

*Agnieszka Kamińska, *Agnieszka Bednarska, Marek Radkowski*

POZAWĄTROBOWA REPLIKACJA WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV)

Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik: Marek Radkowski

* Wojewódzki Szpital Zakaźny w Warszawie
Dyrektor: Andrzej Horban

W pracy omówiono aspekty patogenetyczne oraz metodykę badań występowania pozawątrobowej replikacji HCV. Wymieniono komórki, tkanki i narządy stanowiące miejsce aktywnej replikacji wirusa, ze szczególnym uwzględnieniem komórek układu immunologicznego.

Słowa kluczowe: HCV, poza wątrobowa replikacja

Key word: HCV, extrahepatic replication

ASPEKTY PATOGENETYCZNE I METODYCZNE

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest patogenem często występującym u człowieka i wywołującym poważne konsekwencje: przewlekłe zapalenie wątroby, marskość wątroby i pierwotnego raka wątroby (1). HCV jest wirusem pierwotnie hepatotropowym, jednak liczne doniesienia sugerują, że może on także replikować się w licznych komórkach, tkankach i narządach innych niż wątroba i wywoływać tam określone zaburzenia.

W organizmie zakażonego pacjenta wirus replikujący się w tkance wątrobowej jest uwalniany z komórek i rozprzestrzenia się wraz z krwią. Udowodnienie występowania aktywnej replikacji HCV i odróżnienie jej od biernego „zanieczyszczenia” wirusem w badanym materiale nastręcza zatem poważne trudności. Zastosowanie rutynowych metod RT-PCR do wykrywania HCV-RNA jest więc niewystarczające. Znaczna część populacji wirusa może być bowiem opłaszczona na powierzchni komórek lub znajdować się w ich wnętrzu, np. w komórkach fagocytarnych. Oznaczenia ilościowe, np. obserwacja, że w przypadku tkanki, w której wirus replikuje się jego stężenie jest wyższe niż w surowicy nie jest przekonujące (2).

Wskaźnikiem replikacji HCV, podobnie jak innych Flawiwirusów, jest wykrycie produktu pośredniego - replikacji komplementarnej, tzw. negatywnej lub „minus” nici RNA (3, 4). Jest ona obecna w komórkach, w których replikuje HCV w ilości 10-100

razy niższej niż RNA genomu wirusa. Niestety, istnieją poważne trudności techniczne swojej amplifikacji nici minus HCV-RNA (5, 6).

Standardowe procedury odwrotnej transkrypcji RNA są wysoce nieswoiste. Badanie materiału zawierającego *a priori* pozytywną nić genomu HCV, może skutkować fałszywie dodatnimi wynikami oznaczeń nici minus. Rozwiązaniem tego problemu była zaproponowana przez nas modyfikacja metody RT-PCR z zastosowaniem termostabilnej polimerazy rTth (7), która umożliwia stosunkowo czułe (ok. 100 kopii), a przede wszystkim bardzo swoiste wykrywanie nici minus HCV-RNA. Przeprowadzone przez nas badania kontrolne na sztucznie zsyntetyzowanych niciach plus i minus HCV-RNA wykazało, że reakcja traci swoistość dopiero przy obecności powyżej 10^8 kopii nici „niewłaściwej”, a zatem w warunkach, z którymi w praktyce nie mamy do czynienia.

Drugim uznanym przez nas parametrem wskazującym na możliwość replikacji HCV jest występowanie różnic w sekwencji wirusa w porównaniu z populacją wirusa powstającą w tkance wątrobowej. Można założyć, że istnieje adaptacja wirusa do typu zakażonej komórki i że ma ona miejsce na poziomie RNA. Dodatkowo w przypadku HCV, który cechuje się znacznym stopniem zmienności i występuje w organizmie w postaci mieszaniny różnych i spokrewnionych ze sobą wariantów (*quasispecies*) analiza taka, chociaż obarczona pewnymi ograniczeniami, stwarza podstawę do analizy aktywnej replikacji wirusa.

Różnorodność HCV dotyczy różnych regionów genomu wirusa. Pomimo tego, że największą zmiennością charakteryzują się regiony określane jako *hypervariable*, zmiany sekwencji dotyczą również regionu 5'UTR i NS5B, które stanowią podstawę prowadzonych przez nas badań (8). Szczególne znaczenie może mieć zwłaszcza region 5'UTR, ponieważ istnieją przesłanki, że determinuje on tropizm wirusa względem komórek gospodarza (9, 10).

W porównaniach posługujemy się metodą SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) oraz sekwencjonowaniem, wspierając się w miarę potrzeby klonowaniem produktów PCR odpowiednich fragmentów HCV.

REPLIKACJA HCV W TKANKACH I NARZĄDACH

Pierwsze przeprowadzone przez nas badania opierały się na poszukiwaniu cech replikacji HCV w tkankach i narządach pobranych ze zwłok. Większa część materiału pochodziła od pacjentów zmarłych na AIDS. Kompleksowe analizy oznaczenia nici minus HCV-RNA (potwierdzone metodą hybrydyzacji molekularnej produktów PCR) oraz porównania sekwencji wirusa wykazały, że różne tkanki i narządy mogą być miejscem replikacji HCV. Należą do nich gruczoły wydzielania wewnętrznego: tarczyca, trzustka, nadnercza, jak również tkanki ośrodkowego układu nerwowego (oun): substancja biała i szara półkul mózgowych, mózdzek i rdzeń przedłużony (11, 12). Cechy replikacji HCV wykryto w komórkach uzyskanych z płynu mózgowo-rdzeniowego, co może wyjaśniać sposób zakażenia oun wirusem (13). Replikację HCV wykryto także w szpiku kostnym i sporadycznie w próbkach śledziony i skóry (11, 14).

