

Agnieszka Pawełczyk, Marta Polańska*, Elżbieta Kisiel**, Marcin Chmielewski*, Iwona Bukowska*,
Maria Fic*, Marek Radkowski**

REPLIKACJA WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV) W SZPIKU KOSTNYM PACJENTÓW Z ZABURZENIAMI HEMATOLOGICZNYMI***

REPLICATION OF HCV IN BONE MARROW OF PATIENTS WITH HAEMATOLOGICAL DISORDERS

*Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik: Marek Radkowski

** Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Kierownik: Krzysztof Warzocha

STRESZCZENIE

Celem pracy było zbadanie replikacji HCV w komórkach szpiku kostnego pacjentów, z zaburzeniami hematologicznymi.

Materiał badany stanowiły próbki surowicy krwi, PBMC oraz szpiku kostnego pochodzącego od 27 pacjentów ze stwierdzonym: chłoniakiem, małopłytkowością, niedokrwistością, hemofilią, pancytopenią oraz AML.

Przy użyciu metody RT - PCR, we wszystkich badanych próbach surowicy, stwierdzono występowanie HCV-RNA. Pozytywne wyniki analizy próbek PBMC oraz szpiku kostnego uzyskano odpowiednio w 9 (33%) i 17 (63%) przypadkach. Niezależnie od rodzaju zaburzeń hematologicznych u 5 (18.5%) pacjentów wykazano obecność HCV-RNA w surowicy i szpiku kostnym, przy jednoczesnym braku materiału genetycznego wirusa w komórkach krwi obwodowej, co wskazuje na komórki szpiku jako istotne miejsce replikacji HCV.

Analiza sekwencji regionu 5'UTR wirusa, metodą SSCP wykazała w jednym przypadku istnienie różnic pomiędzy sekwencją HCV pochodzącego z komórek szpiku a sekwencją HCV amplifikowaną z surowicy i PBMC. Wynik ten wskazuje na możliwość zachodzenia mutacji wirusa podczas jego replikacji w szpiku kostnym.

Badania immunohistochemiczne rozmazów szpiku pod kątem identyfikacji antygenów HCV w komórkach szpiku kostnego wskazały na ich zakażenie HCV.

Wniosek: Komórki szpiku kostnego pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi mogą stanowić istotne miejsce pozawątrobowej replikacji HCV.

Słowa kluczowe: zakażenie HCV, szpik kostny, zaburzenia hematologiczne, różnice w sekwencji HCV

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the presence of HCV replication in bone marrow cells derived from patients displaying hematological disorders.

We analysed serum, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bone marrow samples obtained from 27 patients displaying the following dysfunctions: lymphoma, thrombocytopenia, haemophilia, pancytopenia and acute myeloid leukemia (AML).

The presence of HCV-RNA in samples was detected by RT-PCR. All the serum samples were HCV-RNA positive as well as 9 out of 27 (33%) PBMC and 17 out of 27 (63%) of bone marrow samples. Independently to the disorder type, the co-presence of HCV-RNA in serum and bone marrow with the simultaneous absence of the viral genetic material in PBMC was detected in 5 (18.5%) of patients. This result suggests that bone marrow is a site of active viral replication.

To check whether a viral replication generates any mutations, an SSCP analysis of the 5'UTR viral region was performed. The difference in the viral sequence derived from serum, PBMC and bone marrow was detected in one case. This result may indicate the occurrence of mutation process during the viral replication in bone marrow.

An immunohistochemical analysis of bone marrow smears showed the presence of HCV antigens. Conclusion: bone marrow cells of patients displaying hematological disorders represent a putative site of extrahepatic HCV replication.

