

Teresa Łoch, Agnieszka Pawińska-Zdziebłowska, Maria Halina Fic

POLIMERAZA DNA WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU B

Zakład Immunopatologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik: M. Radkowski

Praca omawia dotychczasowe wykorzystanie badania aktywności polimerazy DNA HBV i przydatność tego badania w przyszłości.

Zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) są w Polsce nadal ważnym problemem. Mimo szczepień profilaktycznych, stosowania jednorazowych strzykawek i teoretycznie prawidłowej sterylizacji sprzętu medycznego, badania epidemiologiczne wskazują, iż w Polsce żyje około 300 000 osób zakażonych HBV (1).

Uważa się, że HBV nie posiada silnych właściwości cytotatycznych, a niszczenie zakażonych hepatocytów i eliminacja zakażenia zależą od sprawności układu immunologicznego gospodarza, szczególnie od limfocytów cytotoksycznych (CD8). Zakażona komórka ulega zniszczeniu po pobudzeniu mechanizmów immunologicznych przez obecne na jej powierzchni antygeny HBcAg i HBeAg. Chociaż aktywność replikacji HBV nie jest jedynym czynnikiem kształtującym patologię wątroby, to synteza pełnych cząstek wirusowych, w czasie której dochodzi do ekspozycji tych antygenów musi mieć znaczący wpływ na niszczenie komórek zakażonej wątroby.

Uznany od lat markerem wysokiej replikacji HBV jest wykrywany w surowicy HBeAg. Jego stężenie badane w rosnących rozcieńczeniach nie może być jednak wykorzystywane do oceny poziomu replikacji, ponieważ nie zawsze koreluje z replikacją HBV.

We wczesnych latach osiemdziesiątych wprowadziliśmy do oceny replikacji HBV metodę oznaczania aktywności polimerazy DNA HBV (pDNA), wstępnie opracowaną przez Kaplana (2).

Genom HBV zbudowany jest z dwu nici DNA o różnej długości, z których tylko dłuższa tworzy zamknięte koło. Kolisty genom HBV jest zatem częściowo jednoniciowy. W pierwszej fazie replikacji polimeraza DNA HBV uzupełnia jednoniciowy odcinek DNA do pełnej dwuniciowej cząsteczki. Powstaje w ten sposób cccDNA (covalently closed circular tj. kowalecyjnie zamknięty kolisty DNA), który ma kluczowe znaczenie w replikacji HBV, jest bowiem matrycą dla syntezy mRNA. Polimeraza DNA HBV - nazywana często transkryptazą - jest enzymem wielofunkcyjnym. Na kolejnych etapach replikacji wirusa pDNA może działać jako DNA-zależna polimeraza DNA, jako RNA-zależna polimeraza DNA, jak również jako DNA-zależna polimeraza RNA, a ponadto ma aktywność RN-azy H.

Ponieważ aktywność pDNA wykazuje dodatnią korelację z syntezą pełnych cząstek HBV, badając pDNA w surowicach pacjentów można oceniać występującą u nich aktywność replikacji wirusa (3). Wykrywanie pDNA nie jest metodą o bardzo dużej czułości i dzięki niej można oceniać replikację HBV tylko przy dużej jej intensywności.

Od wielu lat poważny problem stanowi przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B (pwzwb) rozwijające się w części przypadków po ostrym objawowym zakażeniu, ale czasem również po zakażeniu bezobjawowym. U większości pacjentów z pwzwb poza antygenem HBs wykrywalne są także inne markery serologiczne HBV - przeciwciała anti-HBc oraz HBeAg lub przeciwciała anti-HBe. U niektórych pacjentów z pwzwb różnie długo może występować „okno” serologiczne układu HBe. W tym czasie HBeAg i swoiste przeciwciała są niewykrywalne rutynowo dostępnymi (diagnostycznymi) metodami, ponieważ wszystkie cząsteczki tego układu obecne w krążeniu związane są w kompleksy immunologiczne.

Pod koniec lat siedemdziesiątych rozpoczęto próby leczenia pacjentów z pwzwb lekami immunostymulacyjnymi i immunozastępczymi. Leczeni byli przede wszystkim pacjenci z aktywnym pwzwb, u których wykrywano w surowicy HBeAg i bardzo często wysoką aktywność pDNA. Badanie pDNA w surowicach pacjentów kwalifikowanych do leczenia dawało możliwość lepszej oceny skuteczności stosowanego leku, niewykrycie pDNA w badaniach wyjściowych sugerowało bowiem możliwość wystąpienia samostnej serokonwersji w układzie HBe niezależnie od stosowanego leczenia.