Wydaje się, że współwystępowanie zakażenia HIV i wywołany tym zakażeniem stan upośledzenia odporności sprzyja występowaniu pozawątrobowej replikacji HCV, niemniej jednak, podobne wyniki uzyskaliśmy w badaniach tkanek pochodzących od osób niezakażonych HIV.

REPLIKACJA HCV W KOMÓRKACH UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Szczególne znaczenie ze względu na częstość występowania i możliwe konsekwencje kliniczne ma replikacja HCV w komórkach układu immunologicznego. Badania węzłów chłonnych pobranych ze zwłok dostarczyły przekonujących dowodów na ten temat (11).

Aby ocenić, które komórki stanowią podstawowe miejsce replikacji HCV dokonaliśmy podziału komórek jednojądrowych krwi obwodowej (PBMC) wyodrębniając populacje limfocytów T CD4+, CD8+, limfocytów B CD19+ i monocytów. Każda z wymienionych populacji komórek może być miejscem replikacji wirusa, jednak najważniejszą rolę odgrywają w niej monocyty i makrofagi (15).

Uzyskane wyniki stanowiły punkt wyjścia dla dalszych eksperymentów przeprowadzonych *in vitro*. Polegały one na ekspozycji makrofagów pochodzących od zdrowych osób na próbki surowic pobranych od osób zakażonych HCV bez lub z jednoczesnym zakażeniem HIV. Komórki były hodowane przez 1, 2 lub 3 tygodnie od momentu ekspozycji na HCV, a następnie oznaczano w nich wskaźniki replikacji wirusa. Zakażenie makrofagów w takim modelu doświadczalnym jest częste i wynosi prawie 50%. Prawdopodobieństwo zakażenia wzrasta statystycznie zmiennie wraz z poziomem HCV w surowicy, jak również w przypadku współistnienia zakażenia HIV.

PODSUMOWANIE

Udowodnienie replikacji HCV w komórkach i tkankach innych niż wątroba potencjalnie może mieć duże znaczenie kliniczne. Oprócz patologii z dobrze udokumentowanym związkiem z zakażeniami HCV (np. krioglobulinemia) (16), może przyczynić się do wyjaśnienia podłoża innych zaburzeń o nieznannej etiopatogenezie.

Dokładniejsze określenie mechanizmów oddziaływania HCV na czynność zakażonych komórek stanowi obecnie cel prowadzonych badań.

A Kamińska, A Bednarska, M Radkowski

EXTRAHEPATIC REPLICATION OF THE HEPATITIS C VIRUS (HCV)

SUMMARY

Pathogenetic aspects and experimental methods employed in the determination of extrahepatic replication of HCV are summarized in the paper. Cells, tissues and organs supporting the active viral replication, particularly cells of the immune system, are presented.

PIŚMIENNICTWO

1. Alter M J, Margolis H S, Krawczynski K, i in. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992;327:1899-905.
2. Laskus T, Radkowski M, Wang L-F, i in. Hepatitis C virus quasiespecies recovered from peripheral blood mononuclear cells and various tissues from patients infected with human immunodeficiency virus type 1: Correlation with extrahepatic viral replication. *Virology* 1998;248:164-71.
3. Wang JT, Sheu JC, Lin JT, i in. Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 1992;166:1167-9.

4. Muller HM, Pfaff E, Goeser T, i in. Peripheral blood leucocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993;74:669-76.
5. Lanford RE, Chavez D, Chisari FV, i in. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J Virol* 1995;69:8079-83.
6. Lerat H, Berby F, Trabaud M-M, i in. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996;97:845-51.
7. Laskus T, Radkowski M, Wang L-F, i in. Detection of hepatitis G virus replication sites using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. *J Virol* 1998;72:3072-5.
8. Jang S J, Wang L-F, Rakela J, i in. Differences between hepatitis C virus 5' untranslated region quasispecies in serum and liver. *J Gen Virol* 1999;80:711-6.
9. Honda M, Rijnbrand RCA, Amphlett A, i in. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 1996;222:31-42.
10. Agol VI. The 5' untranslated region of picornaviral genomes. *Adv Virus Res* 1001;40:103-80.
11. Laskus T, Radkowski M, Wang L-F, i in. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: Specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 1998;28:1398-401.
12. Radkowski M, Wilkinson J, Nowicki M, i in. Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: Evidence of replication. *J Virol* 2002;76:600-8.
13. Laskus T, Radkowski M, Bednarska A, i in. Detection and analysis of hepatitis C virus sequences in cerebrospinal fluid. *J Virol* 2002;76:10064-8.
14. Radkowski M, Kubicka J, Kisiel E, i in. Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. *Blood* 2000;95:3986-9.
15. Laskus T, Radkowski M, Piasek A, i in. Hepatitis C virus in lymphoid cells in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000;181:442-8.
16. Pozzato G, Mazzaro C, Crovato M, i in. Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1994;84:3047-53.

Adres autorów:

Agnieszka Kamińska, Marek Radkowski
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych AM
ul. Pawińskiego 7, 02-106 Warszawa
Agnieszka Bednarska
Wojewódzki Szpital Zakaźny
ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa