

PREGLEDNI ČLANCI

HEPATITIS C VIRUSNA INFEKCIJA-VIRUSOLOSKI I PATOFIZIOLOŠKI ASPEKT

Dobrila STANKOVIĆ-ĐORĐEVIĆ, Marica OTAŠEVIĆ, Gordana TASIĆ,
Marina DINIĆ i Biljana MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ

Institut za zaštitu zdravlja u Nišu

Hepatitis C virus je sferična partikula, ikozaedarne simetrije kapsida, sa lipidnim omotačem. Genom virusa predstavlja jednolančana (+) RNK. Strukturni virusni proteini su: protein nukleokapsida i dva glikoproteina omotača (E1 i E2). E2 protein, koji indukuje sintezu neutrališućih antitela, je antigenski varijabilan. Nestrukturni virusni proteini (RNK polimeraza, helikaza, proteaza i drugi) imaju regulatornu funkciju u procesu replikacije. HCV se replikuje u hepatocitima i verovatno u T i B limfocitima. Replikacija se odvija na niskom nivou zbog čega su virusni antigeni prisutni u serumu u nemerljivim koncentracijama.

Citotoksični CD8+ T limfociti imaju dominantnu ulogu u patogenezi lezije hepatocita i u eliminaciji virusa. U preko 70% bolesnika, posle akutne, HCV uspostavlja perzistentnu infekciju koja uzrokuje hronično oboljenje jetre sa progresivnim tokom. Uspostavljanje perzistentne HCV infekcije je posledica mutacija u E2 genu koje uslovljavaju promene u strukturi virusnih antireceptora. Zbog niskog titra virusnih antigena u serumu, aktivna HCV infekcija može se dokazati samo na osnovu prisustva RNK sekvence virusnog genoma PCR metodom. Novija istraživanja HCV infekcije usmerena su ka otkrivanju epitopa kao kandidata za HCV vakcinu.

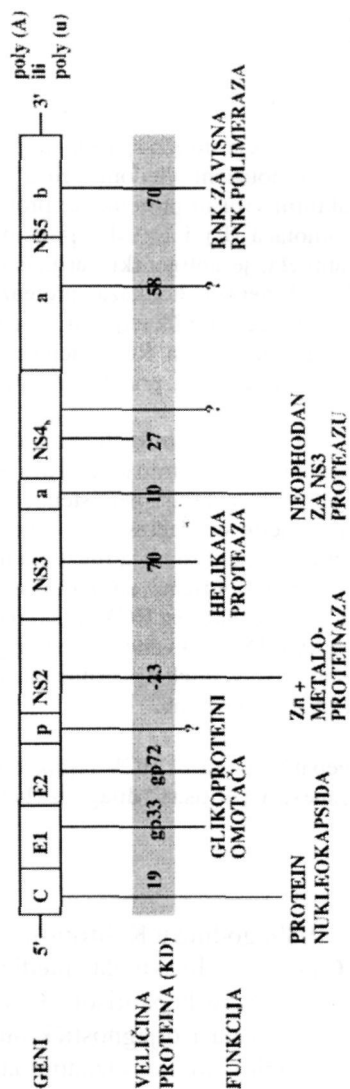
Ključne reči: hepatitis C virus, HCV replikacija, HCV viremija, patogeneza hepatitisa C, dijagnoza hepatitisa C, HCV vakcina

Uvod

Od trenutka kada je 1989. godine u Kaliforniji identifikovan Hepatitis C virus (HCV), hepatitis C postaje vrlo aktuelan medicinski problem. Mnogi se autori i istraživački timovi bave hepatitisom C sa aspekta učestalosti, ozbiljnosti posthepatitičnih sekvela i dijagnostičko-terapijskih dilema. Istraživanja su rezultirala mnogim novim saznanjima, od kojih su brojna teorijski i praktično potvrđena, a neka su ostala na nivou hipoteze.