Key words: HCV infection, bone marrow, haematological disorders, differences in HCV sequences

WSTĘP

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest nie tylko czynnikiem etiologicznym wirusowego zapalenia wątroby typu C (WZW C), ale także jednym z czynników patogenetycznych, w istotnym stopniu zmieniającym rokowanie u pacjentów ze schorzeniami o różnej etiologii (1-5). Niezwykle istotne dla poznania patogenezы zakażenia HCV było odkrycie jego pozawątrobowej replikacji. Dobrze udokumentowane prace wykazały obecność wirusa w mononuklearach krwi obwodowej, limfocytach T i B oraz komórkach szpiku kostnego (6-10). Dotychczas nie są znane kliniczne konsekwencje zakażenia makrofagów, chociaż wiadomo, że defekt czynnościowy i upośledzone dojrzewanie komórek dendrytycznych, wywodzących się z monocytów związane są z przewlekłym zakażeniem HCV (11). Większy odsetek zakażenia HCV u chorych na chłoniaki, czy schorzenia z autoagresji np. pierwotny zespół Sjögrena, z udziałem zakażenia HCV, sugerują rolę wirusa w patogenezie tych chorób. Z kolei pacjenci z przewlekłym WZW C cechują się podwyższonym ryzykiem występowania zaburzeń hematologicznych, jednak nie udało się ustalić, czy są one konsekwencją bezpośredniego zakażenia komórek szpiku kostnego HCV (1,12, 13).

Przeprowadzone badania stanowiły próbę ustalenia zależności między zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C a zaburzeniami hematologicznymi u pacjentów przewlekle zakażonych HCV.

Celem badania było stwierdzenie cech replikacji wirusa w komórkach szpiku kostnego, pobranych od pacjentów zakażonych HCV, u których wystąpiły zaburzenia hematologiczne oraz charakterystyka właściwości molekularnych szczepów HCV, pochodzących ze szpiku kostnego i ich porównanie z wariantami wirusa obecnymi w surowicy krwi i PBMC.

MATERIAŁ I METODY

Z grupy 125 pacjentów z różnorodnymi zaburzeniami hematologicznymi, wykonując badanie przesiewowe na obecność przeciwciał anty-HCV w surowicy krwi, wyselekcjonowano 27 zakażonych osób. U osób tych stwierdzono następujące zespoły hematologiczne: chłoniak nieziarniczny (NHL - *Non Hodgkin Lymphoma*) (11 osób), małopłytkowość o nieznaney etiologii (5 osób), hemofilia (4 osoby), pancytopenia (3 osoby), niedokrwistość (2 osoby), ostra białaczka szpikowa (2 osoby). Podstawowy materiał do dalszych badań stanowiły próbki surowicy krwi, PBMC oraz szpiku kostnego, pochodzące od tych pacjentów.

Analiza obecności przeciwciał anty-HCV. Obecność przeciwciał anty-HCV w surowicy badano metodą ELISA z zastosowaniem testu Ortho[®] HCV 3.0 firmy Johnson & Johnson.

Wykrywanie HCV RNA regionu 5'UTR (Untranslated Region). Obecność HCV RNA regionu 5'UTR określono niekomercyjną metodą RT-PCR (14).

Identyfikacja antygenów HCV w komórkach szpiku kostnego

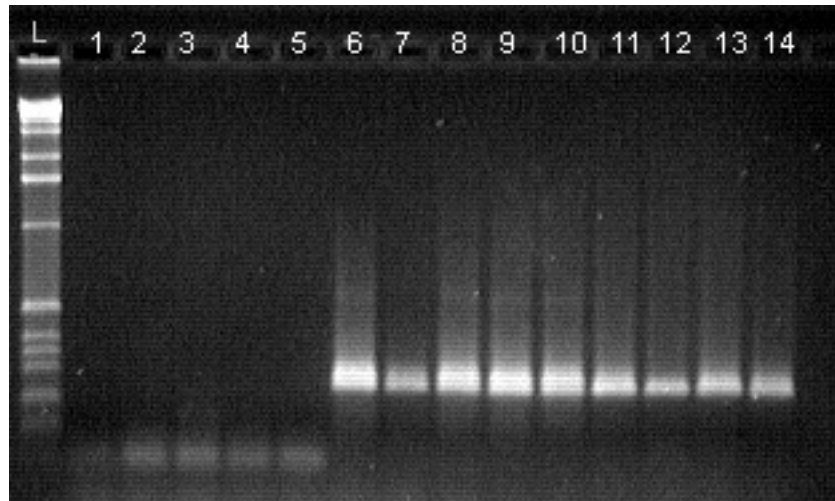
Do identyfikacji antygenów HCV w komórkach szpiku kostnego zastosowano metodę immunohistochemiczną znakowania antygenów wirusa. Z uzyskanego, podczas biopsji, szpiku kostnego wykonywano rozmazy na szkiełkach podstawowych, które następnie utrwalano w 100% acetonie i w 100% chloroformie. Następnie preparaty inkubowano w roztworze pierwszorzędowego przeciwciała anty-HCV-FITC - globuliny dawcy przewlekle zakażonego HCV o wysokim mianie przeciwciał reagujących ze wszystkimi antygenami wirusa w teście RIBA HCV 3. SIA (są to: c 33c, NS5, c 100p i c 22p) – otrzymane dzięki uprzejmości

Prof. dr hab. *Adama Nowosławskiego* i Dr hab. *Bożeny Walewskiej-Zieleckiej* z Zakładu Immunopatologii PZH.

Po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał przeprowadzono inkubację materiału w roztworze przeciwciała anty - IgG znakowanego peroksydazą (EN Vision, DAKO). Wywołanie reakcji barwnej przeprowadzono przy użyciu EAC Substrate – Chromogen.

Detekcja niestrukturalnego białka HCV NS3 w zakażonych komórkach szpiku kostnego. Utrwalone w roztworze aceton/chloroform rozmazy szpiku inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym anty-NS3 (Novocastra Laboratories). Po przepłukaniu, preparaty inkubowano w 3% roztworze H₂O₂, po czym inkubowano kolejno z drugorzędowym przeciwciałem (VECTASTAIN Elite ABC Kit – mouse IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA), z ABC solution (VECTASTAIN Elite ABC Kit – mouse IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA), a następnie z odczynnikami Vector VIP lub Vector DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA). W celu podbarwienia jąder komórkowych preparaty inkubowano w Vector Hematoxylin QS counterstrain (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Charakterystyka właściwości molekularnych HCV. Metodą SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) przeprowadzono charakterystykę właściwości molekularnych HCV pochodzącego z surowicy krwi, PBMC oraz szpiku kostnego. Komplet prób badanych uzyskano od 11 pacjentów. Porównano sekwencje regionu 5'UTR HCV analizowanych wariantów oraz określono ich heterogenność (*quasispecies*) (14).



Ryc.1. RT-PCR – występowanie HCV - RNA w surowicy, PBMC oraz szpiku kostnym pacjentów

Fig. 1. RT-PCR - occurrence HCV- RNA in serum, PBMC and bone marrow of patients

L – marker 1 kDa; pacjent 1: 1 – surowica krwi, 2 – PBMC, 3 – szpik kostny, 4 – wyizolowane komórki szpiku (próby negatywne); pacjent 2: 6 – surowica krwi, 7 – PBMC, 8 – szpik kostny, 9 – wyizolowane komórki szpiku (próby pozytywne); pacjent 3: 10 – surowica krwi, 11 – PBMC, 12 – szpik kostny, 13 – wyizolowane komórki szpiku (próby pozytywne); 5- kontrola negatywna; 14 – kontrola pozytywna

WYNIKI

Metodą RT-PCR określono występowanie HCV-RNA w surowicy krwi, w PBMC oraz w komórkach szpiku kostnego. W przypadku osób ze stwierdzonym NHL u 3 (27%) pacjentów obecność HCV-RNA wykazano w surowicy, PBMC oraz szpiku, w 4 przypadkach (36%) w surowicy i PBMC oraz u 5 (45%) pacjentów tylko w surowicy i szpiku (ryc. 1.). W sumie, przynajmniej w jednej z próbek materiał wirusa wykryto u 9 z 11 (82%) pacjentów.

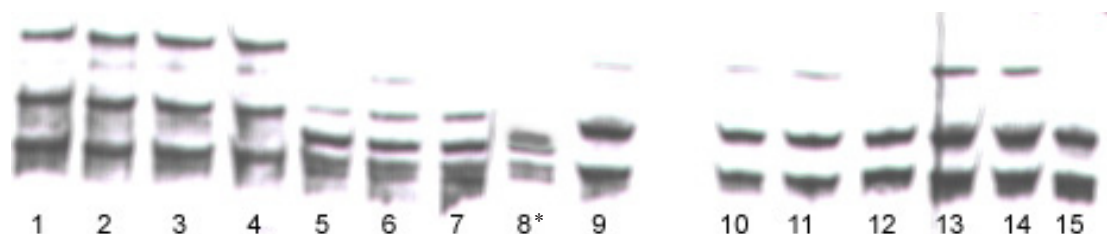
U osób ze stwierdzoną małopłytkowością wykryto HCV-RNA we wszystkich 5 badanych próbach surowicy i szpiku kostnego oraz w 4 próbkach PBMC.

U chorych na hemofilię, HCV-RNA wykazano we wszystkich próbach, zarówno surowicy jak i szpiku kostnego. U wszystkich pacjentów ze stwierdzoną

pancytopenią oraz ostrą białaczką szpikową materiał genetyczny wirusa wykryto w surowicy, PBMC oraz szpiku kostnym.

Metodą SSCP przeprowadzono charakterystykę właściwości molekularnych wariantów HCV pochodzących z surowicy krwi, PBMC oraz szpiku kostnego pacjentów. Analiza sekwencji regionu 5'UTR wirusa w jednym przypadku wykazała istnienie różnic pomiędzy sekwencją wirusa amplifikowanego z surowicy i PBMC a sekwencją HCV izolowanego z komórek szpiku kostnego (ryc.2.).

Analiza immunohistochemiczna 80 rozmazów komórek szpiku kostnego pod kątem identyfikacji antygenów HCV, w tym białka NS3, wykazała obecność w cytoplazmie tych komórek białek HCV. Dotyczyło to wszystkich przypadków, w których stwierdzono obecność materiału genetycznego HCV w szpiku kost-



Ryc 2. SSCP – zmienność sekwencji HCV wyizolowanego z surowicy, PBMC i szpiku kostnego

Fig. 2. SSCP - variability of HCV sequences amplified from serum, PBMC and bone marrow

pacjent 1: 1- surowica krwi ; 2 – PBMC; 3 – szpik; 4 – izolowane komórki szpiku;
 pacjent 2: 5 – surowica krwi; 6 – PBMC; 7 – szpik; 8 – izolowane komórki szpiku;
 pacjent 3: 9 - surowica krwi; 10 – szpik; 11 – izolowane komórki szpiku;
 pacjent 4: 12 – surowica krwi; 13 – PBMC; 14 – szpik; 15 – izolowane komórki szpiku;
 * - różnica sekwencji

nym metodą RT-PCR. W przypadku wyników RT-PCR ujemnych, nie stwierdzono także obecności białek HCV w rozmazach komórek szpiku.

DYSKUSJA

Spośród zaburzeń hematologicznych, towarzyszących zakażeniu HCV, najczęściej wymienia się zaburzenia proliferacji limfocytów, gammapatię monoklonalną, trombocytopenię, krioglobulinemię (15-18). Choć brak na to bezpośrednich dowodów, istnieje pogląd, że HCV może być jednym z czynników etiopatogenetycznych chłoniaków. Przemawia za tym wysoka częstość zakażenia HCV w tej grupie chorych oraz przypadki remisji chłoniaka po skutecznym leczeniu eradykacyjnym HCV (11,12,19,20). Stwierdzono, że wśród chorych zakażonych HCV, nie leczonych przeciwwirusowo, znamienne częściej dochodzi do rozwoju chłoniaka w porównaniu z grupą skutecznie leczoną interferonem (21).

Częstym powikłaniem wzw typu C jest małopłytkowość, występująca wg różnych doniesień u 10,2 – 71% chorych (9). Poza oczywistymi przyczynami małopłytkowości w przewlekłym zapaleniu wątroby – jakimi mogą być hipersplenizm i nieprawidłowa sekwestracja płytek krwi w śledzionie, obserwujemy małopłytkowość immunologiczną. Przeciwciała przeciw płytkowe (PAIgG) stwierdzane są u chorych z wzv C nawet z częstością 64-88,1% (9).

W badanych próbkach pochodzących od osób ze stwierdzoną małopłytkowością, HCV-RNA wykazano we wszystkich próbkach szpiku kostnego, a w PBMC tylko w 80% próbek. Ponadto stwierdzono istnienie różnic między sekwencją regionu 5'UTR wirusa amplifikowanego z surowicy krwi i PBMC a sekwencją HCV izolowanego z komórek szpiku kostnego (ryc. 2.). Wskazuje to na komórki szpiku kostnego jako istotne miejsce zakażenia i pozawątrobowej replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C.

U osób ze stwierdzonym NHL wykazano HCV-RNA w 62,5 % prób szpiku kostnego oraz w 50% PBMC. Ponadto w 25% przypadków stwierdzono jednoczesne występowanie HCV-RNA w surowicy krwi i szpiku kostnym, przy braku wirusa w PBMC. Wyniki te potwierdzają zdolność replikacji HCV w komórkach szpiku kostnego, a zatem potencjalną zdolność dysregulacji układu krwiotwórczego i indukcji procesu nowotworowego (2).

W próbkach pochodzących od osób z ostrą białaczką szpikową, materiał genetyczny wirusa wykrywano w surowicy krwi i komórkach szpiku kostnego, natomiast u osób z pancytopenią - HCV-RNA stwierdzono zarówno w surowicy krwi, PBMC jak i w szpiku kostnym.

U chorych na hemofilię, HCV-RNA wykazano zarówno w surowicy krwi jak i szpiku kostnym, jednakże wyniki te jedynie potwierdzają iż chorzy ci, jako wielokrotni biorecy preparatów krwiopochodnych stanowią poważną grupę ryzyka w parenteralnym zakażeniu HCV (22).

Wyniki analiz immunohistochemicznych rozmazów szpiku, pozwalające na identyfikację białka NS3 w cytoplazmie zakażonych komórek, wskazały na istnienie w tych komórkach białek HCV. Wykorzystana w diagnostyce HCV metoda barwienia znalazła jak dotychczas zastosowanie jedynie w diagnostyce wirusa zakażającego tkankę wątrobową. Wyniki prowadzonych badań wskazują na możliwość jej wykorzystania do wykrywania niestrukturalnego białka NS3 HCV w komórkach szpiku kostnego. Obecnie prowadzone są prace dotyczące optymalizacji metody umożliwiającej analizę występowania HCV na poziomie poszczególnych populacji komórek prekursorowych szpiku.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły zdolność HCV do zakażenia komórek szpiku kostnego. Istnienie różnic w materiale genetycznym tego wirusa, pochodzącym z surowicy krwi i PBMC w porównaniu z wariantami występującymi w szpiku kostnym, wskazuje na istotną rolę tych komórek jako miejsca pozawątrobowej replikacji HCV.

PODSUMOWANIE

1. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono obecność wirusa zapalenia wątroby typu C w komórkach szpiku kostnego. U chorych z NHL oraz małopłytkowością częstość zakażenia HCV komórek szpiku kostnego była średnio o 20% wyższa niż PBMC.
2. Istnienie różnic sekwencji w materiale genetycznym HCV pochodzącym z surowicy i PBMC w porównaniu z wariantami występującymi w szpiku kostnym, wskazuje na istotną rolę tych komórek jako miejsca niezależnej, pozawątrobowej replikacji HCV.

PIŚMIENNICTWO

1. Angello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. *J Hepatol* 2004; 40: 341 – 342.
2. Dammacco F, Gatti P, Sansonno D. Hepatitis C virus infection, mixed cryoglobulinemia and non Hodgkin's lymphoma: an emerging picture. *Leuk Lymph* 1998; 31: 463 – 476.
3. Hyguchi M, Kiyosawa K. Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C. *Jap. J Inf Dis* 2002; 55: 69 – 77.
4. Lerat H, Rumin S, Habersetzer F. i. in. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic

- cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998; 91:3841-9.
5. Nishioka K. Epidemiological studies on hepatitis C virus infection: detection, prevalence, exposure and prevention. *Intervirol* 1994; 37:58-67.
 6. Galli M, Zehender G. Hepatitis C virus RNA in the bone marrow of patients with cryoglobulinemia and subjects with noncryoglobulinemia chronic hepatitis type C. *J Infect Dis* 1995; 171:672 - 675.
 7. Hausfater P, Rosenthal E, Cacoub P. Lymphoproliferative diseases and hepatitis C virus infection. *Annal Med Int* 2000; 151: 53 – 57.
 8. Idilman R, Colantoni A, De Maria N i. in. Lymphoproliferative disorders in chronic hepatitis C. *J Vir Hep* 2004; 11: 302.
 9. Nagamine T, Ohtuka T. Thrombocytopenia associated with hepatitis viral infection. *J Hepatol* 1996; 24: 135 - 140.
 10. Sansonno D, Tucci FA i in. Hepatitis C virus productive infection in mononuclear cells from patients with cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):241-248.
 11. Bronowicki JP, Lorient MA, Thiers V, i in. Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice. *Hepatology* 1998; 28: 261 – 264.
 12. Choo, QL, Kuo G, Weiner AJ, i in. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-62..
 13. Mahrous S, Abdel – Monem A, Mangoud A. i. in. Hematological manifestations in HCV infected patients at Sharkia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 2004;34(1 Suppl.): 417 – 428.
 14. Radkowski M, Kubicka J, Kisiel E i. in. Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subject. *Blood* 2000; 95: 3986 – 3989.
 15. Emilia G, Luppi M, Ferrari MG. i in. Hepatitis C virus – induced leuko – thrombocytopenia and haemolysis. *J Med Virol* 1997; 53: 182 – 184.
 16. Houman MH, Ghorbel I, Lamloum M, i. in. Miled M. Leucocytoclastic vasculitis, cryoglobulinemia and medullary aplasia associated with hepatitis C. *Tunis Med* 2001; 79: 398 – 400.
 17. Kryczka W, Kisiel E. Hematologic syndrome in hepatitis C infection. *Przeg Lek* 2000 57(11):672 - 675.
 18. Paul IM, Sanders J, Ruggiero F i. in. Chronic hepatitis C virus infections in leukemia survivors: prevalence, viral load, and severity of liver disease. *Blood* 1999; 93: 3672 – 3677.
 19. Cocco P, Piras G i in. Risk of malignant lymphoma following viral hepatitis infection. *Int J Hematol* 2008; 87(5): 474-83.
 20. Okan V, Yilmaz M, i in. Prevalence of hepatitis B and C viruses in patients with lymphoproliferative disorders. *Int J Hematol* 2008; 4 [Epub ahead of print]
 21. Kawamura y, Ikeda K I in. Viral elimination reduces incidence of malignant lymphoma in patients with hepatitis C. *Am J Med.* 2007; 120 (12):1034-41.
 22. Fried MW, Peter J, Hoots K, i in. Hepatitis C in adults and adolescent with hemophilia: a randomized, controlled trial of interferon alfa – 2b and ribavirin. *Hepatology* 2002; 36: 967 – 972.
- Otrzymano: 12.11.2008 r.
Zakwalifikowano do druku: 7.01.2009 r.
- Adres do korespondencji:**
Dr Agnieszka Pawełczyk
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Pawińskiego 3c, 01 - 861 Warszawa
tel. (22) 5720709
email: agnieszka.pawelczyk@wum.edu.pl