBV. W zakresie metodyki badań ilość krwi niezbędnej do badań nie ulegnie zmianie.

którą złożyła:

**prof. dr hab. n. med. Małgorzata Pawłowska**  
**Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Wieków Rozwojowego**  
**Wojewódzki Szpital Obserwacyjno-Zakaźny im. Tadeusza Browicza w Bydgoszczy**

w sprawie badania:

**„Analiza wykładników cholestazy towarzyszącej zapaleniom wątroby u dzieci z uwzględnieniem czynników predykcyjnych jej wystąpienia (w tym zmienności genetycznej) i ryzyka chroniczacji.”**

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 30.10.2018 r.

**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**  
**Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy**  
**KOMISJA BIOETYCZNA**

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

**KB 673/2018**

Bydgoszcz, 15.06.2021 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

**Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy**

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **15.06.2021 r.** przeanalizowała prośbę o:

- zmianę metodyki badań dotyczącą badanych grup pacjentów: zmiana w zakresie analizowanych podgrup z 4 podgrup składających się z 25 pacjentów na podgrupy liczące od 15-40 pacjentów.

którą złożyła:

**prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska**  
**Katedra Chorób Zakaźnych i Hepatologii**  
**Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu**

w sprawie badania:

**„Analiza wykładników cholestazy towarzyszącej zapaleniom wątroby u dzieci z uwzględnieniem czynników predykcyjnych jej wystąpienia (w tym zmienności genetycznej) i ryzyka chroniczacji.”**

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 30.10.2018 r. oraz w ewentualnych aneksach do tejże uchwały.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2021 r.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska  
Katedra Chorób Zakaźnych i Hepatologii  
Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu



Justyna Moppert  
IV rok studiów doktoranckich  
Wydział Lekarski  
e-mail: moppertjustyna@gmail.com  
tel: 784 050 229

Bydgoszcz, 05.09.2022 r.

UNIwersYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

06.09.2022

Dziekanat Wydziału Lekarskiego

L.dz. ....

Dr hab. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK  
Przewodnicząca Rady Dyscypliny  
Nauki Medyczne  
Wydział Lekarski, Collegium Medicum  
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**dotyczy: wniosku o nr 673/2018**

Zwracam się z uprzejmą prośbą o wyrażenie zgody na zmianę tematu rozprawy doktorskiej z „Analiza wykładników cholestazy towarzyszącej zapaleniom wątroby u dzieci z uwzględnieniem czynników predykcyjnych jej wystąpienia w tym zmienności genetycznej i ryzyka chroniczacji.” na „Powikłania hepatologiczne zakażenia EBV u dzieci z uwzględnieniem czynników predykcyjnych”.

Nowy temat w sposób bardziej zwięzły określa podstawowy kierunek prowadzonych badań. W zakresie metodyki analizowane grupy jak i ilość krwi niezbędna do badań nie ulegają zmianie.

Aktualnie w toku są badania oceniające ekspresję cytokin prozapalnych (TNF alfa, IL-6, s-ICAM-1) i miRNA oraz polimorfizm genu BSEP.

Planowany czas zakończenia analiz 10.2022 r.

Wniosek o wyznaczenie promotora i promotora pomocniczego został złożony i rozpatrzony pozytywnie we wrześniu 2021 r

Proszę o pozytywne rozpatrzenie mojego wniosku.

*Proszę o pozytywne rozpatrzenie mojego wniosku*

Z wyrazami szacunku,

*Justyna Moppert*

*Proszę o pozytywne rozpatrzenie mojego wniosku*

*Zmiana tematu nastąpiła na RDNH 22.06.2022 R*