

Małgorzata Pawłowska

MECHANIZMY IMMUNOLOGICZNE ZAKAŻEŃ HCV – KIERUNEK POSZUKIWAŃ TERAPEUTYCZNYCH

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Collegium Medicum
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: prof.dr hab.med. Waldemar Halota

W pracy przedstawiono wpływ poszczególnych elementów odpowiedzi immunologicznej gospodarza na historię naturalną zakażeń HCV, poszczególne etapy działania interferonu i ich mechanizmy regulujące oraz przykłady nowych rozwiązań terapeutycznych o działaniu immunomodulacyjnym.

Słowa kluczowe: zakażenie HCV, odpowiedź immunologiczna, interferon

Key words: HCV infection, host immune response, interferon, immunomodulation

Historia naturalna zakażenia HCV uwarunkowana jest wieloma czynnikami, z których największy wpływ na przebieg choroby, a też odpowiedź na leczenie, mają czynniki wirusowe i odpowiedź immunologiczna gospodarza. Szczególną rolę przypisuje się odpowiedzi komórkowej, gdyż odpowiedź humoralna na to zakażenie jest w dużej mierze nieefektywna.

Udział wrodzonej odporności, charakterystyczny dla początkowej fazy zakażenia jest trudny do oceny ze względu na rzadkie wczesne wykrywanie zakażeń HCV, jak też brak modelu zwierzęcego tego zakażenia. W badaniach oceniających wrodzoną odporność na zakażenie HCV wykazano, że u eksperymentalnie zakażonych szympanów już w pierwszym tygodniu po zakażeniu HCV następuje indukcja syntezy IFN a i b w wątrobie. Nie obserwowano jednak obniżenia wirēmii HCV pod wpływem endogennego IFN a i b, pomimo udowodnionej w badaniach „in vitro” wrażliwości systemu replikonu HCV na IFN a. Za potencjalne mechanizmy wyjaśniające oporność na działanie IFN uznaje się interakcje pomiędzy HCV E2 lub ISDR (regionem warunkującym wrażliwość na IFN) sekwencji NS5A genomu HCV z kinazą białkową PKR mediującą efekt przeciwwirusowy IFN, zmienność wspomnianych regionów ISDR, jak też interakcje pomiędzy E2 HCV a CD81 hamujące funkcję komórek NK, czy pomiędzy epitopami rdzenia HCV i receptorami kompleksu gC1qR hamujące odpowiedź limfocytów T na antygeny HCV (1-4).

Obecność wykładników nabytej odporności humoralnej – przeciwciał anti-HCV – obserwuje się najczęściej po okresie 7-8 tygodni od zakażenia HCV. Zwykle wskazuje ona na przewlekłe zakażenie. Rola ochronna tych przeciwciał jest dyskusyjna, także w kontekście możliwości podawania ich biorcom wątroby. W badaniach eksperymentalnych obecne

w organizmie szympanсів przeciwciała monoklonalne anty-HCV nie zapobiegały reinfekcji przez kolejne szczepy tego wirusa, prawdopodobnie wskutek wysokiej zmienności HCV (5). Przewlekanie się procesu chorobowego było ściśle związane z mutacjami HCV, szczególnie w regionie HVR E2.

Jako przyczynę chronicyzacji przyjmuje się także zaburzenia odpowiedzi komórkowej. Udowodniono, że żywa odpowiedź subpopulacji Th1 limfocytów CD4 produkujących IFN-gamma zapewnia zanik replikacji HCV, niższą aktywność aminotransferazy alaninowej, a też mniejsze włóknienie w wątrobie. Zmniejszenie puli limfocytów CD4 np. u zakażonych HIV i HCV niektórzy autorzy wiążą z przyspieszeniem progresji przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Osłabienie tej populacji komórek przed eksperymentalnym ponownym zakażeniem HCV szympanсів powodowało przewlekanie się pierwotnego procesu chorobowego oraz pojawienie się mutantów limfocytów TCD8 (6). W innym badaniu wykazano brak korelacji pomiędzy odpowiedzią HCV-specyficznych limfocytów CD4 w wątrobie a klinicznymi wykładnikami zakażenia HCV (7). Przeciwnie, odpowiedź HCV-specyficznych limfocytów CD8 związana była z zejściem ostrego zakażenia HCV.

Wykazano także, że w przebiegu *hepatitis fulminans* wzmóżona aktywacja limfocytów T CD8 nie jest skorelowana ze wzrostem produkcji IFN gamma, lecz z proliferacją komórek TCD38+ oraz TCD69+, o tzw. „oszołomionym” fenotypie (8,9). Ustąpienie wremii i objawów choroby było skorelowane z pojawieniem się mniej aktywnych limfocytów TCD8, uwalniających dostateczną ilość IFN-gamma, co sugeruje zróżnicowane funkcjonalne tej subpopulacji komórek.

Limfocyty CD4 odgrywają ważną rolę w uwrażliwianiu komórek TCD8 oraz podtrzymywaniu ich odpowiedzi immunologicznej. Komórki CD4 mogą również poprzez stymulację populacji regulatorowych limfocytów o fenotypie CD4CD25 oddziaływać supresyjnie na HCV-specyficzne TCD8. Te ostatnie z kolei posiadają zdolność produkcji immunoregulacyjnych cytokin IL-10 i TGF beta związanych z regulatorowymi limfocytami CD4CD25. Sugeruje się uwzględnienie supresji komórek regulatorowych w strategiach opracowywania szczepionki przeciwko HCV.

Wiele badań potwierdziło związek przewlekłego zapalenia wątroby typu C z upośledzeniem odporności komórkowej oraz mutacjami HCV i ucieczką wirusa spod kontroli immunologicznej gospodarza. Dotychczasowe strategie terapeutyczne pzw C uwzględniają leki o uznanym działaniu immunomodulacyjnym (IFN, rybawiryne). Ze względu jednak na nadal niesatysfakcjonującą skuteczność leczenia, zwłaszcza zakażonych genotypem 1 HCV, poszukiwane są nowe rozwiązania terapeutyczne oparte głównie na oddziaływaniu na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej.

Podstawą aktualnych schematów terapeutycznych pzw C są preparaty interferonu. Interferony stanowią zespół cytokin o działaniu przeciwwirusowym i immunomodulacyjnym. Klasyfikowane są do trzech typów w zależności od łączenia się z określonymi receptorami. Dotychczas w leczeniu wykorzystuje się tylko interferony typu I, które obejmują wiele rodzajów interferonu alfa i jeden interferon beta. Po połączeniu interferonu ze swoim receptorem i indukcji sygnału aktywacji kinaz białkowych Jak 1 i Tyk 2 dochodzi w wyniku fosforylacji do indukcji białek STAT 1 i STAT 2, które po translokacji do jądra komórki wiążą się z p48/IRF-9 tworząc czynnik genów stymulowanych przez IFN (ISGF3) (10). Ten ostatni łączy się z sekwencją odpowiedzi stymulowanej przez IFN (ISRE) genów komórkowych tworząc geny stymulowane przez IFN (ISG). Wspomniana sekwencja ISRE

jest jednocześnie miejscem docelowym działania czynników regulujących działanie interferonu (IRF), indukowanych przez replikację HCV równoległe do indukcji IFN. HCV rozwija wiele mechanizmów interferujących z interferonem na wszystkich poziomach jego działania: łączenie się IFN z receptorem, wpływ na aktywność PKR (E2 HCV), indukcja określonych ISG. Wysoka zdolność mutacji zapewnia mu zdolność unikania kontroli immunologicznej gospodarza, a jednocześnie ekspresji epitopów indukujących powstanie białek regulatorowych, nierzadko o ostatecznym działaniu prowirusowym. Badania replikonu HCV dowodzą istnienia wielu czynników zaangażowanych w kontrolę immunologiczną tego zakażenia. Wykazały one między innymi rolę interakcji pomiędzy PKR i IRF a ISG w hamowaniu replikacji HCV. Kontrola zakażenia HCV jest prawdopodobnie związana ze spektrum zaangażowanych ISG, których setki są wytwarzane przez organizm gospodarza. Ekspresja ISG kodujących białka o określonych właściwościach jest determinowana interakcjami pomiędzy wirusem, a układem immunologicznym gospodarza (11,12). Poznanie roli ISG jako efektorów odpowiedzi przeciwwirusowej, indukowanej w przebiegu zakażenia HCV oraz jego leczenia interferonem wydaje się kluczowym zagadnieniem. Wyjaśnienie, które ISG są indukowane podczas zakażenia HCV, jak różnią się ich sekwencje u leczonych IFN w zależności od odpowiedzi na leczenie i jaki mechanizm molekularny warunkuje to zróżnicowanie może przyczynić się do opracowania nowych metod terapii (13,14).

Ekspresja IFN alfa i ISG w odpowiedzi na zakażenie HCV doprowadza do aktywacji pierwszej linii obrony, jaką pełnią komórki NK i NKT. Zaktywowane NK i NKT wydzielają interferon-gamma, który może wpływać na hamowanie replikacji HCV (15). Pozostaje nadal niewyjaśnione, które z wymienionych komórek odgrywają główną rolę we wrodzonej odporności na zakażenie HCV. Należy także rozważyć rolę receptorów *toll-like* (TLR) ekspozowanych w różnych kombinacjach na powierzchni komórek dendrytycznych pełniących rolę komórek prezentujących antygen. Prawdopodobnie epitopy wirusowe stymulują komórki dendrytyczne poprzez powiązanie cytosolowe receptorów toll, (TLRs7-9) (16). Oligonukleotydy CpG wiążące się z pewnymi receptorami *toll-like* (TLR-9) i tym samym stymulujące komórki B i komórki dendrytyczne, czy isatorbina – agonista receptora TLR-7 są przedmiotem badań w kontekście wykorzystania ich właściwości immunomodulacyjnych (17).

