

*Magdalena Figlerowicz¹, Piotr Formanowicz³, Paweł Kędziora³,
Magdalena Alekska², Paulina Jackowiak², Jacek Błażewicz³, Wojciech Służewski¹,
Marek Figlerowicz²*

ZNACZENIE KLINICZNE ZMIAN W POPULACJI HCV W PIERWSZYCH TYGODNIACH
LECZENIA PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C INTERFERONEM
I RYBAWIRYNĄ

¹ Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej, Akademii Medycznej
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Kliniki: Wojciech Służewski

² Zespół Wirusologii Molekularnej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Kierownik Zespołu: Marek Figlerowicz

³ Pracownia Bioinformatyki, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Kierownik Pracowni: Jacek Błażewicz

Z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C wiążą się poważne problemy kliniczne i terapeutyczne. Niestety, jak dotąd nie wiadomo, jakie czynniki wpływają na efektywność stosowanej terapii. Uzyskane w ostatnim czasie wyniki sugerują, że kluczowym parametrem decydującym o przebiegu choroby są zmiany zachodzące w strukturze populacji wirusowej.

Słowa kluczowe: wirus zapalenia wątroby typu C, przewlekłe zapalenie wątroby, leczenie
Key words: hepatitis C virus, chronic hepatitis, therapy

WSTĘP

Znalezienie skutecznej metody zwalczania zakażeń wywoływanych przez wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *hepatitis C virus*) to jedno z najpoważniejszych wyzwań, przed jakimi stoi współczesna medycyna. Jeżeli bowiem weźmiemy pod uwagę takie parametry jak: powszechność występowania danego wirusa, skuteczność stosowanej obecnie profilaktyki i terapii, czy uciążliwość powikłań występujących w wyniku infekcji, wówczas HCV okaże się być drugim, zaraz po ludzkim wirusie upośledzenia odporności, najbardziej groźnym dla ludzi wirusowym czynnikiem chorobotwórczym. Opublikowane przez WHO wyniki szacunkowych badań pokazują, że zakażenia HCV są szeroko rozpowszechnione i dotyczą obecnie około 3% mieszkańców Ziemi. W Polsce liczba nosicieli stanowi około 1,4% populacji, a więc ponad pół miliona ludzi (1).

Faza ostra zakażenia HCV jest w większości przypadków bezobjawowa (u około 70% pacjentów, jednak u pozostałych 50-85% pacjentów wirus jest w stanie uniknąć reakcji obronnej organizmu, przez co dochodzi do rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby typu

C (pzw C), którego następstwem mogą być ciężkie powikłania. Uzyskane w ostatnim dziesięcioleciu dane pozwoliły stwierdzić, iż zakażenie HCV jest główną przyczyną rozwoju marskości wątroby oraz pierwotnego raka wątrobowokomórkowego, który w skali całego świata jest jednym z najczęściej występujących nowotworów (2). Tymczasem, jak dotąd nie udało się otrzymać skutecznej szczepionki zabezpieczającej przed infekcją HCV. Nie opracowano również odpowiednio efektywnych metod leczenia pzw C. Stosowana obecnie terapia polegająca na podawaniu interferonu alfa (IFN) w połączeniu z rybawiryną jest niezwykle kosztowna i powoduje długotrwałą remisję zakażenia jedynie u około 40-50% pacjentów. Pomimo intensywnych badań nie zdołano również zidentyfikować parametrów, które pozwalałyby jednoznacznie przewidzieć końcowy efekt terapii pzw C (2,3). Nadal nie wiadomo, dlaczego chorzy charakteryzujący się podobnymi parametrami klinicznymi reagują w różny sposób na prowadzone leczenie. Wydaje się zatem, że czynniki, które w kluczowy sposób wpływają na przebieg kuracji pozostają wciąż nierozpoznane.