Oznaczanie aktywności pDNA ułatwiło ocenę prób leczenia pwzwb izoprinozyną u dorosłych (4, 5) i u dzieci (6, 7) oraz krótkotrwałej terapii sterydami u dorosłych (8, 9). Następnie badanie to umożliwiło śledzenie postępów leczenia interferonem alfa u dorosłych (10) i u dzieci (11, 12) oraz kuracji lamiwudyną u dorosłych (13). Oznaczanie pDNA pomogło także w trudnych próbach leczenia interferonem dzieci zakażonych HBV z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego i z chłoniakami (14, 15).

Aktywność pDNA oznaczano najczęściej przed rozpoczęciem kuracji, w jej trakcie oraz po zakończeniu. W przypadkach efektywnej terapii aktywność pDNA obniżała się znacznie już w czasie leczenia, po czym spadała nadal do ilości niewykrywalnych stosowaną metodą - wyprzedzając serokonwersję układu HBe, a często także spadek stężenia transaminaz oraz poprawę obrazu morfologicznego wątroby. Czasem w trakcie stosowania leku immunosupresyjnego można było zaobserwować wzrost aktywności pDNA, co wiązało się ze wzrostem aktywności replikacji HBV. W innych przypadkach aktywność pDNA pojawiała się ponownie po odstawieniu leku co wskazywało, że poprawa była krótkotrwała i przejściowa.

Wielu pacjentów zakażonych przewlekłe HBV nie ma w surowicy wykrywalnego HBeAg, ma natomiast przeciwciała anti-HBe. Obecność anti-HBe w surowicy może towarzyszyć diametralnie różnym zmianom morfologii wątroby (od *hepatitis minimalis* do *cirrhosis*) przy bardzo różnej intensywności replikacji HBV.

Długotrwała obecność anti-HBe w surowicy u pacjentów z pwzwb może sugerować zakażenie wirusem posiadającym mutację w regionie poprzedzającym gen kodujący białko rdzeniowe (region *pre-core*). Jest to mutacja punktowa, która powoduje brak syntezy HBeAg. Taki mutant HBV, częsty w basenie Morza Śródziemnego, Azji i Afryce, w Polsce - według nie publikowanych jeszcze badań - występuje bardzo rzadko.

Można przypuszczać, że w Polsce znaczna większość osób z anty-HBe w surowicy ma niewielką aktywność syntezy wirusa, niższą niż ci pacjenci, u których wykrywa się HBeAg. Dlatego też aktywność pDNA jest w tych przypadkach poniżej progu wykrywalności metody i otrzymujemy wyniki ujemne.

Jeżeli u pacjenta występuje zakażenie mutantem *pre-core* HBV replikacja wirusa jest zazwyczaj na tyle aktywna, że można ją wykryć oznaczając pDNA. W naszych badaniach częstość wykrywania w surowicy pDNA u osób z anty-HBe nie przekraczała 3% (1), co wydaje się zgodne ze wstępnymi badaniami mutantów *pre-core* w polskiej populacji. W większości przypadków pzwB z obecnymi anty-HBe wykazanie replikacji i ewentualna ocena jej aktywności wymaga metod o znacznie wyższej czułości.

Replikację HBV o niskiej aktywności można badać wykrywając kwas nukleinowy wirusa (DNA). W tym celu opracowano wiele różnorodnych metod, które bardzo różnią się progiem wykrywalności DNA, a wyniki ich trudno między sobą porównywać (16). Niektóre z nich, choć znacznie bardziej kosztowne, nie podnoszą w sposób znaczący wykrywalności replikacji HBV w porównaniu z badaniem pDNA (17).

Wielokrotne zwiększenie wykrywalności replikacji HBV uzyskuje się po amplifikacji DNA metodą PCR, ale stosując rozmaite warunki reakcji i różne odczynniki uzyskuje się także nieporównywalne wyniki. Ponieważ coraz bardziej słuszna wydaje się teza przemawiająca przeciw możliwości eradykacji HBV, ujemny wynik replikacji HBV u osoby z HBsAg w surowicy - uzyskany nawet najlepszą metodą - może zostać podważony przy zastosowaniu metody o wyższej czułości, przy pomocy której uzyskamy wynik dodatni. I tu powstaje problem czy wykrywana coraz częściej - przy zwiększaniu czułości metod - „minireplikacja” ma znaczenie dla uszkodzania zakażonego hepatocyta.

Część obserwowanych pacjentów z pzwB ma jednak dużą aktywność replikacji HBV i w tych przypadkach oznaczanie aktywności pDNA pozostaje nadal bardzo przydatną metodą do ilościowej oceny replikacji wirusa. W naszym rejonie świata są to przede wszystkim pacjenci charakteryzujący się obecnością HBeAg w surowicy.