Struktura virusa

HCV, član familije Flaviviridae, je mali virus (30-80 nm), ikozaedarne simetrije kapsida, sa lipidnim omotačem. Virusni genom predstavlja jednolančana pozitivna RNK sa oko 9500 nukleotida koja na 5' kraju sadrži sekundarnu strukturu, a na 3' kraju poly A ili poly U trakt u zavisnosti od virusnog genotipa. Strukturni deo virusnog genoma kodira sintezu proteina



Šema 1. Genomska organizacija hepatitis C virusa

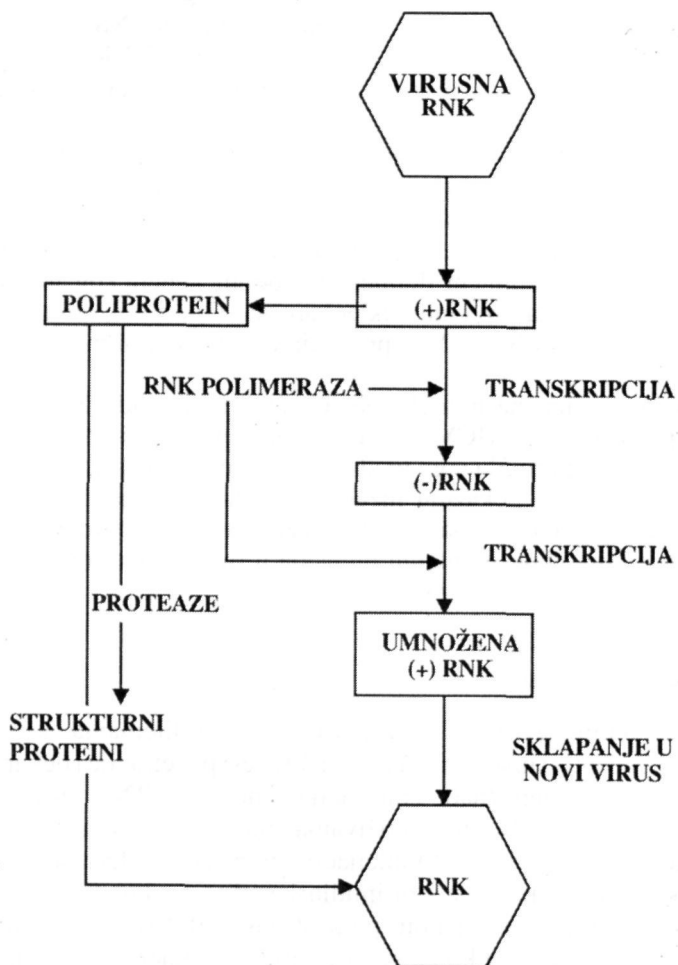
nukleokapsida, odnosno core proteina (C gen) i dva glikoproteina omotača (E₁ i E₂). Nestrukturani deo virusnog genoma je odgovoran za sintezu cink zavisne metaloproteinaze (NS₂ gen), proteaze-helikaze (NS₃ gen), proteina neophodnog za aktivnost NS₃ proteaze (NS₄ a gen), RNK zavisne RNK-polimeraze (NS₅ b gen) i dva proteina sa nepoznatom funkcijom (NS₄ b i NS₅ a geni) (šema 1). Još uvek postoji dilema da li je protein P₇, lokalizovan između E₁ i NS₂ regije virusna komponenta ili regulacijski protein. Moguća uloga ovog proteina u morfogenezi viriona zahteva nove eksperimentalne dokaze (*Fields and Knippe, 1996*).

Virusne proteine reprezentuju imunoreaktivni antigeni, sintetski peptidi ili rekombinantni antigeni dobijeni metodom genetičkog inženjeringa. Antigen C22 odgovara proteinu nekleokapsida, C33 c NS3 proteinu, 5-1-1 NS4 proteinu, C100-3 NS3 i NS4 proteinima, a RNK polimerazi odgovara NS5 antigen.

Na osnovu stepena homologije sekvenci nukleotida NS5 b regiona, Simmons je klasifikovao HCV izolate u 6 genotipova koji obuhvataju subtipove a, b, c i d. Regioni 5' i core predstavljaju najstalnije sekvence virusnog genoma, dok E₁ i E₂ pokazuju nizak stepen homologije među izolatima različitih genotipova. E₂ regija, odgovorna za sintezu glikoproteina omotača, je hipervarijabilna zbog spontanijh mutacija u ovom genu tokom evolucije bolesti (*Fields and Knippe, 1996*).

Replikacija virusa

Proces replikacije HCV-a praćen je mnogim dilemama. Virus specifični ćelijski receptori nisu identifikovani. Procesi penetracije i dekapidacije viriona još uvek su nepoznati. Translacija genomske iRNK virusa je verovatno cup nezavisna. Novija istraživanja ukazuju na prisustvo virusnog proteina genoma na 5' kraju. Za inicijaciju translacije odgovorna je sekundarna struktura na 5' kraju čija je pirimidinska sekvenca komplementarna 18s ribozomalnoj RNK. Translacijom policistranske iRNK virusa sintetiše se prekursori poliprotein od kojeg se strukturalni i regulacijski virusni proteini obrazuju posttranslaciono delovanjem virusnih i ćelijskih proteaza. Protein nukleokapsida, posle odvajanja od poliproteina, ostaje na citoplazmatskoj strani membrane endoplazmatskog retikuluma. Glikoproteini omotača E₁ i E₂, čija se glikolizacija odvija u lumenu endoplazmatskog retikuluma, formiraju kompleks-heterodimer, koji predstavlja osnovnu subjedinicu virusnog omotača (*Selby, 1993*). Replikacija genomske RNK virusa odvija se u citoplazmi hepatocita preko RNK negativnog replikativnog posrednika uz učešće RNK zavisne RNK polimeraze (šema 2). Kompletiranje viriona odvija se na nivou membrane endoplazmatskog retikuluma od koje se formira spoljašnji lipidni omotač. HCV napušta ćeliju procesom egzocitoze. Istraživanja u kojima su identifikovani (+) i (-) lanac virusne RNK u T i B



Šema 2. Replikacija hepatitis C virusa

Hmfocitima nameću hipotezu o virusnoj replikaciji u ovim ćelijama (*Fields and Knippe, 1996*). HCV replikacija se odvija na niskom nivou, zbog čega su virusni antigeni prisutni u serumu u nemerljivim koncentracijama.

Procena aktivne virusne replikacije i viremije je od posebnog značaja sa kliničkog i epidemiološkog aspekta. Naime, značajno je pitanje kakva je korelacija prisustva virusne RNK sekvence i antitela na virusne antigene u serumu i da li antitela mogu biti parametar aktivne virusne replikacije i viremije.

Kod bolesnika sa tranzitornom viremijom, odnosno akutnom HCV infekcijom čiji je ishod eliminacija virusa, RNK sekvenca se može otkriti već u toku prve nedelje od infekcije, povišene vrednosti transaminaza u periodu između 5. i 10. nedelje, a antitela između 7. i 30. nedelje od infekcije. Serokonverzija anti C22-3 i anti C33-c antitela nastupa ranije u odnosu na serokonverziju antitela na ostale virusne antigene. Posle eliminacije virusa i normalizacije vrednosti transaminaza, nivo antitela opada u različito vreme ili uopšte ne opada. Međutim, kod mnogih bolesnika uočen je gubitak ili opadanje nivoa samo anti C100-3 antitela, tako da je stav većine autora da ova antitela mogu biti parametar u diferencijalnoj dijagnozi akutnog hepatitisa C u sanaciji i onog koji evoluiru u hronični hepatitis. Prema tome, zbog kasne serokonverzije i prisustva antitela nakon eliminacije virusa, kod bolesnika sa tranzitornom viremijom antitela ne mogu biti pouzdan parametar aktivne virusne replikacije.

Kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom i perzistentnom viremijom RNK sekvenca perzistira u serumu, praćena oscilirajućim vrednostima transaminaza i antitelima na virusne antigene. U svega 8% bolesnika vrednosti transaminaza su permanentno normalne. Kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom antitela mogu biti parametar aktivne virusne replikacije. Permanentno visoke ili oscilirajuće vrednosti transaminaza su biohemijski marker hronične HCV infekcije. Međutim, kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom evidentirana je i intermitentna viremija sa tranzitnim fazama koje se ponavljaju u određenim vremenskim intervalima. Objašnjenja za intermitentnu viremiju za sada nema (*Garson et al., 1990*).

Patogeneza HCV infekcije

U preko 70% bolesnika akutna HCV infekcija evoluiru u perzistentnu infekciju sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama hroničnog obojenja jetre koje ima progresivan tok, od hroničnog neagresivnog, preko hroničnog agresivnog hepatitisa do ciroze jetre i eventualno hepatocelularnog karcinoma.

Patogenetski mehanizmi koji dovode do oštećenja hepatocita kod bolesnika sa HCV infekcijom nisu u potpunosti sagledani. Direktno citocidno dejstvo virusa kao i imunopatološki procesi uslovljeni ćelijskim imunskim odgovorom i humoralnim imunskim odgovorom (čiji se efekat ostvaruje reakcijom aktivacije komplementa ili reakcijom antitelima zavisne ćelijske citotoksičnosti) imaju svoje argumente i protivargumente. Međutim, naučni konsenzus u ovom trenutku glasi: citotoksični CD⁺ T limfociti imaju dominantnu ulogu u patogenezi lezije hepatocita (*Regina, et al., 1995; Fields and Knippe, 1996*). Ovaj naučni stav bazira na rezultatima imunohistohe-

mijških istraživanja kojima je otkrivena infiltracija CD8⁺ i CD4⁺ T limfocita u portnim i periportnim prostorima i lobulusima jetre kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom. Dominiraju citotoksični CD8⁺ T limfociti. Kod bolesnika sa visokim stepenom agresivnosti hroničnog hepatitisa često se sreću intrahepatični limfoidni agregati. Kloniranjem specifičnih CD8⁺ T limfocita dokazano je da oni prepoznaju multiple epitope core, E1, E2, NS3, NS4 i NS5 proteina. Specifični CD4⁺ T limfociti prepoznaju epitope core i NS4 proteina.

Kakva je uloga HCV-a u patogenezi hepatocelularnog karcinoma? Kako se HCV ne replikuje preko DNK replikativnog posrednika, niti se integriše u genom domaćina verovatno je da nema direktno onkogeno dejstvo. Pored toga, identične sekvence RNK virusnog genoma otkrivene su u tumorskom i okolnom cirotičnom tkivu istog bolesnika što ukazuje na značajnu korelaciju između perzistentne HCV infekcije i pojave karcinoma. Zbog toga se smatra da je uloga HCV-a u patogenezi hepatocelularnog karcinoma indirektna, jer dovodi do displazije i adenomatozne hiperplazije hepatocita, što predstavlja osnovu maligne alteracije (*Fields and Knippe, 1996; Reginael & U 1995*).

Virusološka dijagnoza HCV infekcije

Svi pokušaji do danas da se definiše kultura ćelija koja omogućava efikasnu replikaciju HCV-a ostali su bez uspeha. Ipak učinjen je neki napredak. Infekcija humane T ćelijske kulture (prethodno inficirane mišjim retro virusom), humanih B ćelija (koje ekspimiraju gene Epstein-Barr virusa) i humanih hepatocita dokazana je in vitro. Međutim, kako je nivo HCV replikacije u ovim ćelijskim kulturama nizak, infekcija i replikacija se mogu dokazati samo osetljivom PCR metodom. Direktni citopatogeni efekat u ovim ćelijskim kulturama nije uočen.

Zbog niskog titra cirkulišućeg virusa direktna detekcija virusa bazira se na otkrivanju RNK sekvence virusnog genoma u serumu ili tkivu jetre PCR metodom. PCR metodom može se izvršiti i genotipizacija virusa na osnovu tip i subtip specifičnih sekvenci 5', core i NS₅ b regiona.

Serološka dijagnoza HCV infekcije obuhvata ELISA i imunoblot testove II i III generacije. Za razliku od seroloških testova II generacije serološki testovi III generacije, pored core, NS₃ i NS₄ proteina, uključuju i NS₅ antigen.

Savremene metode koje se danas koriste samo u eksperimentalnim istraživanjima su: imunofluorescentna tehnika za detekciju virusnih antigena u hepatocitima i limfocitima, metode in situ hibridizacije za detekciju RNK sekvence virusnog genoma u ćelijama i veoma osetljiva metoda in situ hibridizacije koja uključuje PCR amplifikaciju.

Nova saznanja o HCV-u mogu da ponude odgovore na brojna pitanja koja godinama prate HCV infekciju.

Kako dolazi do uspostavljanja perzistentne HCV infekcije?

1. Uspostavljanje perzistentne HCV infekcije verovatno je posledica mutacija u E₂ genu koje uslovljavaju promene u strukturi virusnih anti-receptora. Na ovaj način virus izbegava eliminaciju iz organizma posredstvom neutrališućih antitela (*Marković i sar.*, 1995). Selekcijom antigenskih varijanti dolazi do reinfekcije hepatocita. Osim toga, intracelularno izdvajanje glikoproteina omotača i kompletiranje viriona na nivou membrane endoplazmatskog retikuluma onemogućava lizu hepatocita reakcijom aktivacije komplementa (*Filds and Knippe*, 1996).

2. Ukoliko se pođe od hipoteze da je HCV limfotropan, limfociti mogu biti rezervoar viriona koji dovode do reinfekcije hepatocita. Pored toga, eventualno izmenjena funkcija limfocita može imati ulogu u perzistenciji virusa.

3. Kako je nivo HCV replikacije nizak, smanjena ekspresija virusnih antigena na ćeliji može biti odgovorna za izbegavanje efikasnog citotoksičnog odgovora.

Od čega zavisi stepen agresivnosti hroničnog hepatitisa C i evolutivni razvoj hroničnog oboljenja jetre?

Koinfekcija ili prethodna infekcija Hepatitis B virusom, alkoholizam i put prenošenja virusa (odnosno doza inokuluma) značajni su faktori koji doprinose bržoj evoluciji hroničnog oboljenja jetre. Međutim, većina autora smatra da su stepen agresivnosti hroničnog hepatitisa i evolucije hroničnog oboljenja jetre prvenstveno određeni genotipom virusa (*Regina et al.*, 1995). Ovaj stav zasniva se na činjenici da je genotip 1b kod većine bolesnika udružen sa višim nivoom HCV replikacije, visokom aktivnošću hepatitisa i bržom evolucijom u cirozu jetre. Kako se može objasniti uloga virusnog genotipa u patogenezi hepatitisa? Varijacije u proteinima među izolatima različitih genotipova mogu da uslove različitu virus-domaćin interakciju i različiti stepen oštećenja hepatocita. Razlike u proteinima i sekvencama nukleotida 3' regiona, koji ima ulogu u transkripciji PNK negativnog replikativnog posrednika, mogu biti odgovorne za razlike u nivou virusne replikacije izolata različitih genotipova. Stepem oštećenja hepatocita je u direktnoj vezi sa nivoom replikacije, ukoliko je HCV citocidan. S druge strane, viši nivo virusne replikacije uslovljava viši nivo virusne target ekspresije i efikasan citotoksični odgovor, ukoliko je njegova uloga u patogenezi hepatitisa dominantna.

Koji je racionalan dijagnostički pristup HCV infekcije?

Poznavanje imunskog odgovora u korelaciji sa tipovima viremije kod bolesnika sa HCV infekcijom je neophodno za pravilan izbor dijagnostičke metode i pravilno tumačenje virusoloških nalaza.

Kod bolesnika sa kliničkim i biohemijskim parametrima akutnog hepatitisa, negativan ELISA test u vreme pojave simptoma bolesti ne isključuje akutnu HCV infekciju, zbog kasne serokonverzije. Međutim, pozitivan ELISA test obavezuje na testiranje bolesnika potvrdnim imunoblot testom. Prema literaturnim podacima i iskustvu sa našeg Instituta, broj bolesnika kod kojih je ELISA test pozitivan, a imunoblot negativan je veoma mali. Ipak treba reći da ELISA test može biti lažno pozitivan kod bolesnika sa autoimunim oboljenjima.

ELISA pozitivan, imunoblot intermitentan nalaz koji podrazumeva moguću virusnu infekciju (reaktivnost seruma na jedan ili dva nestrukturna virusna antigena) zahteva PCR metodu ili dalje serološko praćenje bolesnika, zbog mogućnosti serokonverzije antitela na ostale virusne antigene.

Pozitivni serološki testovi (ELISA i imunoblot) u prisustvu permanentno visokih ili oscilirajućih vrednosti transaminaza odražavaju virusnu replikaciju i viremiju. Stav je većine autora da PCR metoda kod ovih bolesnika nije neophodna. Nasuprot tome, PCR metoda je neophodna za postavljanje dijagnoze HCV infekcije kod bolesnika sa permanentno normalnim vrednostima transaminaza, imunokompromitovanih, novorođenčadi HCV pozitivnih majki i u praćenju efikasnosti interferonske terapije. Kako su evolucija hroničnog oboljenja jetre i odgovor na interferon uslovljeni nivoom viremije i virusnim genotipom, kvantifikacija i genotipizacija virusa imaju prognostički značaj. Međutim, postojanje intermitentne viremije može da kompromituje značaj PCR metode, jer odsustvo RNK sekvence u toku nekoliko meseci nije siguran dokaz da je došlo do eliminacije virusa.

Kakva je perspektiva razvoja Hepatitis C virusne vakcine?