BUDOWA HCV

Chociaż HCV zidentyfikowany został około 15 lat temu, nasza wiedza na temat jego budowy i cyklu życiowego jest nadal bardzo ograniczona. Niezwykle trudnym problemem okazało się samo tylko uwidocznienie wirusa we krwi lub innych zakażonych tkankach. Pomimo zastosowania najnowocześniejszych technik mikroskopii elektronowej uzyskiwane obrazy są niejednoznaczne. Wskazują one na obecność niewielkich kulistych wirionów o średnicy 40-60 nm usytuowanych głównie w pęcherzykach cytoplazmy (4). Obserwacje te znajdują potwierdzenie w prowadzonych równolegle badaniach fizyko-chemicznych świadczących, że wirus ma kształt sferyczny. W jego wnętrzu ulokowany jest genom będący pojedynczą cząsteczką RNA. Materiał genetyczny HCV otacza nukleokapsyd pokryty dodatkowo zewnętrzną osłonką, w której zakotwiczone są glikoproteiny. Ze względu na swoją budowę, właściwości fizyko-chemiczne oraz organizację genomu, HCV zaliczony został do rodziny flawiwirusów (*Flaviviridae*). Wstępnie zakwalifikowano go do rodzaju *Flavivirus*, a od 1996 roku wydzielono jako jedyne przedstawiciela rodzaju *Hepacivirus* (5).

W badaniach HCV klasyczne techniki wirusologiczne okazały się być mało skuteczne, stąd większość informacji o tym wirusie uzyskano stosując standardowe metody biologii molekularnej tj. analizując jego genom oraz produkty ekspresji zakodowanej w nim informacji. Stwierdzono, iż genom HCV stanowi jednociowy RNA o długości około 9,6 tysięcy nukleotydów (nt) i polarności mRNA – (+) RNA. W obrębie cząsteczki genomowej wyróżnić można dwie krótkie sekwencje niekodujące 3' - i 5' – końcową (tzw. 3'UTR i 5'UTR – ang. *untranslated region*) oraz leżący pomiędzy nimi region kodujący zawierający pojedynczą otwartą ramkę odczytu (ORF – ang. *open reading frame*) o długości 9033-9066 nt (6). 5'UTR zbudowany jest z 341 nt, po których występuje kodon AUG będący sygnałem do inicjacji translacji. Na końcu 5' wirusowego RNA brak jest tzw. kapu (ang. *cap*), czyli metylowanej w pozycji N7 reszty guanozynowej połączonej z pierwszym nukleotydem wiązaniem 5'-5' trifosforanowym. Rozpoczęcie translacji możliwe jest dzięki sekwencji IRES (ang. *internal ribosome entry site*), pozwalającej na niezależne od kapu wiązanie wirusowego RNA do rybosomów (7). 3'UTR następuje zaraz po kodonie kończącym translację – UGA. Otwiera go konserwatywny fragment 30 nt, za którym ulokowana

jest sekwencja poli U-C o różnej długości oraz 98 nt region X. Wykazano, że region X jest szczególnie zachowawczy, posiada bardzo stabilną strukturę drugo- i trzeciorzędową oraz oddziałuje z występującym na końcu 5' IRES, przez co wpływa na wydajność translacji wirusowego RNA (8). Po wnikięciu wirusa do wrażliwych komórek, genomowy RNA zostaje uwolniony z kapsydu i służy jako matryca do syntezy jednej tylko poliproteiny. Dzięki obecnym w komórce proteazom (gospodarza oraz wirusowym) zostaje ona pocięta na funkcjonalne białka. Trzy spośród nich to tzw. białka strukturalne wchodzące w skład cząstek wirusa: białko rdzeniowe (C – ang. *core protein*) tworzące nukleokapsyd oraz dwie glikoproteiny (E1 i E2 – ang. *envelope proteins*) zakotwiczone w zewnętrznej osłonce. Wśród pozostałych białek zidentyfikowano dwie proteazy, helikazę oraz polimerazę RNA zależną od RNA.

KLASYFIKACJA HCV

Prowadzone w ostatnich latach badania umożliwiły poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej wielu genomowych cząsteczek HCV. Poddane sekwencjonowaniu genomy wirusowe wyizolowane zostały z krwi chorych pochodzących z różnych części świata. Uzyskane dane pozwoliły przeprowadzić szczegółową analizę filogenetyczną HCV. Na jej podstawie wyróżniono typy, podtypy i izolaty wirusa, które różnią się między sobą sekwencją nukleotydową, odpowiednio w 30, 20 i 10% (9). Obecnie znanych jest 6 podstawowych genotypów HCV (oznaczonych cyframi arabskimi od 1 do 6). Każdy z nich można podzielić na wiele podtypów (oznaczane kolejnymi małymi literami alfabetu np. 1a, 1b, 1c itd.), których w sumie jest ich już około 80. Stwierdzono, że genotyp jest istotną cechą wirusa, która nie ulega zmianie w przebiegu infekcji. Nie wiadomo jednak, w jakim stopniu różne genotypy (lub różne warianty tego samego genotypu) mogą ze sobą rekombinować w zakażonym organizmie (10).

Analiza porównawcza otrzymanych izolatów HCV świadczy o dużej plastyczności genetycznej wirusa. Nie różni się ona jednak w jakiś istotny sposób od obserwowanej dla innych wirusów RNA. Ciekawym wydaje się być fakt, że zmienność HCV nie rozkłada się równomiernie wzdłuż całej cząsteczki genomowej (11). Jest ona szczególnie duża w obszarze kodującym białka osłonki E1 i E2 (około 30-50% zmienności) oraz bardzo ograniczona w obu regionach niekodujących 5'UTR i 3'UTR (poniżej 10% zmienności). Dodatkowo stwierdzono, że w obrębie sekwencji kodującej N-końcowy fragment białka E2 obecne są dwa tzw. hiperzmiennne rejony (HVR1 i HVR2; ang. *hypervariable region*). Szczególnie dynamiczne zmiany obserwowane są w obrębie około 100 nukleotydowego HVR1. Uzyskane dane sugerują, że jego zmienność przyspiesza rozwój choroby, być może poprzez umożliwienie ucieczki HCV przed odpowiedzią immunologiczną. Na białku E2 zidentyfikowano bowiem liczne miejsca wiązania przeciwciał (12,13).

ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA HCV

Liczne badania wskazują, że HCV, podobnie jak i inne wirusy RNA, nie tworzy genetycznie jednorodnej populacji, lecz stanowi zbiór różnorodnych wariantów, u których sekwencja genomowych RNA oscyluje wokół najkorzystniejszej w danych warunkach kombinacji. Poczynione obserwacje dały podstawy do powstania hipotezy mówiącej, iż kla-

syczne pojęcia stosowane w biologii populacyjnej nie odnoszą się do wirusów wykorzystujących RNA jako nośnik informacji genetycznej. Patogeny te nie tworzą bowiem gatunków, lecz występują w formie tzw. quasi-gatunków (13). Zgodnie z zaproponowaną definicją quasi-gatunkiem nazywamy zbiór wszystkich wariantów wirusowych obecnych w pojedynczym zakażonym organizmie. Przez długi czas przyczyny niezwykle plastyczności wirusów RNA upatrywano głównie w znacznej ilości błędów, jakie popełniać mogą polimerazy RNA podczas replikacji genomu wirusowego (13,14). Badania dotyczące struktury oraz ewolucji genomów wirusowych wskazywały jednak, że istnieje jeszcze dodatkowy proces umożliwiający rearanżację zakodowanej w nich informacji genetycznej. Okazało się, że jest nim rekombinacja zachodząca pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA (15).

Zidentyfikowane w genomach wirusowych modyfikacje można zatem podzielić na dwie zasadnicze grupy: mutacje punktowe (np. substytucje, delecje, czy insercje nukleotydu) oraz bardziej złożone rearanżacje (np. delecje, insercje, czy duplikacje sekwencji nukleotydowej).

Istnieje wiele mechanizmów umożliwiających wprowadzenie pojedynczych mutacji w obrębie genomu wirusowego. Mogą one powstawać wskutek działania czynników mutagennych lub być wynikiem modyfikacji potranskrypcyjnych. Częstość występowania tego typu modyfikacji jest jednak znikoma, w porównaniu z liczbą mutacji wprowadzanych do cząsteczek genomowych podczas ich replikacji przez zależne od RNA polimerazy RNA. W odróżnieniu od enzymów replikujących genomy organizmów wyższych (kompleksy enzymatyczne, w skład których wchodzi zależne od DNA polimerazy DNA), wirusowe replikazy pozbawione są zdolności do korygowania błędów powstałych podczas syntezy potomnych cząsteczek RNA (ang. *proof reading activity*). Określona eksperymentalnie *in vivo* średnia częstość mutacji wynosi około 10^{-4} - 10^{-5} zasad na cykl replikacyjny (13). Aby uzmysłowić sobie, jak wielki potencjał ewolucyjny niesie z sobą nieprecyzyjna replikacja genomowych RNA, wystarczy przeprowadzić proste obliczenia. Wiedząc, że genom HCV składa się z około 10^4 nukleotydów, a średnia liczba wirionów tworzonych każdego dnia w organizmie pacjenta wynosi około 10^{12} możemy ustalić, że polimeraza zużywa dziennie 10^{16} ($10^4 \times 10^{12}$) nukleotydów. Biorąc pod uwagę częstość mutacji wynoszącą 10^{-4} - 10^{-5} łatwo obliczyć, że w ciągu jednego zaledwie dnia polimeraza popełnia 10^{11} - 10^{12} błędów ($10^{16}/10^4$ - 10^5) – taka, więc liczba mutacji wprowadzana jest do nowo syntetyzowanych genomowych RNA HCV. Jeżeli uwzględnimy ich długość (10^4 nukleotydów) wówczas możemy stwierdzić, iż w ciągu jednego dnia infekcji każdy nukleotyd wchodzący w skład genomu HCV może zostać wymieniony na inny 10^7 - 10^8 razy (10^{11} - $10^{12}/10^4$). Spośród szeregu możliwych mutacji najczęściej spotykane są substytucje, w obrębie których wyraźnie przeważają tranzycje (80% – wymiana puryny na purynę lub pirymidyny na pirymidynę), a zdecydowanie mniej liczne są transwersje (20% – wymiana puryny na pirymidynę, czy odwrotnie). Do najrzadziej występujących mutacji zaliczyć można pojedyncze delecje, duplikacje, przesunięcia ramki odczytu, czy kompleksowe hipermutacje (16).

Najnowsze badania wskazują, że drugi z mechanizmów różnicowania genomu – rekombinacja jest również niezwykle powszechna w świecie wirusów RNA i retrowirusów (17). Badania te umożliwiły identyfikację różnego typu rekombinantów wirusowych powstałych w wyniku wymiany informacji genetycznej pomiędzy fragmentami genomu tego samego wirusa (18), pomiędzy różnymi szczepami wirusowymi (19) oraz pomiędzy wiru-

sem a komórką gospodarza (20). Rekombinacja obserwowana była dla wirusów ludzkich, zwierzęcych (16), roślinnych (21) i bakteryjnych (22). Sprawilo to, że jest ona obecnie traktowana jako jedno z najpoważniejszych potencjalnych zagrożeń zarówno dla zdrowia ludzi, jak i zwierząt. Obecnie nie budzi już wątpliwości fakt, iż niestabilność genetyczna jest jedną z cech charakterystycznych wirusów RNA. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że przewlekłe zapalenie i związane z nim powikłania rozwijają się tym łatwiej, im bardziej zróżnicowana populacja HCV wytworzona zostanie w pierwszym etapie infekcji. Słuszny wydaje się więc pogląd, że zdolność HCV do generowania mutantów jest główną przyczyną powstania pzw C. Powstaje zatem pytanie, jakie właściwości HCV pozwalają temu wirusowi zmieniać się dostatecznie szybko, by stać się nieuchwytnym dla przeciwciał lub opornym na stosowane leki. Z przedstawionych powyżej danych wynika, że głównymi źródłami niezwyklej plastyczności genetycznej HCV jest bardzo wydajna, a równocześnie mało precyzyjna replikacja genomu oraz rekombinacja RNA. Dodatkowo istnieje jednak czynnik ograniczający zakres możliwych zmian, jest nim ciśnienie selekcyjne decydujące, które z powstałych wariantów mogą akumulować się i rozprzestrzeniać w organizmie chorego. Infekcję HCV prowadzącą do rozwoju pzw C można zatem przedstawić jako ogromnie skomplikowany proces selekcji najlepiej przystosowanych wariantów wirusa. Załóżmy, że w jego początkowej fazie pojedyncza cząstka wirusowa zakaża wrażliwą komórkę i zaczyna się namnażać. W rezultacie powstaje pula nowych wariantów HCV, które poddawane są kolejnym etapom selekcji. Pierwszy następuje, gdy wirusy opuszczają pierwotnie zakażoną komórkę. Do dalszej ekspansji są bowiem gotowe jedynie te wiriony, które zachowały zdolność do infekowania nowych komórek. Gdy zdołają do nich wnikać, następuje drugi etap selekcji – powieleniu ulegają tylko te wirusy, które zachowały zdolność do replikacji. Gdy po kilku dniach infekcji dochodzi do powstania specyficznych przeciwciał, ma miejsce kolejny etap selekcji – przetrwać mogą jedynie te wirusy, które są nierozpoznawane przez układ immunologiczny gospodarza. Jeżeli podczas zakażenia pacjent poddany jest kuracji, wówczas wytworzony zostanie kolejny czynnik selekcyjny – w jego organizmie przetrwać mogą tylko te warianty, które są odporne na zastosowany lek. W ten oto sposób po kilku tygodniach terapii wirus zostaje wyeliminowany lub też dochodzi do wyselekcjonowania wariantów infekcyjnych, zdolnych do replikacji, nieuchwytnych dla układu immunologicznego i niewrażliwych na terapię przeciwwirusową (23). Pomimo znacznych różnic w sekwencji nukleotydowej poszczególnych wariantów HCV nie wykazano, by istniały istotne różnice w organizacji ich genomów. Każdy koduje taką samą liczbę białek, o zbliżonym składzie aminokwasowym, które poddawane są takim samym lub podobnym modyfikacjom potranslacyjnym. Jednak nawet te niewielkie odrębności w budowie białek strukturalnych i niestrukturalnych implikować mogą poważne problemy diagnostyczne i terapeutyczne.

TERAPIA PZW C

Poważne powikłania towarzyszące zakażeniu HCV spowodowały, że niezmiernie istotnym i powszechnym problemem stało się leczenie pzw C. Jak wiadomo pula znanych leków przeciwwirusowych jest bardzo ograniczona, a ich skuteczność szczególnie przeciwko wirusom RNA niezwykle słaba (23). Aby znaleźć skuteczną terapię dla chorych z pzw C, korzystano z doświadczeń w leczeniu innych wirusowych zapaleń wątroby lub wzoro-

wano się na metodach stosowanych w zakażeniach wirusami o zbliżonej do HCV budowie i właściwościach. Początkowo zatem wprowadzono monoterapię interferonem alfa (IFN), która jak wiadomo jest zalecana w przewlekłym zapaleniu wątroby typu B. Kolejne badania dotyczyły podawania rybawiryny, leku wcześniej wykorzystywanego w zakażeniach wywołanych przez inne flawiwirusy. Ze względu na słabą skuteczność obu tych metod terapeutycznych zastosowano terapię skojarzoną IFN i rybawiryną.

IFN spełnia liczne funkcje biologiczne w organizmie człowieka. Wykazuje działanie antyproliferacyjne i immunomodulujące, a pośrednio przeciwwirusowe. Rybawiryna jest znaną od około 30 lat syntetyczną pochodną nukleozydową wykazującą *in vitro* szerokie spektrum przeciwwirusowe. Ponieważ *in vitro* wykazywała również aktywność przeciw licznym flawiwirusom, po stwierdzeniu podobieństwa HCV do tej rodziny, zastosowano ją do leczenia pzw C. Początkowo sugerowano, że mechanizm działania leku polega na inhibicji polimerazy RNA zależnej od RNA, uszczuplaniu zasobów wewnątrzkomórkowych GTP oraz immunomodulacji – poprzez hamowanie makrofagów lub wpływ na stosunek cytokin limfocytów pomocniczych Th1/Th2 (24).

Według najnowszych doniesień rybawiryna może działać jako specyficzny mutagen. Wirusowe polimerazy RNA wykorzystują ją jako substytut nukleotydu, przez co jest włączana do genomowych cząsteczek RNA. Jednakże w odróżnieniu od naturalnie występujących rybonukleotydów, rybawiryna pozbawiona jest zdolności do tworzenia specyficznych par typu A-U czy G-C. Obecność rybawiryny w genomowej cząsteczce RNA powoduje, że w kolejnych cyklach replikacyjnych w jej miejsce wprowadzany jest dowolny nukleotyd (A, C, G lub U). W ten sposób lek działać może jako dodatkowy czynnik gwałtownie zwiększający, i tak charakterystyczną dla wirusów RNA, niezwykle zmienność genetyczną. W rezultacie większość nowo powstałych cząsteczek wirusowych posiada tak dużą ilość mutacji, iż tracą one zdolność do zainicjowania infekcji. Duża mutagenność rybawiryny bywa przez niektórych autorów uważana za przeciwwskazanie do stosowania u dzieci. Należy jednak zauważyć, że jej obecność nie powoduje mutacji w obrębie genomu ludzkiego. Modyfikacje są jednak najprawdopodobniej wprowadzane do syntetyzowanych w jądrze komórkowym cząsteczek RNA, co może wpływać na ich funkcje (tRNA, rRNA) lub na przenoszoną informację (mRNA). Nie wiadomo jednak jak obecność rybawiryny w mRNA wpływa na proces translacji czyli na syntezę białek (23).

Opisane powyżej właściwości IFN i rybawiryny sprawiły, że podjęto próby równoczesnego zastosowania obu leków. Amerykański National Institute of Health zalecił terapię skojarzoną IFN i rybawiryną u chorych z pzw C w 1998 roku, w Europie ten sposób leczenia stał się obowiązującym od roku 1999. Przeprowadzono kilka randomizowanych, kontrolowanych badań klinicznych obejmujących chorych z pzw C. Najkorzystniejszą okazała się terapia skojarzona prowadzona przez 48 tygodni, z zastosowaniem IFN w dawce 3 MIU trzy razy w tygodniu i rybawiryny w dawce 1000-1200 mg/dobę (2,3). Podczas tak prowadzonego leczenia trwała odpowiedź wirusologiczną (SVR – ang. *sustained virological response*) uzyskiwano u 43-47% pacjentów z pzw C. Rezultaty te wskazują na synergistyczne działanie rybawiryny i IFN, przyczyniające się do poprawy skuteczności kuracji oraz trwałości otrzymanych efektów. Wprowadzenie do terapii pzw C IFN o przedłużonym czasie półtrwania, (PEG-IFN – IFN stabilizowany polietylenoglikolem) w skojarzeniu z rybawiryną przyniosło dalszą poprawę jej skuteczności o około 7-8%. Badania dotyczące dużych grup chorych (505 i 511 dorosłych pacjentów) prowadzone przez *Mannsa* i wsp.

wykazały, że zastosowanie w terapii skojarzonej IFN prowadzi do SVR u 47% chorych, a PEG-IFN u 54% (2). Podobne rezultaty przedstawił *Fried* i wsp., SVR obserwowano odpowiednio u 44% i 56% pacjentów (3).

CZYNNIKI POZYTYWNEJ PROGNOZY TERAPII

Wielośrodkowe obserwacje pozwoliły na określenie pewnych czynników pozytywnej prognozy leczenia przeciwwirusowego w pzw C. Wśród postulowanych parametrów znalazły się: kliniczne (np. płeć żeńska, młodszy wiek), biochemiczne (wyższą aktywność AlAT), histopatologiczne (brak włóknienia typu mostkowego i marskości) oraz wirusologiczne (genotyp HCV inny niż 1, niski poziom wirerii). Szansę na korzystny wynik terapii zwiększają również właściwie prowadzona terapia (to znaczy taka, gdy pacjent otrzymał >80% należnej dawki leków, prowadzona odpowiednio długo) oraz wczesna odpowiedź wirusologiczna na leczenie. Wydaje się jednak, że spośród wymienionych licznych czynników najistotniejsze znaczenie mają te zależne od wirusa. Coraz powszechniej uważa się bowiem, że główną przyczyną rozwoju przewlekłej infekcji oraz trudności terapeutycznych jest niezwykle plastyczność genetyczna HCV (polimorfizm genetyczny) (23). Skuteczność terapii skojarzonej PEG-IFN i rybawiryną jest lepsza u chorych zakażonych HCV o genotypie innym niż 1 (73-77%), w porównaniu z pacjentami, u których chorobę wywołał HCV o genotypie 1 (40-51%) (25). Istotny wpływ na rezultaty leczenia ma także wielkość wirerii HCV (26). SVR stwierdza się u 33% chorych o wysokim wstępnym poziomie RNA HCV w surowicy (powyżej 2 mln kopii/ml) i u 45% pacjentów z poziomem niższym (poniżej 2 mln kopii/ml). Co ciekawe, korzystny wpływ niższej wirerii obserwowano głównie u chorych zakażonych wirusem o genotypie 1, w przypadku pozostałych infekcji HCV, czynnik ten miał niewielkie znaczenie.

ANALIZA STRUKTURY POPULACJI HCV

Aby zweryfikować tezę, że o skuteczności leczenia pzw C decyduje polimorfizm genetyczny wirusa, postanowiono ustalić jak ewoluuje HCV w pierwszych tygodniach leczenia IFN i rybawiryną. W tym celu opracowano metody pozwalające: (i) opisać strukturę populacji HCV, (ii) określić zmiany zachodzące w populacji wirusowej, (iii) ustalić korelację pomiędzy obserwowanymi zmianami a ostatecznym rezultatem kuracji (praca wysłana do druku). Ponieważ wielokrotne sekwencjonowanie całego genomu HCV jest bardzo czasochłonne i kosztowne, należało znaleźć jego najbardziej reprezentatywny fragment, który powinien zostać poddany analizie. Przy wyborze właściwej sekwencji kierowano się następującymi kryteriami: (i) poddany badaniom fragment powinien dać się sekwencjonować w pojedynczym eksperymencie – co oznacza, że może składać się co najwyżej z 500 nukleotydów, (ii) drzewo filogenetyczne skonstruowane dla wybranego rejonu powinno być podobne do drzewa otrzymanego dla całego genomu, (iii) ze względu na różny polimorfizm poszczególnych obszarów genomowego RNA, poszukiwany fragment powinien zawierać zarówno rejony zmienne, jak i stabilne. Biorąc pod uwagę powyższe warunki do dalszych badań wybrano sekwencję kodującą C-końcowy fragment białka E1 i N-końcowy fragment białka E2 (analizowany fragment – AF), ułożoną w genomie wirusa pomiędzy 1425 a 1886 nukleotydem. Zawiera ona rejon charakteryzujący się szczególnie dużą zmien-

nością (HVR1) i sąsiadującą z nim sekwencję o umiarkowanej zmienności (relatywnie stabilny – RS). Analiza AF pozwalała określić 3 parametry opisujące populację wirusową tj: liczbę wariantów, dystans genetyczny między poszczególnymi wariantami (średni dystans *Hamminga*) oraz występujące pomiędzy nimi pokrewieństwo (drzewo filogenetyczne). W celu ich wyznaczenia izolowano genomowy RNA z krwi chorego, amplifikowano sekwencję AF, klonowano ją do plazmidu, a następnie 20 losowo wybranych klonów poddawano sekwencjonowaniu.

Wstępne badania przeprowadzono u dwóch pacjentów, którzy odmiennie zareagowali na zastosowaną terapię skojarzoną (pozytywnie i negatywnie). Stwierdzono, iż analiza samego tylko rejonu HVR1 najlepiej odzwierciedla różnice pomiędzy chorymi. Wykazano, że zróżnicowanie populacji HCV u dziecka z SVR było bardzo duże. Tymczasem u dziecka, które nie odpowiedziało na terapię stwierdzono bardzo jednorodną populację z obecnością silnego, dominującego wariantu. U obu pacjentów po 2 tygodniach leczenia struktura populacji nie uległa istotnej zmianie. U dziecka z SVR nadal obserwowano liczne warianty wirusowe, natomiast u dziecka, które nie odpowiedziało na kurację (NVR – ang. *non response*) utrzymywał się jeden ten sam, co przed terapią wariant. Uzyskane wyniki wskazują, iż istnieje możliwość przewidywania końcowego wyniku terapii skojarzonej IFN i rybawiryną jeszcze przed jej rozpoczęciem.

*M Figlerowicz, P Formanowicz, P Kędziora, M Alejska, P Jackowiak, J Błażewicz,
W Służewski, M Figlerowicz*

THE CLINICAL CONSEQUENCES OF CHANGES OCCURRING IN HCV POPULATION
DURING THE FIRST WEEKS OF CHRONIC HEPATITIS C TREATMENT
WITH INTERFERON AND RIBAVIRIN

SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) is an extremely dangerous human pathogen. It is widespread all over the world and often leads to the development of chronic hepatitis C (CHC), which can eventually result in cirrhosis a hepatocellular carcinoma. The efficiency of the current applied methods of treatment of HCV infection remains unsatisfactory. The main course of development of CHC and of therapeutic problems is the genetic polymorphism of HCV. The conducted analysis of the structure of the virus' population permits are conclude that the degree of diversity it presents is a crucial agent in the prediction of the outcome of IFN and ribavirin therapy.

PIŚMIENNICTWO

1. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of heptitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* 2004;85:3173-3188.
2. Alberti A, Benvegno L. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2003;38:S104-S118.
3. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, i in. Randomised trial of interferon alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998;352:1426-1432.
4. Shimizu YK, Feinstein SM, Kohara M, i in. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996;23:205-209.

5. Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol* 1995;140:1747-1761.
6. Choo QL, Richman KH, Han JH. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *PNAS* 1991;88:2451-2455.
7. Lemon SM, Honda M. Internal ribosome entry sites within the RNA genomes of hepatitis C virus and other flaviviruses. *Semin Virol* 1997;8:274-288.
8. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996;70:3363-3371.
9. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15:41-63.
10. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, i in. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;1321-1324.
11. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, i in. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991;180:842-848.
12. Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, i in. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alpha therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1998;54:256-264.
13. Martell M, Esteban JI, Quer J, i in. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225-3229.
14. Pathak VK, Temin HM. Broad spectrum of *in vivo* forward mutations, hypermutations, and hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6019-6023.
15. Lai MMC. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:61-79.
16. Hirst GK. Genetic recombination with Newcastle diseases virus, polioviruses and influenza virus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 1962;27:303-309.
17. Simon AE, Bujarski JJ. RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 1994;32:337-362.
18. Bujarski JJ, Nagy PD, Flasiniski S. Molecular studies of genetic RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. *Advances in Virus Research* 1994;43:275-302.
19. Emini EA, Leibowitz J, Diamond DC, i in. Recombination of mahoney and sabin strain poliovirus type 1: analysis of *in vitro* phenotypic markers and evidence that resistant to guanidine maps in the nonstructural proteins. *Virology* 1984;137:74-85.
20. Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, i in. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequence. *Virology* 1991;180:602-616.
21. Greene AM, Allison RF. Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 1994;263:1423-1425.
22. Palasingam K, Shaklee PN. Reversion of Q β RNA phage mutants by homologous RNA recombination. *J Virol* 1992;66:2435-2442.
23. Figlerowicz M, Alejska M, Kurzyńska-Kokorniak A, i in. Genetic variability – the key problem in prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev* 2003;23:488-518.
24. Hultgren C, Milich DR, Weiland O, i in. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th)1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998;79:2381-2391.
25. McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff ER, i in. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998;339:1485-1492.
26. Hadziyannis J, Cheinquer H, Morgan T, i in. Peginterferon alfa-2a(40kD)(PEGASYS) in com-

ination with ribavirin (RBV): efficacy and safety results from a phase III, randomised, double-blind multicenter study examining effect of duration of treatment and RBV dose. J Hepatol 2002;36:(Suppl 1):3.

Adres autora:

Dr n. med. Magdalena Figlerowicz
Klinika Chorób Zakaźnych I Neurologii Dziecięcej
Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Szpitalna 37/33, 60-572 Poznań
tel./fax (61) 84 91 362
e-mail: mfiglerowicz@sk5.usoms.poznan.pl