Miejsce interferonu w leczeniu przewlekłych zapaleń wątroby typu C uzasadnia prowadzenie badań eksperymentalnych, jak i klinicznych, oceniających bezpieczeństwo, tolerancję i skuteczność innych niż alfa interferonów.

W badaniach „in vitro” wykazano, że *consensus interferon* (CIFN) posiadał większą zdolność łączenia się z receptorem, stymulacji ISG oraz indukcji NK w porównaniu do interferonów alfa 2a (18). W badaniach klinicznych CIFN podawany codziennie z rybawiryną był skuteczny u 40% nie odpowiadających na leczenie IFN+R oraz u 25% nieodpowiadających na leczenie pegylowanym IFN+R (19). Obecnie prowadzone są wielośrodkowe badania oceniające skuteczność i tolerancję terapii indukcyjnej CIFN.

Podobnie do CIFN, wysoką potencjalną aktywność przeciwwirusową i immunomodulacyjną przypisano interferonowi-gamma. Synergistyczne działanie IFN-gamma i IFN alfa przedstawił w badaniu eksperymentalnym Blatt i wsp. (20). Prowadzono także badanie oceniające tolerancję i skuteczność podawania CIFN i IFN-gamma u pacjentów, którzy nie uzyskali EVR w standardowym leczeniu pzw C (21).

W trakcie badań klinicznych znajdują się także interferon omega oraz interferon alfa połączony z albuminami, obydwa zaliczane do typu I interferonów. Ze względu na nie do końca wyjaśniony mechanizm działania wspomagającego układ odpornościowy gospodarza prowadzone są badania różnych leków o działaniu immunomodulacyjnym (np. histaminy, tymozyny, amantadyny) w kontekście leczenia zakażeń HCV. Przyszłość pokaże, czy zastosowanie nowych leków przyczyni się do wzrostu skuteczności leczenia pzw C.

M Pawłowska

HCV: IMMUNE RESPONSE AND ITS MODIFIERS IN CLINICAL DEVELOPMENT

SUMMARY

Host immunological response is one of the major factors determining natural history of HCV infection. Disturbances of cellular immune response, especially dynamic Th1/Th2 balance and Th2 response domination seems to be the reason of HCV persistence. Recent therapeutic strategies based on immunomodulatory agents like interferon and ribavirin. Interferon action is regulated by many factors including immunological. In the work the results of experimental and clinical trials evaluating safety, tolerance and efficacy of interferon others as alpha were described. While the mechanism of immune modifiers is not clearly understood, various immunomodulatory agents are being studied for HCV-infected patients.

PIŚMIENNICTWO

1. Gale M, Blakley CM, Kwieciszewski B, i in. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanism of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998;18:5208-5218.
2. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, i in. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110.
3. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195:43-49.
4. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, i in. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-1249.
5. Farci P, Alter HJ, Govindajaran S, i in. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992;258:135-40.
6. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, i in. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003;302:659-669.
7. Schirren CA, Jung MC, Gerlach JT, i in. Liver-derived hepatitis C virus (HCV) – specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma. *Hepatology* 2000;32:597-603.
8. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR. Analysis of successful immune response in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-1512.
9. Thimme R, Oldach D, Chang KM. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-1406.
10. Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:255-281.
11. Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R, i in. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4650-4655.

12. Wang C, Pflugheber J, Sumpter R, i in. Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2003;77:3898-3912.
13. Gale M. Effector genes on interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* 2003;37:975-978.
14. Katze MG, He J, Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:675-687.
15. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91.
16. Kanto T, Hayasi N. Measuring immunity in viral hepatitis. *J Gastroenterol* 2004;39:709-716.
17. Horsmans H, Berg T, Desager JP, i in. Isatorbine, a toll-like receptor 7 agonist, significantly reduced plasma viral load in clinical proof-of-concept study in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:282A.
18. I. Ozes ON, Reiter Z, Klein S, i in. A comparison of interferon-Con1 with recombinant interferons-alpha: antiviral, antiproliferative and natural killer-inducing activities. *J Interferon Res* 1992;12:55-59.
19. Keiser S, Hass H, Gregor M. Successful retreatment of peginterferon nonresponder patients with chronic hepatitis C with high dose consensus interferon induction therapy. *DDW 2004 New Orleans Abstr* 106346.
20. Blatt LM, Tan H, Hong J, i in. Synergistic effects of type 1 (Infergen) and type 2 (Actimmune) interferons in preclinical models of HCV: demonstration of potential efficacy. *Hepatology* 2003;38(Suppl.1):296A.
21. Leevy CB, Ramaraju G, Chalmers C, i in. Interim results of a pilot study of the combination of type 1 (IFN alfacon-1) and type @ (IFN-gamma) interferons in chronic hepatitis C patients who have failed to respond to peg-interferon alpha2 plus ribavirin. *Gastroenterology* 2004;126 (Suppl.2):A-667.

Adres autora:

Dr hab. med. Małgorzata Pawłowska
Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM UMK
ul. Floriana 12, 85-030 Bydgoszcz
tel./fax (52) 322 48 70
e-mail: kikchzak@cm.umk.pl