T Łoch, A Pawińska-Zdziebłowska, MH Fic

HEPATITIS B VIRUS DNA POLYMERASE

SUMMARY

Our aim was to discuss the practical value of HBV DNA polymerase (DNAp) determination. DNAp activity is a good marker of HBV high replication in patients with chronic hepatitis B (HBeAg +), very useful during monitoring of immunostimulation and/or antiviral treatment.

PIŚMIENNICTWO

1. Wilcosky TC, Downs KE, Cook SF, i in. Chronic hepatitis B infection in Eastern Europe and the middle East. *Viral Hepatitis* 2000;6:111-28.
2. Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, i in. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973;12:995-1005.
3. Łoch T, Cianciara J. Aktywność polimerazy DNA wirusa zapalenia wątroby typu B w różnych klinicznych postaciach zakażenia tym wirusem. *Pol Arch Med Wewn* 1992; 87:345-51.

4. Cianciara J, Łoch T, Babiuch L, i in. Leczenie przewlekłego aktywnego zapalenia wątroby (HBsAg+, HBeAg+) izoprynozyną. Ocena kliniczna. *Pol Tyg Lek* 1988; 43:1195-8.
5. Cianciara J, Laskus T, Gąbińska E, Łoch T. Isoprinosine in the treatment of chronic active hepatitis type B. *Scand J Infect Dis* 1990;22:645-8.
6. Kowalik-Mikołajewska B, Barszcz T, Ładyżyńska E, i in. Wstępne wyniki wieloletnich obserwacji dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B po leczeniu isoprynozyną. *Ped Pol* 1992; Supl do nr 1-2:88-91.
7. Kowalik-Mikołajewska B, Barszcz T, Ładyżyńska E, i in. Wykładniki aktywności przewlekłego zapalenia wątroby typu B u dzieci po zakończeniu leczenia izoprynozyną. *Pol Tyg Lek* 1993;48:263-4.
8. Laskus T, Cianciara J, Łoch T, i in. Short-term corticosteroid therapy for chronic active hepatitis B. *Digestion* 1990; 47:115-20.
9. Cianciara J, Łoch T, Poplewska M, i in. Leczenie immunomodulacyjne krótkotrwałą terapią glikokortykosteroidami przewlekłego aktywnego zapalenia wątroby z replikacją HBV. *Pol Arch Med Wewn* 1990; 83:1-6.
10. Cianciara J, Gładysz A, Juszczyk J, i in. Leczenie przewlekłego zapalenia wątroby typu B interferonem alfa (Wellferon) z poprzedzającą i bez poprzedzającej terapii kortykosteroidami-wyniki wieloośrodkowej, podwójnie ślepej próby. *Pol Arch Med Wewn* 1992; 88:430-40.
11. Talarek E, Kowalik-Mikołajewska B, From M, i in. Leczenie interferonem przewlekłego aktywnego zapalenia wątroby typu B u dzieci - wyniki własne. *Ped Pol* 1997; 72:751-5.
12. Kowalik-Mikołajewska B, Ładyżyńska E, Łoch T, i in. Wyniki leczenia interferonem przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B u dzieci. *Pol Merk Lek* 1997;3:241-4.
13. Cianciara J, Cybula A, Nazzal K, i in. Lamiwudyna u chorych zakażonych HBV z trudnościami terapeutycznymi. *Przeg Epidemiol* 2000;54, Supl.2:46-7.
14. Gorczyńska E, Bogusławska-Jaworska J, Saraczyńska E, i in. Zastosowanie rekombinowanego interferonu alfa w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu B u dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego. *Przeg Ped* 1992; 22:72-8.
15. Rokicka-Milewska R., Derulska D, Pawelec K, Łoch T, i in. Interferon alfa w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu B u dzieci chorych na białaczkę i chłoniaki. *Pol Arch Med Wewn* 1993; 90:142-9.
16. Butterworth L-A, Prior S L , Buda J P, i in. Comparison of four methods for quantitative measurement of hepatitis B viral DNA. *J Viral Hep* 1996; 24:686-91.
17. Doniesienie z konferencji. Ślusarczyk J, Łoch T, Zdziebłowska-Pawińska A, i in. Molecular biology techniques in routine diagnosis of chronic hepatitis B and in the monitoring of interferon therapy. In: *Falk Symposium No.87, Poster Abstracts, Basel/Switzerland;1995:p.68.*

Adres autorek:

Teresa Łoch

Zakład Immunopatologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych AM

ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa

tel/fax 0-prefiks-22 862-46-49