

Ewa Majda-Stanisławska¹, Małgorzata Sidorkiewicz² Barbara Józwiak², Anna Pietrzak³, Ewa Brzezińska-Błaszczyk³

**PÓŹNA SAMOISTNA ELIMINACJA HCV-RNA Z KOMÓREK
JEDNOJĄDRZASTYCH KRWI OBWODOWEJ PO SKUTECZNYM
LECZENIU PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C***

¹Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik Kliniki: Jan Kuydowicz

²Zakład Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik Zakładu: Jacek Bartkowiak

³Zakład Immunologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik Zakładu: Ewa Brzezińska-Błaszczyk

W pracy omówiono zjawisko przetrwania materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu C w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u 8 dzieci, u których po leczeniu przeciwwirusowym doszło do trwałej eliminacji tego wirusa z surowicy krwi. Analizowano wpływ tego zjawiska na zdolność syntezy i wydzielania cytokin: IL-18, IL-12 oraz IFN- γ przez pobudzone limfocyty zawierające HCV.

Słowa kluczowe: zapalenie wątroby typu C, komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
Key words: hepatitis C, peripheral blood mononuclear cells

WSTĘP

Jakościowe oznaczenie obecności materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV-RNA) w surowicy krwi za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy, poprzedzonej odwróconą transkrypcją (RT-PCR) jest badaniem decydującym o rozpoznaniu zakażenia tym wirusem. Uzyskanie ujemnego wyniku takiego badania bezpośrednio po zakończeniu leczenia oraz 24 tygodnie później daje podstawy do zdiagnozowania remisji choroby. Rutynowe schematy postępowania nie przewidują poszukiwania HCV-RNA w innych niż surowica materiałach biologicznych, pomimo, że jest on obecny w trakcie choroby także np. wewnątrz hepatocytów, komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC), komórek dendrytycznych. Tymczasem obecność HCV-RNA w tych komórkach

* Praca została wykonana dzięki funduszom Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – grant nr 502-11-780, nr 502-11-348.

może wiązać się z ryzykiem ponownego pojawienia się wirusa w surowicy krwi i nawrotu choroby (1).

Celem pracy była prospektywna obserwacja zjawiska przetrwania HCV-RNA w PBMC u dzieci, u których po leczeniu przeciwwirusowym doszło do trwałej negatywizacji HCV-RNA z surowicy krwi. Celem było także stwierdzenie, czy obecność wirusa zapalenia wątroby typu C w PBMC wpływa na komórkową odpowiedź immunologiczną po pobudzeniu ich fitohemaglutyniną (PHA).

PACJENCI I METODY

Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badania (RNN/33/03/KE). Ośmioro dzieci (3 dziewczynki i 5 chłopców), u których w rok po skutecznym leczeniu pzw C stwierdzono obecność HCV-RNA w PBMC, poddano obserwacji: co rok oznaczano u nich HCV-RNA w surowicy krwi, co rok lub co 2 lata w PBMC. Dzieci przed podjęciem leczenia diagnozowano i obserwowano w Klinice Chorób Zakaźnych przez co najmniej 6 miesięcy; diagnostyka obejmowała m.in. biopsję gruboigłową wątroby, oznaczenia HCV-RNA w surowicy krwi, które przed leczeniem było u wszystkich dzieci stale dodatnie. Sześcioro dzieci leczono Interferonem alfa 2b w dawce 3 MIU, 3 x w tygodniu podskórnie oraz rybawiryną 15 mg/kg masy ciała doustnie codziennie; kuracja trwała 48 tygodni. U dwojga dzieci stosowano monoterapię: Interferon alfa n-1 w dawce 3 MIU, 3 x w tygodniu podskórnie przez 48 tygodni. U wszystkich tych dzieci uzyskano normalizację aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej (ALT i AST) oraz negatywizację HCV-RNA w surowicy krwi w badaniach po pierwszych sześciu miesiącach leczenia; parametry te miały w/w cechy po leczeniu i przez cały okres obserwacji u sześciorga dzieci, natomiast u dwóch chłopców doszło w jednorazowym oznaczeniu do ponownego pojawienia się HCV-RNA w surowicy krwi, przy prawidłowych aktywnościach ALT i AST i obecności HCV-RNA w PBMC. Rutynowe diagnostyczne badania HCV-RNA w surowicy krwi dzieci przed, w trakcie i po leczeniu przeprowadzano za pomocą RT-PCR (Cobas Amplificor HCV v2.0; Roche Molecular Systems). Dzieci objęte obserwacją nie miały, poza zapaleniem wątroby typu C, innych przewlekłych schorzeń.

Celem wykrycia HCV-RNA wewnątrz komórek, PBMC izolowano z 5 ml świeżej, pobranej na cytrynian krwi poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Histopaque 1077 (Sigma) w temperaturze pokojowej przy 400 g. Frakcję komórek odpowiadającą PBMC zbierano, a następnie izolowano z niej RNA za pomocą ekstrakcji tiocyjanian guanidynifenol-chlorform opartej na metodzie Chomczyńskiego (2). RNA oznaczano jednocześnie w surowicy krwi i PBMC przeprowadzając w jednej próbówce odwrotną transkrypcję RNA oraz PCR przy użyciu starterów swoistych dla niekodującego regionu 5' genomu HCV, z zastosowaniem metody opisanej przez Dulaka i in. (3). Produkt pierwszej reakcji poddawano gniazdowej PCR (UNO Biometra, Germany), uzyskując w przypadkach HCV RNA-pozytywnych jako końcowy produkt PCR, fragment DNA o długości 278 pz.

Oznaczano wydzielanie cytokin: IL-18, IL-12 oraz IFN- γ przez pobudzone PHA komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pobrane w różnym okresie po leczeniu. Wszystkie dzieci w dniu pobrania próbek w przedmiotowym badaniu lekarskim nie wykazywały cech infekcji, a oznaczone u nich wartości CRP były w granicach norm laboratoryjnych. W celu wykonania badania cytokin, oddzielną próbkę 5 ml krwi obwodowej pobierano na hepar-

nę i wirowano w gradiencie gęstości Histopaque 1077 (Sigma). Komórki umieszczono w płynie hodowlanym RPMI 1640 (Sigma) z dodatkiem 10% FCS – surowicy płodowej cielęcej (Sigma) i 5 µg PHA i hodowano przez 72 godziny w cieplarni z dodatkiem 5% CO₂ w temperaturze 37°C, po czym je wirowano, a w zebranych supernatantach oznaczano stężenia cytokin (IL-12, IL-18 IFN-γ) metodą immunoenzymatyczną, przy użyciu testów ELISA (R&D Systems dla IL-12 i IFN-γ oraz MBL dla IL-18).

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statgraphics plus 2.0 for Windows, Wartość $p < 0,05$ uznano za statystycznie znamienne.

WYNIKI

Eliminację HCV-RNA z PBMC stwierdzono w sześcioletniej obserwacji u wszystkich ośmiorga dzieci. Wyniki badania obecności HCV-RNA w PBMC w kolejnych oznaczeniach przedstawiono w tabeli I. U dwojga dzieci (5 i 6), już po uznaniu u nich trwałej eliminacji wirusa z krwi po leczeniu, HCV-RNA było jednorazowo wykrywalne jednocześnie w PBMC i w surowicy krwi, lecz nie obserwowano u nich nawrotu zapalenia wątroby.

Tabela I. Oznaczenia HCV-RNA w PBMC po zakończonym leczeniu przeciwwirusowym
Table I. Assignment of HCV-RNA in PBMC after antiviral treatment

Nr	Płeć	Zakończenie leczenia (rok)	Rodzaj terapii	HCV-RNA w PBMC dodatni (rok)	HCV-RNA w PBMC ujemny (rok)	Eliminacja HCV-RNA z PBMC (rok) oraz liczba lat od zakończenia leczenia*
1	K	1997	IFN	1998, 2002	2003, 2004	2003 / 6
2	K	1998	IFN	1999, 2001	2003, 2004	2002 / 4
3	M	1999	IFN+R	1999, 2000, 2003	2004	2004 / 5
4	M	2000	IFN+R	2002	2004	2003 / 3
5	M	2000	IFN+R	2001, 2003	2004	2004 / 4
6	M	2001	IFN+R	2003	2004	2004 / 3
7	K	2001	IFN+R	2003	2004	2004 / 3
8	M	2001	IFN+R	2003	2004	2004 / 3

*W przypadku oznaczenia HCV-RNA w PBMC co 2 lata, przyjęto, że do jego eliminacji doszło w pośrednim roku pomiędzy oznaczeniami

W tabeli II przedstawiono wyniki badań komórkowej odpowiedzi immunologicznej po stymulacji PHA w różnych okresach po leczeniu.

U trojga dzieci (4,6,7) udało się uzyskać PMC do hodowli i oznaczenia ich aktywności wydzielniczej w okresie, gdy zawierały one materiał genetyczny wirusa oraz po tym, jak został on z nich wyeliminowany. Uzyskane od tych dzieci PBMC zakażone HCV syntetyzowały i wydzielaly od 40% do 56% więcej IFN-γ niż komórki niezakażone wirusem. Podobnie było w przypadku IL-12; jej synteza i wydzielanie przez limfocyty zakażone HCV była o 20% do 49% większa niż przez komórki niezakażone. Porównanie średnich stężeń IFN-γ wydzielanych przez PBMC zawierające i niezawierające HCV-RNA wykazało statystycznie znamienne różnice, odpowiednio: 1221 ± 458 pg/ml vs. 651 ± 147 pg/ml;

Tabela II. Stężenia cytokin wydzielanych przez pobudzone fitohemaglutyniną (PHA) komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w zależności od przetrwania w nich HCV-RNA

Table II. Concentrations of cytokines secreted by PHA-stimulated PBMC according to HCV-RNA persistence

Numer dziecka/płeć	IFN- γ (pg/ml)		IL-12 (pg/ml)		IL-18 (pg/ml)	
	HCV (+)	HCV (-)	HCV (+)	HCV (-)	HCV (+)	HCV (-)
6 / M	942	532	19,3	7,1	21,3	0
7 / K	1837	731	27,1	5,4	15,5	21,0
4 / M	1521	754	17,1	8,4	0	18,2
2 / K	n.b.*	754	15,4	n.b.	n.b.	0
5 / M	688	nb	8,4	n.b.	29,9	n.b.
8 / M	n.b.	405	n.b.	0	n.b.	0
3 / M	1120	n.b.	43,7	n.b.	37,4	n.b.
1 / K	n.b.	735	n.b.	7,3	n.b.	12,3

* n.b. – nie badano

$p=0,009$. Podobną różnicę stwierdzono w odniesieniu do IL-12: średnie stężenie tej cytokiny wydzielanej przez zakażone wirusem PBMC wynosiło $21,8 \pm 12,3$ pg/ml, a przez komórki niezakażone $5,6 \pm 3,3$ pg/ml; $p=0,009$. Natomiast wydzielanie IL-18 zarówno u tych dzieci, jak i u pozostałych jest zmienne, u niektórych nieoznaczalne, i nie można znaleźć wyraźnej zależności pomiędzy obecnością wirusa w PBMC a średnim stężeniem wydzielanej przez nie tej cytokiny ($p=0,12$).

DYSKUSJA

Zjawisko przetrwania HCV-RNA w PBMC u 8 seronegatywnych dzieci, które omówiliśmy w niniejszej pracy zauważono już wiele lat temu: wiązano je z obecnością przeciwciał anti-HCV przy niewykrywalnym HCV-RNA w surowicy krwi (4). Sugerowano, że jest ono efektem zanieczyszczenia lub biernej absorpcji wirusa do komórek, u tych pacjentów, u których stężenie HCV-RNA w surowicy jest poniżej czułości metody stosowanej do jego wykrycia (5). Zastosowanie metody RT-PCR wykrywającej ujemne nici wirusowego RNA znacznie zwiększyło czułość wykrywania HCV w PBMC (6) oraz pozwoliło na potwierdzenie replikacji HCV (7,8), nawet jeśli jest to replikacja na niewielkim poziomie (9). W niniejszej pracy opisaliśmy przetrwanie HCV-RNA w PBMC, badane jedynie przy zastosowaniu metody wykrywającej nic dodatnią. Powtarzalność wyników u tego samego pacjenta, jednoczesne oznaczanie HCV-RNA w surowicy i PBMC (RT-PCR Uno Biometra), wielokrotne potwierdzenie nieobecności HCV-RNA w surowicy za pomocą bardzo czulej metody (RT-PCR Cobas Amplicor HCV 2.0 Monitor), wykrywającej zaledwie 50 IU wirusa, potwierdzają założenie o wewnątrzkomórkowym przetrwaniu HCV.

O ile nam wiadomo, jest to pierwsze doniesienie na temat spontanicznej eliminacji HCV-RNA z PBMC u dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. W kilkusobowych grupach dorosłych wykazano podobne zjawisko w 2 do 4 lat po leczeniu (10). HCV-RNA było także obecne przez ponad rok w limfocytach hodowanych in vitro (11). Leczenie pzwC doprowadza do zmniejszenia się liczby cząstek HCV nie tylko w surowicy, ale także w PBMC, przy czym leczenie skojarzone jest w obu wypadkach bardziej skuteczne

niż monoterapia (12). U opisywanej przez nas dziewczynki (pacjent nr 1), u której uzyskano remisję po monoterapii IFN- α , potrzeba było aż 6 lat dla uzyskania spontanicznej eliminacji HCV-RNA z PBMC. Wieloletni okres, w którym materiał genetyczny HCV jest wykrywalny w PBMC a także w innych materiałach biologicznych jak makrofagi, skrawki wątroby czy tkanki mózgowej, przemawia za dużą ostrożnością w rozpoznawaniu remisji zapalenia wątroby typu C tylko na podstawie jego nieobecności w surowicy (1,13). Krótkotrwały nawrót obecności HCV-RNA w surowicy krwi obserwowany był u dwóch najszybszych pacjentów, możliwy jest też nawrót pełnoobjawowego zapalenia wątroby (14).

W niniejszej pracy wykazano zwiększoną sekrecję IFN- γ oraz IL-12 przez stymulowane PHA komórki zawierające HCV-RNA w porównaniu z sekrecją tych cytokin przez komórki niezawierające wirusa. Odpowiedź komórkowa (zarówno w zakresie limfocytów CD4+ jak i CD8+) gra decydującą rolę w eliminacji HCV (15). Stwierdzono, że PBMC pochodzące od pacjentów niereagujących na leczenie przeciwwirusowe wykazują upośledzoną odpowiedź proliferacyjną oraz mają obniżoną zdolność do wydzielania cytokin Th-1 po stymulacji PHA (16), a także po stymulacji antygenami HCV – specyficznymi (17). Dodanie IL-12 do hodowanych *in vitro* PBMC zakażonych HCV silnie stymulowało ich odpowiedź proliferacyjną (18). Wykazano, że pacjenci, którzy są zdolni do eliminacji HCV z surowicy krwi, wykazują przed leczeniem większe stężenia IFN- γ w surowicy krwi (19), a także pochodzące od nich PBMC wydzielają po pobudzeniu więcej IFN- γ jak i IL-12 niż PBMC pochodzące od pacjentów nieodpowiadających na leczenie (20). Jednocześnie po skutecznym leczeniu dochodzi u nich do redukcji ekspresji IFN- γ przez limfocyty T (21). Zwiększona zdolność do wydzielania IL-12 oraz IFN- γ przez PBMC pochodzące od najszybszych pacjentów mogła *per analogiam* doprowadzić do samoistnej eliminacji HCV z tych komórek.

IL-18 nazywana jest czynnikiem indukującym wytwarzanie IFN- γ (25), tymczasem w naszych obserwacjach zwiększonemu wytwarzaniu IFN- γ przez komórki zakażone HCV, nie towarzyszyło wzmożenie sekrecji tej cytokiny. Stymulacja wytwarzania IFN musi się zatem odbywać na innej drodze.

WNIOSKI

Przetrwanie HCV-RNA w PBMC u pacjentów seronegatywnych jest zjawiskiem przemijającym, niemniej w przypadku jego stwierdzenia wskazana jest wieloletnia obserwacja pacjenta po leczeniu, ze względu na możliwość reserokonwersji. Obecność HCV-RNA powoduje pobudzenie komórkowej odpowiedzi immunologicznej limfocytów, w zakresie wzrostu zdolności wytwarzania IFN-g oraz IL-12, co prowadzić może do samoistnej eliminacji materiału genetycznego HCV z tych komórek.

E Majda-Stanisławska, M Sidorkiewicz, B Józwiak, A Pietrzak, E Brzezińska-Błaszczyk

LATE SPONTANEOUS ELIMINATION OF HCV-RNA FROM MONONUCLEAR
CELLS DERIVED FROM PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH
CHRONIC HEPATITIS C

SUMMARY

The aim: To follow persistence of HCV-RNA in PBMC in patients with chronic hepatitis C (CHC). To estimate the influence of this phenomenon on the cellular immune response of peripheral blood lymphocytes. Material and methods: 8 HCV-RNA in PBMC positive children, with undetectable serum HCV-RNA after antiviral treatment, have been examined every 2-3 years. The amount of IFN- γ , IL-12 and IL-18 secreted by PBMC obtained from the children after stimulation with phytohemagglutinin (PHA) was measured. Results: Spontaneous elimination of HCV-RNA from PBMC in 2 to 6 years after treatment was found in all children. In two children HCV-RNA detectable both in serum and in PBMC, without recurrence of hepatitis, was found in single examination. PBMC containing HCV-RNA secreted more IFN- γ than PBMC lacking it (1221 ± 458 pg/ml vs. 651 ± 147 pg/ml; $p=0.009$, similar correlation was revealed with the regard of IL-12: 21.8 ± 12.3 pg/ml vs. 5.6 ± 3.3 pg/ml respectively; $p=0.009$. Production and release of IL-18 were not correlated with HCV-RNA persistence ($p=0.12$). Conclusion: Patients with CHC and persistence of HCV-RNA in PBMC require longitudinal follow-up in the respect of possible reseroconversion. PBMC containing HCV-RNA reveal enhanced cellular immune response, which most probably effects in spontaneous elimination of the virus.

PIŚMIENNICTWO

1. El-Awady MK, Abdel Rahman MM, Ismail SM, i in. Prediction of relapse after interferon therapy in hepatitis C virus-infected patients by the use of triple assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:68-73.
2. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
3. Dulak J, Funk H. Quantitative PCR reaction in the diagnostic of chronic hepatitis C. *Hepatol Pol* 1996;3:31-9.
4. Caudai C, Padula MG, Bastianoi I, i in. Antibody testing and RT-PCR results in hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-RNA detection in PBMC of plasma viremia – negative HCV-seropositive patients. *Infection* 1998;26:151-4.
5. Meier V, Mihm S, Braun Wietzke P, i in. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? *World J Gastroenterol* 2001;7:228-34.
6. El-Awady MK, Ismail SM, El-Sagheer M, i in. Assay for hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells enhances sensitivity of diagnosis and monitoring of HCV-associated hepatitis. *Clin Chim Acta* 1999;283:1-14.
7. 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.
8. Mazur W, Mazurek U, Jurzak M, i in. Positive and negative strands of HCV RNA in sera and peripheral blood mononuclear cells of chronically hemodialysed patients. *Med Sci Monit* 2001;7:108-15.

9. Lin L, Fevery J, Hiem Yap S. A novel strand-specific RT-PCR for detection of hepatitis C virus negative-strand RNA (replicative intermediate): evidence of absence or very low level of HCV replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods* 2002;100:97-105.
10. Garcia-Bengoechea M, Basaras M, Barrio J, i in. Late disappearance of hepatitis C RNA from peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C in sustained response after alpha-interferon therapy. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1902-5.
11. Cheng J, Chen L, Tong W. Persistence of hepatitis C virus type II in patient's peripheral blood B lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2000;80:349-53.
12. Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, i in. A potent antiviral effect on hepatitis C viral dynamics in serum and peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with high-dose daily interferon alfa plus ribavirin and intravenous twice-daily treatment with interferon beta. *Hepatology* 2001;34:377-84.
13. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, i in. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:168-70.
14. Laskus T, Radkowski M, Wilkinson J, i in. The origin of hepatitis C virus reinfecting transplanted livers: serum-derived versus peripheral blood mononuclear cells derived virus. *J Infect Dis* 2002;185:417-21.
15. Ward S, Lauer G, Isba R, i in. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp. Immunol* 2002;128:195-2.
16. Sarih M, Bouchrit N, Benslimane A. Different cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from patients with persistent and self-limited hepatitis C virus infection. *Immunol Lett* 2000;74:117-20.
17. Hempel G, Galle PR, Lohr HF. Quantitative analysis of specific Th1/Th2 helper cell responses and IgG subtype antibodies in interferon-alpha-treated patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2001;64:340-9.
18. Schlaak JF, Pitz T, Lohr HF, i in. Interleukin 12 enhances deficient HCV-antigen-induced Th 1-type immune response of peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1998;56:112-7.
19. Amati L, Cardonna L, Magrone T, i in. Modifications of the immune responsiveness in patients with hepatitis C virus infection following treatment with IFN-alpha/ribavirin. *Curr Pharm Des* 2002;8:981-93.
20. Bergamini A, Bolacchi F, Cepparulo, i in. Treatment with ribavirin and interferon-alpha reduces interferon-gamma expression in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol* 2001;123:459-64.
21. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003;73:213-24.

Otrzymano: 14.11.2005 r.

Adres autora

Dr n. med. Ewa Majda-Stanisławska
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Kniaziewicza 1/5, 91-347 Łódź
tel. (0-42) 659 52 22, fax (0-42) 659 58 18
e-mail: jsstan@lodz.home.pl