

Received: 2012.06.20
Accepted: 2013.09.23
Published: 2013.12.11

Rola hepcydyny oraz polimorfizmów w regionie regulatorowym genu IL-28B w zakażeniach HCV

The role of hepcidin and polymorphisms in the regulatory region of the IL-28B gene in HCV infections

Magdalena Cybula, Janusz Szmraj

Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Infekcja wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), to duży problem: wirus jest główną przyczyną przewlekłego zapalenia i marskości wątroby. Powszechnie stosowane leczenie opiera się na połączeniu pegylowanego IFN- α i rybawiryny; pozwala ono na osiągnięcie trwałej odpowiedzi wirusologicznej u 40-52% pacjentów zakażonych genotypem 1 i ponad 70% zakażonych genotypami 2 i 3. Niestety terapia jest tylko częściowo skuteczna, droga i wiąże się z występowaniem działań niepożądanych. Poszukuje się wciąż nowych metod, aby poprawić odpowiedź na leczenie, zwłaszcza wśród zakażonych HCV-1, który jest najbardziej oporny na standardową terapię. W 2011 r. FDA zatwierdziła dwa nowe leki boceprevir i telaprevir będące inhibitorami proteazy wirusowej. W przyszłości triterapia może się stać standardem w leczeniu zakażeń HCV-1. Zlokalizowane w regionie regulatorowym genu IL-28B polimorfizmy SNP rs12979860 oraz rs8099917, odgrywają ważną rolę w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie. Związane są również ze spontanicznym ustąpieniem zakażenia i wyjaśniają różnice w odpowiedzi na standardową terapię u pacjentów rasy czarnej i białej. Terapia personalizowana, określana jako właściwe leczenie dla odpowiedniego pacjenta, powinna stać się główną strategią leczenia zakażonych HCV. Dzięki jej zastosowaniu leczenie mogłoby się stać bardziej efektywne i bezpieczne. Hepcydyna jest hormonem regulującym gospodarkę żelaza. Jej obniżone stężenie prowadzi do przeładowania żelazem, a następnie do rozwoju procesu zapalnego i zwłóknień w wątrobie. Obserwowane jest to u pacjentów zakażonych HCV. Nie określono jednoznacznie jaki jest wpływ żelaza na replikację wirusa.

Słowa kluczowe:

HCV • leczenie przeciwwirusowe • polimorfizm genu IL-28B • terapia personalizowana • hepcydyna

Summary

HCV infection is a big problem worldwide. The virus is the main cause of chronic hepatitis and liver cirrhosis. The common treatment is based on a combination of pegylated IFN- α and ribavirin. It leads to SVR in 40–52% of HCV-1-infected patients and more than 70% of HCV-2- or HCV-3-infected individuals. Unfortunately, this therapy is only partially effective, expensive and associated with numerous side effects. To improve the response, especially among individuals infected with genotype 1, which is the most resistant to standard therapy, new strategies are sought. In 2011 the US FDA licensed two agents, boceprevir and telaprevir, which are protease inhibitors. In the future triple therapy (pegIFN- α /RBV/protease inhibitor) may be the standard of care for patients infected with HCV-1. Polymorphisms in the regulatory region of the *IL-28B* gene (SNP rs12979860, SNP rs8099917) play a very important role in predicting treatment outcome. They are also associated with spontaneous recovery from HCV infection and explain the difference in response to standard therapy between the black and white races. Personalized therapy, which is defined as suitable treatment for the right

	patient, should become the main treatment strategy for HCV-infected individuals. It could be possible to make the therapy more effective and safe. Hepcidin is a hormone regulating iron metabolism. A low level of hepcidin leads to iron overload then to inflammation and liver fibrosis. It is observed in HCV-infected patients. Iron influence over HCV replication is not distinctly determined.
Keywords:	HCV • antiviral treatment • IL-28B polymorphism • personalized therapy • hepcidin
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1079933
Word count:	3594
Tables:	1
Figures:	3
References:	42

Adres autora: prof. Janusz Szemraj, Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: jszemraj@csk.am.lodz.pl

Wykaz skrótów: **2'-5' OAS** – gen 2',5' syntetazy oligoadenylowej (2',5' oligoadenylate synthetase); **EVR** – wczesna odpowiedź wirusologiczna (early virological response); **HAMP** – gen hepcydyny (hepcidin antimicrobial peptide); **HBV** – wirus zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus); **HCV** – wirus zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus); **HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **IFN** – interferon; **IL** – interleukina; **ISG** – geny stymulowane interferonem (interferon-stimulated genes); **ITPA** – gen enzymu inozynotrifosfatazy; **LDL** – lipoproteiny o niskiej gęstości (low-density lipoprotein); **Mx** – gen białka Mx; **NS** – białko niestrukturalne (nonstructural protein); **pDC** – plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (plasmacytoid dendritic cell); **PKR** – gen kinazy białkowej R (proteine kinase R); **RBV** – rybawiryna; **RVR** – szybka odpowiedź wirusologiczna (rapid virological response); **SNP** – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (single-nucleotide polymorphism); **SR-BI** – receptor typu scavenger klasy B typ 1 (scavenger receptor class B type I); **SVR** – trwała odpowiedź wirusologiczna (sustained virological response); **TLR** – Toll-like receptor; **UTR** – region nieulegający translacji (untranslated region); **WZW** – wirusowe zapalenie wątroby.

WSTĘP

HCV, należący do grupy wirusów pierwotnie hepatotropowych, staje się coraz poważniejszym problemem. Liczba zakażonych na świecie jest duża i stale rośnie. W związku z brakiem lub występowaniem jedynie niespecyficznych objawów, wiele osób nie jest świadomych zakażenia. Do tej pory nie udało się opracować skutecznej szczepionki przeciwko temu wirusowi.

HCV

Odkryty w 1989 r. wirus zapalenia wątroby typu C (HCV – hepatitis C virus), zaliczany jest do rodzaju *Hepacivirus* w obrębie rodziny *Flaviviridae*. Materiał genetyczny wirusa to jednoniciowa, dodatnio naładowana cząsteczka RNA składająca się z 9600 nukleotydów. Ma ona regiony nieulegające translacji (UTR) na końcach 3' i 5' oraz regiony kodujące łącznie 10 białek niestrukturalnych i strukturalnych. Białka niestrukturalne zaangażowane są w namnażanie HCV. Należą do nich: NS1(p7), NS2, NS3 (ma właściwości proteazy serynowej i heli-

kazy RNA), NS4A, NS4B, NS5A (białko odporne na interferon), NS5B (polimeraza RNA zależna od RNA). Do białek strukturalnych, które są odpowiedzialne za tworzenie kapsydu, zalicza się białko rdzeniowe C oraz białka otoczkowe E1 i E2 [28,32,34].

Głównym miejscem replikacji wirusa są komórki wątrobowe. Okazuje się jednak, że rezerwuarem HCV mogą być również inne komórki organizmu, takie jak limfocyty krwi obwodowej, komórki ośrodkowego układu nerwowego czy prezentujące antygen. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest występowanie na ich powierzchni cząsteczki CD81, która może być receptorem wirusa [28,32].

HCV nie działa cytotatycznie. Zakażenie powoduje rozwój procesu zapalnego uszkadzającego hepatocyty i prowadzi do powstania zwłóknień w tkance wątrobowej [14,22,28].

Wyróżnia się sześć genotypów HCV różniących się między sobą w 31-33% sekwencji [32]. Wśród nich wyodręb-

niono ponad 83 subtypy, gdzie różnice w sekwencji mogą sięgać 20-25% [6,32]. W populacji wirusa poszczególne warianty nazwane zostały quasi-species [28,29]. Genotypy 1, 2 i 3 są najczęściej występującymi na świecie, przeważają w Europie i Ameryce Północnej przy czym dominuje genotyp 1 [38]. Afryka i Azja Mniejsza są obszarami częstego występowania 4 i 5 genotypu. W krajach Azji Płd-Wsch. dominuje genotyp 6 [6,32]. Przypuszcza się, że może istnieć 7 lub nawet 8 genotypów HCV [6].

Charakterystyka zakażeń, drogi szerzenia się wirusa i epidemiologia

Na świecie prawie 3% ludności zakażona jest wirusem zapalenia wątroby typu C. Liczba zakażonych w Afryce (5,3%) jest wyższa niż na kontynencie europejskim (1,03%) [2,34,39]. Szacuje się, że w Polsce jest około 700 tys. zakażonych osób (1,9% populacji) [40].

W krajach zachodnich i w USA zakażenia HCV są najczęstszą przyczyną przewlekłego zapalenia oraz marskości wątroby. Są również główną przyczyną przeprowadzania przeszczepów tego narządu na świecie [32]. Wśród pacjentów z chorobami wątroby w Stanach Zjednoczonych, przewlekła postać WZW typu C jest najczęstszą przyczyną śmierci [19].

Głównymi drogami zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C są przetoczenia krwi i preparatów krwiopochodnych, stosowanie przez osoby uzależnione niewysterylizowanych igieł, zabiegi medyczne i dentystryczne, kontakty seksualne [6,22,40]. W Polsce 60-90% zarejestrowanych przypadków zakażeń HCV jest pochodzenia szpitalnego bądź ambulatoryjnego. W przypadku osób uzależnionych od środków dożylnych zakażonych jest 50-90%. Wśród nich częste są przypadki jednoczesnego zakażenia HIV. Również na świecie nierzadko zdarza się, że pacjenci z infekcją HCV, zakażeni są także HIV-1. Szacuje się, że wśród osób HIV-pozytywnych prawie 30% zakażonych jest wirusem zapalenia wątroby typu C [8].

Infekcje wywoływane przez HCV mają postać ostrą lub przewlekłą, jeżeli zakażenie trwa dłużej niż 6 miesięcy. Wirus zaliczany jest do grupy pierwotnie hepatotropowych. Rozwój raka wątrobowokomórkowego u chorych z przewlekłą postacią WZW związany jest prawdopodobnie z długotrwałym procesem zapalnym i powstaniem zmian martwiczych. Najczęściej zakażenie HCV ma przebieg bezobjawowy. Żółtaczką występuje u 30% pacjentów z ostrą infekcją. W przypadku zakażenia przewlekłego, chorzy nie wykazują żadnych objawów lub nieznaczne, dopóki nie rozwinie się marskość wątroby [4,22].

Do rozwoju postaci przewlekłej WZW typu C dochodzi u większości zakażonych, jednak w 15-50% przypadków, przeważnie przy objawowym przebiegu ostrego zapalenia, następuje eliminacja wirusa [2]. Bardzo rzadko natomiast dochodzi do samoistnej eliminacji HCV u osób zakażonych przewlekłe.

Wśród pacjentów, u których rozwinęła się postać przewlekła WZW C u 30% dochodzi do pogorszenia stanu zdrowia prowadzącego do rozwoju marskości wątroby lub raka, u 40% uszkodzenie wątroby jest nieznaczne, u pozostałych 30% chorych występuje wiremia, a uszkodzenia wątroby nie są wykrywalne [32,38]. Progresa choroby u tych osób, następuje częściej w przypadkach nadużywania alkoholu, podeszłego wieku pacjentów oraz wśród chorych płci męskiej. Innymi czynnikami zwiększającymi prawdopodobieństwo postępu choroby jest czas trwania infekcji HCV oraz jednoczesne zakażenie HIV lub HBV. O rozwoju choroby decyduje również genotyp wirusa i poziom wiremii, choć w większości przypadków przewlekłego WZW typu C poziom RNA HCV jest stabilny [12].

Przeciwciała przeciwko HCV są wykrywane 50-60 dni po zakażeniu. Prawdopodobnie nie chronią one przed ponowną infekcją w odróżnieniu od przeciwciał anti-Hbs [32].

Leczenie zakażeń HCV

Standardowa terapia w zakażeniu HCV opiera się na zastosowaniu pegylowanego interferonu α (pegIFN- α) i rybawiryny (RBV). Jej celem jest eradykacja wirusa zmniejszająca prawdopodobieństwo rozwoju marskości wątroby i raka.

Mechanizm działania rybawiryny na wirusa polega prawdopodobnie na jej mutagennym wpływie na polimerazę RNA, co skutkuje zahamowaniem jej funkcji i wcześniejszą terminacją łańcucha. Ma ona również właściwości immunomodulujące [22,32]. Rybawiryna stosowana w monoterapii wykazuje słabe działanie na HCV [32]. Interferony stanowią grupę cytokin, która zaangażowana jest w hamowanie procesu zakażenia wirusowego. Wyróżnia się trzy typy interferonów (I, II oraz III), które są syntetyzowane przez różne komórki organizmu, m.in. limfocyty T, NK, komórki dendrytyczne czy fibroblasty [11].

Modyfikacja cząsteczki interferonu poprzez pegylację, czyli przyłączenie glikolu polietylenowego, poprawia właściwości farmakodynamiczne i farmakokinetyczne leku. Okres wchłaniania zostaje wydłużony, lek jest wolniej metabolizowany i wydalany z organizmu. Dzięki temu terapeutyczne stężenie substancji utrzymuje się dłużej i lek może być podawany rzadziej (iniekcja raz w tygodniu), co jest korzystne dla pacjenta [33].

IFN- α , należący do interferonów typu I, jest cytokiną wytwarzaną głównie przez plazmocytoidalne komórki dendrytyczne. Jego synteza zapoczątkowana jest obecnością cząstek wirusowych, takich jak jedno- lub dwuniciowy RNA, które łączą się z receptorami TLR. Prowadzi to do wzrostu ekspresji genu i nasilenia wydzielania IFN- α [32]. Badania *in vitro* wykazały, że aktywacji ulegają również wszystkie IFN- λ [2,11]. Następnie łącząc się z receptorami typu I, IFN- α bie-

rze udział w inicjacji odpowiedzi przeciwwirusowej, poprzez nasilenie ekspresji genów ISG (interferon-stimulated genes). Należą do nich: 2'-5' OAS, PKR, Mx, a ich produkty mogą być inhibitorami translacji białek wirusa, dwuniciowymi RNA-zami lub białkami destabilizującymi wirusowe mRNA [22]. Istnieją doniesienia, że poziom ekspresji tych genów w wątrobie u osób zakażonych przewlekłe przed zastosowaniem leczenia ma wpływ na wystąpienie odpowiedzi lub jej brak. Nasiloną ekspresja obserwowana jest u pacjentów, którzy słabo odpowiadają na terapię. Odmiennie dzieje się u chorych odpowiadających pozytywnie na terapię skojarzoną pegIFN- α z rybawiryną. Wykazują oni niską ekspresję genów ISG. Nie wiadomo jednak jak brak odpowiedzi na leczenie lub jej wystąpienie, wiąże się z preaktywacją tych genów [10,32,38]. Interferon α oprócz tego, że jest ważnym czynnikiem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej ograniczającej rozprzestrzenianie się infekcji w organizmie, działa również pośrednio na limfocyty T i B [32].

Badania wykazują, że HCV i inne wirusy mające jako materiał genetyczny RNA, wykazują dużą zdolność mutacji [12]. Przyczynia się to do zwiększenia różnorodności w populacji wirusa i pozwala na przystosowanie się do zmiennych warunków środowiska. Patogen zdolny jest nie tylko do uniknięcia efektywnej eliminacji przez komórki immunokompetentne, ale również do modyfikacji odpowiedzi immunologicznej organizmu. Mutacje w materiale genetycznym oraz zdolność do szybkiego namnażania, przyczyniają się do wzrostu oporności HCV na stosowaną terapię [12,29,32].

Efektywność terapii przeciwwirusowej

Pewne czynniki osobnicze mają wpływ na skuteczność leczenia, istotne znaczenie w odpowiedzi ma wiek pacjentów, płeć oraz rasa. Zaobserwowano, że terapia przynosi korzyści pacjentom młodym (poniżej 40 roku życia), płci żeńskiej i należących do rasy białej. W przypadku osób z wysokim BMI, zmianami w wątrobie w postaci zwłóknień lub z marskością - efektywność leczenia spada [2,5,8,20]. Inną przyczyną słabej odpowiedzi na terapię jest występowanie u pacjentów przewlekłe zakażonych HCV oporności na insulinę. Obserwowana jest ona u 25% chorych, a mechanizm jej rozwoju nie został poznany [34]. Terapii nie sprzyja również nadmierne spożycie alkoholu [7].

Ważne znaczenie mają również czynniki wirusowe. Stwierdzono, że poziom RNA wirusa jest najważniejszym czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na terapię, jednak inni autorzy są zdania, że istotniejszy jest genotyp HCV [7,19]. U pacjentów zakażonych genotypem 2, 3 i 6, częściej obserwuje się dobre wyniki leczenia niż u zakażonych genotypem 1 lub 4 [2,6]. O czasie leczenia również decyduje genotyp wirusa. W przypadku zakażeń HCV 1 terapia trwa 48 tygodni, podczas gdy u pacjentów zakażonych genotypem 2 i 3 jest o połowę krótsza [2,19]. Innym czynnikiem

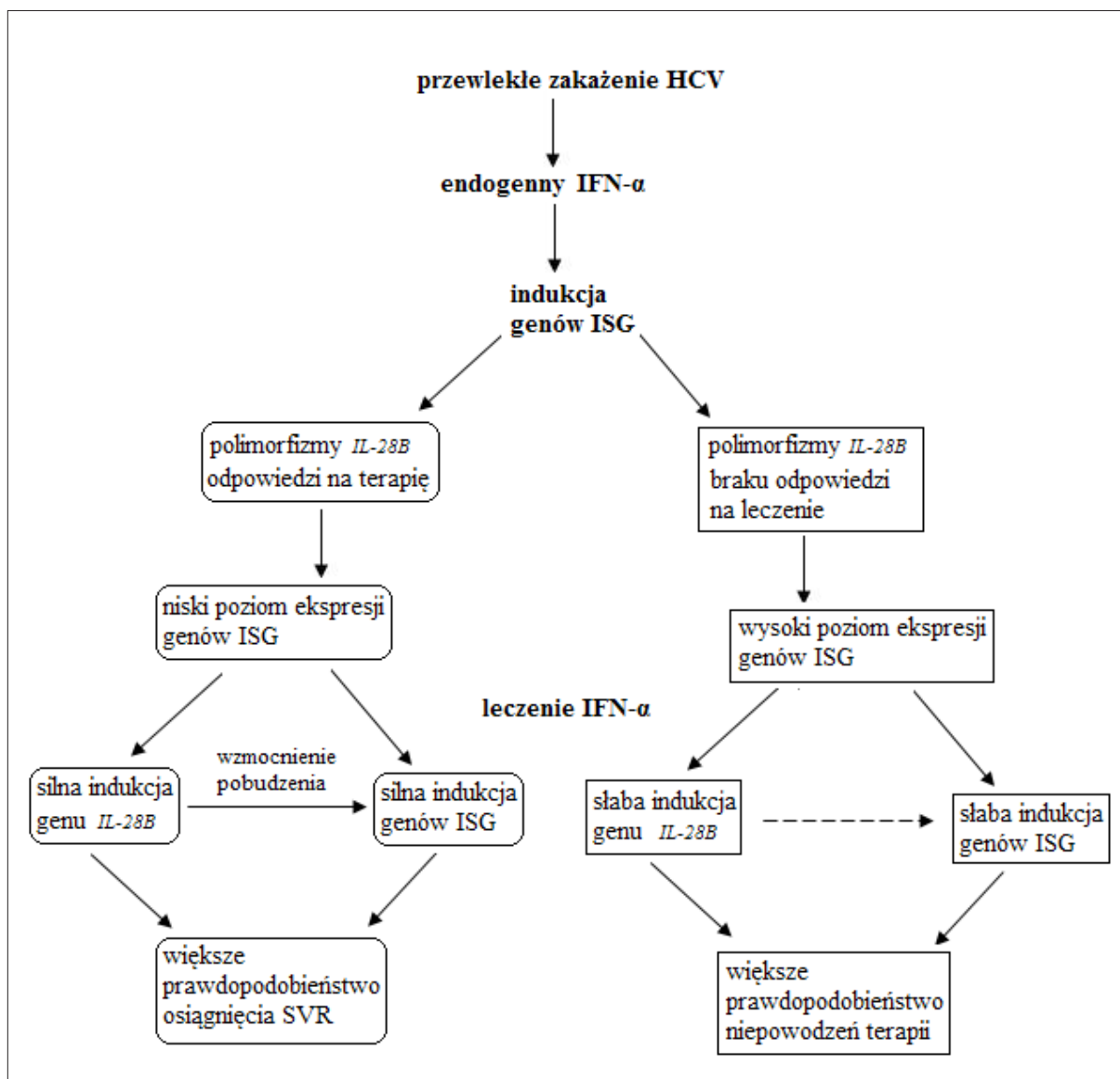
wirusowym, który związany jest ze wzrostem prawdopodobieństwa korzyści z zastosowanej terapii, jest występowanie mutacji w regionie kodującym nie-strukturalne białko 5A. Zjawisko to zaobserwowano u pacjentów z Azji zakażonych genotypem 1 wirusa, jednak nie wykazano tej zależności w badaniach europejskich [7].

Tabela 1. Czynniki osobnicze i wirusowe, mające wpływ na terapię pegIFN/RBV [7]

CZYNNIKI	
Osobnicze	Wirusowe
wiek	genotyp HCV
płeć	poziom RNA HCV
rasa	
BMI	
zwłóknienia w wątrobie/marskość	
oporność na insulinę	
koinfekcja HIV	
polimorfizm IL-28B	

Ocena powodzenia zastosowanej terapii opiera się na parametrze SVR (sustained virological response), określanym jako brak wykrywalności RNA HCV 6 miesięcy po zakończeniu leczenia [5,32]. Trwałą odpowiedź wirusologiczną osiąga 70-84% pacjentów zakażonych HCV 2 i 3, podczas gdy wśród chorych z genotypem 1 SVR występuje rzadziej (40-52%) [2, 20,38]. Zastosowanie IFN- α w monoterapii powoduje wystąpienie SVR tylko u 20% leczonych. Włączenie rybawiryny znacznie poprawia wyniki leczenia (SVR osiągane u 40-45%). Jednak rozpoczęcie terapii skojarzonej pegIFN- α z rybawiryną wiąże się z wystąpieniem trwałej odpowiedzi wirusologicznej u największej liczby pacjentów (54-56%) [5,22].

Do oceny skuteczności leczenia stosowane są również inne parametry. Okazuje się, że brak wystąpienia wczesnej odpowiedzi wirusologicznej EVR (early virological response), definiowanej jako spadek poziomu RNA HCV o wartość większą niż $2 \log_{10}$ w 12 tygodniu leczenia, znacznie zmniejsza możliwość wystąpienia SVR u zakażonych. Dlatego w przypadku takich pacjentów zakażonych genotypem 1 wirusa, terapia powinna zostać przerwana. Innym ważnym parametrem jest RVR (rapid virological response), określanym jako brak RNA wirusa w 4 tygodniu od zastosowania leczenia. RVR jest silnym czynnikiem osiągnięcia SVR u zakażonych genotypem 1, 2 i 3. W przypadku pacjentów, u których wystąpiła wczesna odpowiedź wirusologiczna, ale stwierdzono brak RVR, 90% osiąga SVR [7].



Ryc.1. Model wyjaśniający rolę polimorfizmów *IL-28B* oraz wpływ poziomu ekspresji genów ISG przed leczeniem, na wystąpienie lub brak odpowiedzi terapeutycznej (wg [2] zmodyfikowano)

Inne strategie leczenia

Liczne działania niepożądane standardowej terapii i częste niepowodzenia jej stosowania, zmuszają do poszukiwania nowych leków przeciwwirusowych.

Pewnym rozwiązaniem jest modyfikacja stosowanych powszechnie interferonu i rybawiryny. Przykładami takich leków są Albuferon - połączenie rekombinowanego IFN- α -2b z albuminą i tarybawiryną będącą analogiem RBV. Oba preparaty znajdują się w fazie badań [27,35].

Duże nadzieje polepszenia leczenia zakażonych HCV wiąże się ze stosowaniem inhibitorów proteazy wirusa (NS3/NS4A). Zadaniem tego enzymu jest pocięcie długiego łańcucha białkowego HCV na mniejsze funk-

cjonalne białka [13,35]. Dwa preparaty telaprevir i boceprevir w maju 2011 r. zostały zatwierdzone przez FDA. Badania wskazują, że włączenie tych leków do standardowej terapii pegIFN/RBV (triterapia), przyczynia się do wzrostu liczby wyleczonych pacjentów z SVR (65-75%). Dodatkowo leczenie zostaje skrócone do 24-28 tygodni. Okazuje się, że oba preparaty silnie działają na genotyp 1 HCV uznawany za najbardziej oporny na leczenie. W przypadku innych genotypów działanie tych leków jest słabsze [13,25].

Obieranie za cel terapii RNA wirusa, stwarza wiele problemów ze względu na jego zdolność do szybkiego rozwoju oporności [12]. Podejmowane są próby stworzenia leków mających wpływ na różne etapy cyklu życiowego HCV. Potencjalnym celem może być wiązanie się cząsteczki wirusa do powierzchni hepatocytów dzięki gliko-

proteinom E1 i E2. Inna strategia polega na blokowaniu wejścia do komórki przez potencjalne receptory, takie jak CD81, SR-BI czy receptory LDL. Kolejnymi etapami cyklu życiowego, które mogłyby się stać celem terapii są procesy składania i uwalniania cząstek wirusa [35].

Polimorfizmy w regionie regulatorowym genu *IL-28B* a leczenie zakażeń HCV

Interferony typu III są najpóźniej odkrytą grupą białek, opisano je w 2003 r. i ustalono, że ich głównym źródłem są pDC [26].

Gen *IFN-λ3(IL-28B)* jest umiejscowiony na długim ramieniu chromosomu 19 *locus* q13.13.

W tym samym obszarze znajdują się również geny dwóch pozostałych interferonów tego typu: *IFN-λ2 (IL-28A)* i *IFN-λ1 (IL-29)*. Ta grupa cytokin, wykazuje pewną homologię w sekwencji aminokwasowej. Stwierdzono, że sekwencje *IL-28A* i *IL-28B* są identyczne w 96%. W porównaniu z nimi, sekwencja aminokwasowa *IL-29* jest podobna prawie w 80%.

Geny *IL-28A* i *IL-28B* zawierają 6 eksonów, gen *IL-29* zbudowany jest z pięciu.

IFN typu III różnią się zarówno budową, jak i lokalizacją genów w porównaniu z interferonami typu I (geny zawierające 1 ekson są umiejscowione na chromosomie 9) [11, 23]. Podobieństwo *IFN-λ* do α sprowadza się do działania przeciwwirusowego i immunomodulacyjnego. Zaobserwowano, że *in vitro* *IFN-λ* hamuje bezpośrednio replikację HCV oraz nasila i utrzymuje hamowanie replikacji przez *IFN-α*. Działanie przeciwwirusowe samego interferonu λ jest słabe, ale ulega wzmocnieniu działając z interferonem α [2,26,38]. Badania wskazują, że uzupełnienie standardowego leczenia *IFN-λ3* umożliwiłoby osiągnięcie lepszej odpowiedzi u pacjentów. *IFN-λ3* mógłby też zastąpić *IFN-α* w terapii zakażeń HCV. Zastosowanie pozostałych interferonów typu III również mogłoby przynieść wiele korzyści. Przeprowadzone badania wykazują, że zarówno *IFN-λ1*, jak i *IFN-λ2*, hamują *in vitro* replikację wirusa [2,35].

W 2009 r. zidentyfikowano polimorfizmy SNP w regionie regulatorowym genu *IL-28B*. Ich obecność wpływa na odpowiedź na skojarzoną terapię pegIFN/RBV u pacjentów z przewlekłą postacią WZW C. Trzy niezależne zespoły doszły do podobnych wniosków badając chorych należących do różnych ras i pochodzących z różnych obszarów geograficznych [2,39]. SNP *IL-28B* jest najsilniejszym czynnikiem predykcyjnym osiągnięcia SVR, niezależnym od rasy, poziomu RNA HCV, czy zwłóknienia wątroby. Jednak sam jest niewystarczający w określeniu odpowiedzi na terapię [19,26].

Zaobserwowano, że dwa polimorfizmy mają szczególnie wpływ na wynik leczenia: SNP w pozycji rs12979860 położony 3 kb od genu *IL-28B* oraz SNP w pozycji rs8099917 występujący 8 kb od tego genu.

Nie poznano mechanizmu działania tych polimorfizmów na wynik leczenia. Stwierdzono, że nie mają one bezpośredniego wpływu na funkcję genu, ponieważ nie wiążą się z wystąpieniem np. mutacji nonsensownych. Tym samym nie oddziałują na wytwarzanie białka. Oba SNP mają jednak wpływ na ekspresję genu *IL-28B*, stabilność białka czy splicing mRNA. Być może oddziałują one również na gen *IL-28A*, położony w tym samym obszarze chromosomu 19 [2,30].

Wśród pacjentów zakażonych genotypem 1 HCV, najsilniejszą odpowiedź na leczenie pegIFN/RBV stwierdzono u homozygot C/C rs12979860. Mniejsze prawdopodobieństwo osiągnięcia SVR zaobserwowano przy obecności genotypu C/T, a najmniejsze wśród homozygot T/T. Wynika z tego, że występowanie allele T w miejscu rs12979860 wiąże się z niepowodzeniami standardowej terapii WZW C [2,10,20,26]. Badania przeprowadzone wśród chorych należących do różnych ras wykazały, że allele C predysponujący do odpowiedzi na leczenie, najczęściej jest wykrywany u rasy białej, a najrzadziej u czarnej. Odpowiedź na leczenie u zakażonych rasy czarnej jest słabsza i częściej dochodzi u nich do postępu choroby [14,19].

Polimorfizm C/C rs12979860 związany jest również z szybszym spadkiem poziomu RNA HCV w ciągu 24 godzin od rozpoczęcia leczenia [19].

W przypadku SNP rs8099917 stwierdzono, że pozytywny wynik leczenia jest najbardziej możliwy do osiągnięcia u homozygot T/T, a obecność allele G zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia SVR; obserwacje dotyczyły pacjentów z Europy i Japonii zakażonych genotypem 1 wirusa [2,19]. Z kolei badania nad genotypem 2 i 3 HCV nie dają jednoznacznych wyników o lepszej odpowiedzi na leczenie chorych z SNP rs8099917. Odmienne sytuacja zdarza się przy występowaniu polimorfizmu C/C rs12979860. Dwa badania europejskie wykazały, że pacjenci z tym polimorfizmem mają większe szanse na osiągnięcie trwałej odpowiedzi wirusologicznej [19].

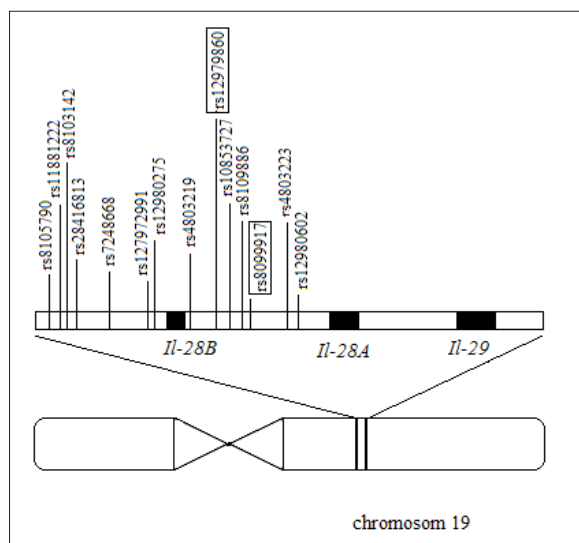
Oba polimorfizmy związane są również z samoistną eliminacją wirusa, przy czym obecność genotypów C/C w pozycji rs12979860 oraz T/T w rs8099917, daje największe szanse na spontaniczne ustąpienie zakażenia. W przypadku heterozygot i homozygot z allele ryzyka, prawdopodobieństwo eliminacji HCV jest mniejsze [2,19,26].

Badanie europejskie wykazały, że wystąpienie wspomnianych polimorfizmów u pacjentów zakażonych jednocześnie HCV i HIV, predysponuje do osiągnięcia SVR [2,19].

Obecność korzystnych polimorfizmów predysponuje również do osiągnięcia RVR – dobrego czynnika predykcyjnego wystąpienia SVR. Zależność tę wykazano u ponad 75% zakażonych rasy białej [9].

Wiedza o obecności polimorfizmów SNP w regionie regulatorowym genu dla IL-28B, oprócz możliwości oceny odpowiedzi na leczenie interferonem, dostarcza informacji o istnieniu genetycznych czynników podatności na zakażenie HCV. U rasy czarnej allele ryzyka występują częściej niż u rasy białej, co może tłumaczyć większą liczbę zakażonych w Afryce – 5,3% niż w Europie – 1,03% [19,34].

Niestety obserwowane są przypadki niepowodzeń terapii, nawet jeżeli u pacjentów były obecne polimorfizmy odpowiedzi na leczenie. Wskazuje to na występowanie innych genetycznych czynników mających wpływ na terapię [2].



Ryc. 2. Lokalizacja polimorfizmów na chromosomie 19 (wg [2])

Terapia personalizowana

Wprowadzenie leczenia u chorych z WZW typu C związane jest z dużymi kosztami i występowaniem działań niepożądanych po zastosowaniu różnych preparatów. Dość często wdrożone leczenie nie przynosi oczekiwanych korzyści. Dlatego dobrą strategią jest indywidualne podejście do pacjenta przez zastosowanie terapii personalizowanej. Leczenie tego typu jest coraz powszechniej stosowane u chorych z nowotworami m.in.: rakiem piersi czy jelita grubego [36,42].

Informacja o obecności polimorfizmów w regionie regulatorowym genu IL-28B pozwala ocenić, którzy pacjenci mogą zostać poddani standardowej terapii, a u których jej włączenie wiązałoby się z miernymi korzyściami. U zakażonych, u których wykryto SNP odpowiedzi na leczenie, możliwe byłoby szybkie zastosowanie właściwej terapii. Dzięki temu postęp choroby mógłby zostać wcześniej zatrzymany. Z kolei u pacjentów z polimorfizmami słabej podatności na leczenie lub jej braku, decyzja o rozpoczęciu standardowej terapii powinna być odpowiednio zweryfikowana. Włączenie lecze-

nia pegIFN/RBV może się wiązać w przypadku tych pacjentów z większymi szkodami niż korzyściami [2,30]. Określenie genotypu SNP przed rozpoczęciem terapii, pozwala na przypisanie pacjentów do pewnych grup:

- Chorzy z genotypem C/C rs12979860, który wydaje się najbardziej korzystnym czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na leczenie, mogą zostać poddani 48-tygodniowej (genotyp 1 HCV) lub 24-tygodniowej terapii (genotypy 2 i 3). Leczenie może zostać skrócone przy korzystnych wynikach.
- Pacjenci z niekorzystnymi genotypami w pozycji rs12979860, u których leczenie pegIFN/RBV trwa 48 lub 72 tygodni, ale może zostać wydłużone [30].

Dzięki zastosowaniu terapii personalizowanej, pacjenci z genotypem braku korzyści z zastosowanego leczenia i postępującą dysfunkcją wątroby, mogliby być wcześniej kwalifikowani do przeszczepów [2].

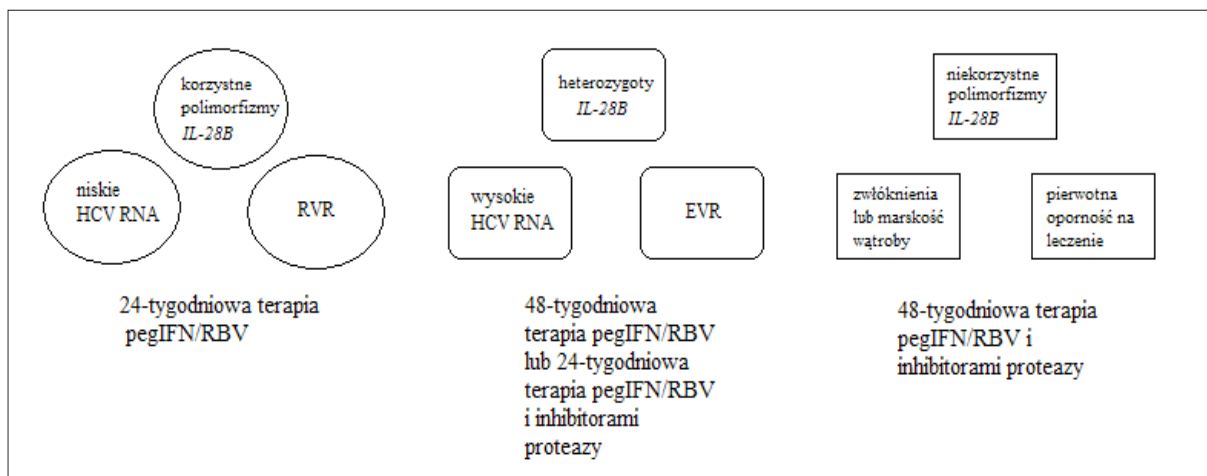
Zastosowanie w leczeniu WZW C rybawiryiny związane jest z wieloma działaniami niepożądanymi, z których najpoważniejszym jest wystąpienie niedokrwistości hemolitycznej. W ludzkim genomie poszukuje się polimorfizmów, które mogą mieć związek z rozwojem niedokrwistości po podaniu RBV. Fellay i wsp. stwierdzili, że SNP w pozycji rs6051702 genu *ITPA* kodującego enzym inozynotrifosfatazę zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia niedokrwistości hemolitycznej. Dzięki temu możliwe jest określenie ryzyka terapii. Stosowanie interferonu powoduje rozwój depresji u niektórych chorych. Być może istnieją polimorfizmy, które wiążą się z jej rozwojem [15].

Medycyna personalizowana umożliwia odpowiednią identyfikację pacjentów, którzy odpowiedzą na leczenie. Dzięki temu możliwe jest uniknięcie stosowania terapii, która nie przyniesie korzyści, a nawet może zaszkodzić choremu. Indywidualne podejście do pacjenta z WZW typu C, umożliwia ustalenie najbardziej odpowiedniego dla niego schematu leczenia, co zwiększa szansę na wyleczenie.

Rola hepcydyny w zakażeniach wirusem zapalenia wątroby typu C

U pacjentów przewlekle zakażonych HCV obserwuje się zwiększone stężenie żelaza, co prowadzi do stanu zapalnego wątroby, sprzyja powstawaniu zwłóknień w tym narządzie i rozwojowi raka wątrobowokomórkowego. Stan ten ma również niekorzystny wpływ na przebieg leczenia przeciwwirusowego [4,17,31]. Istnieją również doniesienia o braku wpływu zwiększonego stężenia żelaza na wynik terapii [17]. Niedawne odkrycie białka hepcydyny, przyczyniło się do zmiany rozumienia metabolizmu żelaza w organizmie. Okazuje się, że hormon ten ma również istotne znaczenie w zakażeniach HCV [24].

Hepcydyna syntetyzowana jest w wątrobie w postaci preprohepcydyny (84 aminokwasy), która następnie jest



Ryc. 3. Indywidualne cechy pacjentów a dobór terapii (wg [9])

przekształcana do prohepcydyny (60 aminokwasów). Do krwi uwalniana jest 25-aminokwasowa aktywna postać [41]. Gen hepcydyny *HAMP* (hepcidin antimicrobial peptide) znajduje się na długim ramieniu chromosomu 19 locus q13.12. Jego ekspresja zależna jest przede wszystkim od stężenia żelaza. Ulega nasileniu przy zwiększonym stężeniu i spada przy niskim stężeniu tego mikroelementu [21]. Stan zapalny i infekcja, podobnie jak przeładowanie żelazem, nasilają wytwarzanie hormonu. Poziom hepcydyny ulega spadkowi w stanach niedotlenienia i przy niedokrwistości [1,3,41].

Hepcydyna reguluje stężenie żelaza w organizmie oddziałując na białko ferroporynę, która znajduje się na powierzchni enterocytów i makrofagów. Poprzez fosforylację reszt tyrozynowych hepcydyna powoduje internalizację, a następnie degradację ferroporyny w lizosomach. W ten sposób zahamowane zostaje uwalnianie żelaza z komórek i spadek jego stężenia we krwi. Przy niedoborze hepcydyny następuje zwiększona absorpcja żelaza z jelit i wypływ z makrofagów [1,3].

Okazuje się, że u pacjentów zakażonych przewlekle HCV poziom hepcydyny jest obniżony, mimo że w przypadku infekcji tego wirusa rozwija się proces zapalny. U chorych prowadzi to do wzrostu stężenia żelaza w wątrobie i surowicy, cięższego przebiegu choroby i niepowodzeń w leczeniu [18,31,37]. Wynika z tego, że HCV może modulować ekspresję genu *HAMP*. Girelli i wsp. przypuszczają, że wirus hamuje ekspresję w początkowej fazie WZW typu C. W miarę rozwoju choroby hamujące działanie HCV zostaje zniesione ze względu na wzrastające stężenie żelaza w organizmie. Wymagane są jednak dalsze badania. Niedobór hepcydyny może również wynikać z zaburzeń w syntezie na skutek redukcji funkcjonalnego miąższu wątroby u pacjentów z marskością. Fujita i wsp. stwierdzili, że poziom ekspresji *HAMP* u pacjentów z WZW typu B, chorobami wątroby na podłożu autoimmunologicznym, czy spowodowanymi nadużywaniem alkoholu, nie jest aż tak niski jak w przypadku chorych na WZW typu C [18].

Jak wykazują badania *in vitro*, IFN- α powoduje wzrost ekspresji genu hepcydyny. Ryan i wsp. wykazali podobną zależność wśród zakażonych HCV, u których zastosowano standardową terapię. Znaczący wzrost ekspresji genu zaobserwowano po 12 godzinach od zastosowania leczenia, a poziom żelaza uległ spadkowi o połowę [37]. Badania Fujita i wsp. udowodniły, że u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na terapię pegIFN/RBV, zaburzenia metabolizmu żelaza były bardziej nasilone, w porównaniu z pacjentami osiągającymi SVR [24]. Przedstawione wyniki wskazują na dodatkowe działanie IFN- α w leczeniu zakażeń HCV.

Girelli i wsp. są zdania, że nowe strategie leczenia mogą się opierać na wyrównywaniu niedoborów hepcydyny u pacjentów poprzez suplementację lub modyfikację ekspresji genu *HAMP* [18].

Nie jest dokładnie poznana rola żelaza w zakażeniach HCV. Badanie *in vitro* wskazują na zwiększenie replikacji wirusa przy wzroście stężenia żelaza [24]. Z kolei inne badania donoszą o odmiennym jego wpływie na HCV. Okazuje się, że jony żelaza wiążą się z polimerazą RNA 5-50 razy silniej niż jon magnezu, doprowadzając do zaburzenia funkcji enzymu i zahamowania replikacji wirusa [4,16].

PODSUMOWANIE

Duże zdolności mutacyjne i replikacyjne HCV utrudniają skuteczne leczenie zakażeń tym wirusem. Liczne działania niepożądane standardowej terapii WZW typu C, skłaniają do poszukiwania lepszych metod leczenia. Duże nadzieje na poprawę skuteczności i warunków prowadzonej terapii wiąże się z indywidualnym podejściem do pacjenta. Wiedza na temat czynników osobniczych i wirusowych mających wpływ na leczenie jest nadal niepełna. Doniesienia dotyczące roli żelaza w zakażeniach HCV są sprzeczne i wymagane są dalsze badania. Nierozwiązana została również kwestia skutecznej szczepionki przeciwko HCV.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abd Elmonem E., Tharwa el S., Farag M.A., Fawzy A., El Shinnawy S.F., Suliman S.: Hepcidin mRNA level as a parameter of disease progression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *J. Egypt Natl. Canc. Inst.*, 2009; 21: 333-342
- [2] Ahlenstiel G., Booth D.R., George J.: IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J. Gastroenterol.*, 2010; 45: 903-910
- [3] Andrews N.C.: Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 2008; 112: 219-230
- [4] Bartolomei G., Cevik R.E., Marcello A.: Modulation of hepatitis C virus replication by iron and hepcidin in Huh7 hepatocytes. *J. Gen. Virol.*, 2011; 92: 2072-2081
- [5] Bhagani S.: Current treatment for chronic hepatitis C virus/HIV-infected individuals: the role of pegylated interferon-alpha and ribavirin. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2011; 6: 483-490
- [6] Chao D.T., Abe K., Nguyen M.H.: Systematic review: epidemiology of hepatitis C genotype 6 and its management. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2011; 34: 286-296
- [7] Chen C.H., Yu M.L.: Evolution of interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hepat. Res. Treat.*, 2010; 2010: 140953
- [8] Ciuffreda D., Kim A.Y.: Update on hepatitis C virus-specific immunity. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2011; 6: 559-565
- [9] Clark P.J., Thompson A.J.: Host genomics and HCV treatment response. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012; 27: 212-222
- [10] Cyr D.D., Lucas J.E., Thompson J.W., Patel K., Clark P.J., Thompson A., Tillmann H.L., McHutchison J.G., Moseley M.A., McCarthy J.J.: Characterization of serum proteins associated with IL28B genotype among patients with chronic hepatitis C. *PLoS One*, 2011; 6: e21854
- [11] Domagalski K., Tretyn A., Pawłowska M., Szczepanek J., Halota W.: Działanie interferonów typu III i ich rola w odpowiedziach immunologicznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 522-533
- [12] Domingo E., Gomez J.: Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res.*, 2007; 127: 131-150
- [13] Dore G.J., Matthews G.V., Rockstroh J.: Future of hepatitis C therapy: development of direct-acting antivirals. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2011; 6: 508-513
- [14] Falleti E., Bitetto D., Fabris C., Cussigh A., Fornasiere E., Cmet S., Fumolo E., Bignulin S., Fontanini E., Cerutti A., Minisini R., Pirisi M., Toniutto P.: Role of interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype. *J. Clin. Immunol.*, 2011; 31: 891-899
- [15] Fellay J., Thompson A.J., Ge D., Gumbs C.E., Urban T.J., Shianna K.V., Little L.D., Qiu P., Bertelsen A.H., Watson M., Warner A., Muir A.J., Brass C., Albrecht J., Sulkowski M., McHutchison J.G., Goldstein D.B.: ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature*, 2010; 464: 405-408
- [16] Fillebeen C., Pantopoulos K.: Iron inhibits replication of infectious hepatitis C virus in permissive Huh7.5.1 cells. *J. Hepatol.*, 2010; 53: 995-999
- [17] Fillebeen C., Rivas-Estilla A.M., Bisailon M., Ponka P., Muckenthaler M., Hentze M.W., Koromilas A.E., Pantopoulos K.: Iron inactivates the RNA polymerase NS5B and suppresses subgenomic replication of hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 9049-9057
- [18] Girelli D., Pasino M., Goodnough J.B., Nemeth E., Guido M., Castagna A., Busti F., Campostrini N., Martinelli N., Vantini I., Corrocher R., Ganz T., Fattovich G.: Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, 2009; 51: 845-852
- [19] Gonzalez S.A., Keeffe E.B.: IL-28B as a predictor of sustained virologic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterol. Hepatol.*, 2011; 7: 366-373
- [20] Halfon P., Bourliere M., Ouzan D., Maor Y., Renou C., Wartelle C., Pénaranda G., Tran A., Botta D., Oules V., Castellani P., Portal I., Argiro L., Desein A.: A single IL28B genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C genotype 1 virus. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2011; 23: 931-935
- [21] Hepcidin antimicrobial peptide. <http://omim.org/entry/606464> (27.05.2012)
- [22] Hoofnagle J.H., Seeff L.B.: Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N. Engl. J. Med.*, 2006; 355: 2444-2451
- [23] Interferon, lambda-3. <http://omim.org/entry/607402> (27.05.2012)
- [24] Jaroszewicz J., Rogalska M., Flisiak I., Flisiak R.: Successful antiviral therapy is associated with a decrease of serum prohepcidin in chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.*, 2010; 16: 1747-1752
- [25] Jesudian A.B., Gambarin-Gelwan M., Jacobson I.M.: Advances in the treatment of hepatitis C virus infection. *Gastroenterol. Hepatol.*, 2012; 8: 91-101
- [26] Kelly C., Klenerman P., Barnes E.: Interferon lambdas: the next cytokine storm. *Gut*, 2011; 60: 1284-1293
- [27] Kwo P.Y., Vinayek R.: The next step for taribavirin. *Hepatology*, 2010; 52: 1185-1188
- [28] Lindenbach B.D., Rice C.M.: Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 2005; 436: 933-938
- [29] Más A., López-Galíndez C., Cacho I., Gómez J., Martínez M.A.: Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *J. Mol. Biol.*, 2010; 397: 865-877
- [30] McHutchison J.G.: The role of genetic markers in hepatitis C virus therapy: a major step for individualized care. *Liver Int.*, 2011; 31 (Suppl. 1): 29-35
- [31] Miura K., Taura K., Kodama Y., Schnabl B., Brenner D.A.: Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology*, 2008; 48: 1420-1429
- [32] Myrmet H., Ulvestad E., Asjøl B.: The hepatitis C virus enigma. *APMIS*, 2009; 117: 427-439
- [33] Niesiobędzka-Krężel J., Paluszewska M.: Pegyłowane interferony. *Współczesna Onkologia*, 2001; 5: 148-151
- [34] Parvaiz F., Manzoor S., Tariq H., Javed F., Fatima K., Qadri I.: Hepatitis C virus infection: molecular pathways to insulin resistance. *Virol. J.*, 2011; 8: 474
- [35] Quer J., Buti M., Cubero M., Guardia J., Esteban R., Esteban J.I.: New strategies for the treatment of hepatitis C virus infection and implications of resistance to new direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist.*, 2010; 3: 133-145
- [36] Roukos D.H.: Systems medicine: a real approach for future personalized oncology? *Pharmacogenomics*, 2010; 11: 283-287
- [37] Ryan J.D., Altamura S., Devitt E., Mullins S., Lawless M.W., Muckenthaler M.U., Crowe J.: Pegylated interferon-alpha induced hypoferrinemia is associated with the immediate response to treatment in hepatitis C. *Hepatology*, 2012; 56: 492-500
- [38] Selvarajah S., Tobler L.H., Simmons G., Busch M.P.: Host genetic basis for hepatitis C virus clearance: a role for blood collection centers. *Curr. Opin. Hematol.*, 2010; 17: 550-557
- [39] Smith K.R., Suppiah V., O'Connor K., Berg T., Weltman M., Abate M.L., Spengler U., Bassendine M., Matthews G., Irving W.L., Powell E.,

Riordan S., Ahlenstiel G., Stewart G.J., Bahlo M., George J., Booth D.R.; International Hepatitis C Genetics Consortium (IHCGC): Identification of improved IL28B SNPs and haplotypes for prediction of drug response in treatment of hepatitis C using massively parallel sequencing in a cross-sectional European cohort. *Genome Med.*, 2011; 3: 57

[40] Stepień M., Rosińska M.: Badania rozpowszechnienia HCV w Polsce – gdzie jesteście? *Przegl. Epidemiol.*, 2011; 65: 15-20

[41] Strnad P., Schwarz P., Rasenack M.C., Kucukoglu O., Habib R.I., Heuberger D., Eehalt R., Müller M.W., Stiehl A., Adler G., Kulaksiz

H.: Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system. *PLoS One*, 2011; 6: e16454

[42] Wheeler D.L., Dunn E.F., Harari P.M.: Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2010; 7: 493-507

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.