Dosadašnji problemi i neuspeh u traganju za HCV vakcinom uslovljeni su niskim stepenom homologije glikoproteina omotača izolata različitih genotipova, a posebno hipervarijabilnošću E2 glikoproteina omotača. Novija istraživanja su usmerena ka razvoju vakcine koja će obezbediti zaštitu po tipu celijskog odgovora. Kako core protein pokazuje više od 90% homologije među izolatima različitih genotipova, epitopi core proteina koje prepoznaju T limfociti su najozbiljniji kandidati za uspešnu HCV vakcinu (Sarobe et al., 1998).

Literatura

Fields, B. N. and Knippe, D. M. (1996). Fields Virology. 3th Raven Press. New York.

Gai son, J. A., Tuke, P. W., Makris, M. and Briggs, M. (1990). Demonstration of viremia patterns in hemophiliacs treated with hepatitis C virus contaminated factor VIII concentrates. *Lancet*, 336, 1022-1024.

Marković, Lj., Jovanović, T. i Stepanović, S. (1995). Opšta virusologija. Medicinski fakultet. Beograd.

Regino, P., Gonzales, P., Johanson, Y. N. and Lau, D. (1995). Seminars in Gastrointestinal disease, 1, 28-34.

Sarobe, P., Pendleton, C. D., Akatsuka, T. and Lau, D. (1998). Enhanced in vitro potency and in vivo immunogenicity of a CTL epitope from hepatitis C virus core protein following amino acid replacement at secondary HLA A2 binding positions. *J. Clin. invest.*, 15, 1239-1248.

HEPATITIS C INFECTION VIRALE - ASPECT VIRULOGIQUE ET PATHOPHYSIOLOGIQUE

Dobriła STANKOVIĆ-ĐORĐEVIĆ, Marica OTAŠEVIĆ, Gordana TASIĆ,
Marina DINIĆ et Biljana MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ

Institut pour la protection de la sante de Niš

Hepatitis C virus est une particule spherique, de la symmetric icosahedrale de capsule avec l'enveloppe lipidique. Le genome du virus presente RNK (+) d'un article. Les protides structurals virals sont: protide nucleocapsude et deux glysoprotides de l'enveloppe (E1 et E2). E2 protide, qui induit la synthese des anticorps neutralises est variable d'antigene. Les protides nonstructurals (RNK polymerase, helicase, protease et autres) ont la fonction regulatoire dans le proces de la repliquiation. HCV se replique dans les hepatocytes et probablement dans les T et B lymphocytes. La repliquiation se deroule sur le bas niveau et c'est pourquoi les antigenes virals sont presents dans le serum dans les concentrations non-mesurables.

Le cytotoxique CD8+ T lymphocytes ont le role dominant dans la pathogenese da la lesion des hepatocytes et dans l'elimination du virus chez plus de 70 malade apres l'infection aigue HCV etablit la HCV infection persistante qui provoque l'affection du foie chronique avec le cours progressifs. L'etablissement de HCV infection persistante est la consequence des mutations dans le gene E2 qui conditionnent des changements dans la structure des antirecepteurs virals. A cause du bas titre des antigenes virals dans le serum, l'infection HCV active ne peut pas être prouee seulement a la base de la presence de RNK sequence du genome viral par la methode PCR. Les nouvelles recherches de l'infection HCV sont acheminees de decouvrir les epitopes comme candidat pour la vaccine HCV.

Les mots cles: Hepatitis C, virus, HCV repliquiation, HCV viremie, pathogenese du hepatitis C, diagnostique du hepatitis C, HCV vaccine

HEPATITIS C VIRUS INFECTION - VIRUSOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECT

Dobriła STANKOVIĆ-ĐORĐEVIĆ, Marica OTAŠEVIĆ, Gordana TASIĆ,
Marina DINIĆ and Biljana MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ

Institute for Health Protection, Niš

Hepatitis C virus is a spherical particle, of icosahedral symmetry of the capsid with the lipid jacket. The virus genome is one-chain (+) RNK. Structural virus proteins are the following: protein of nucleocapsid and two glycoproteins of the jacket (E1 and E2). The E2 protein that induces a synthesis of neutralizing antibodies is antigenic-variable. Non-structural virus proteins (RNK polymerase, helicase, protease and others) have a regulatory function in the replication process. The HCV is replicated in hepatocytes and probably in T and B lymphocytes as well. The replication is done at a low level; that is why the virus antigens are present in the serum in un-measurable concentrations.

The cytotoxic CD8+ T lymphocytes have a dominant role in the pathogenesis of the hepatocyte lesion and in the virus elimination. In over 70% of the patients, after an acute infection, the HCV sets up a persistent infection causing a chronic liver disease with progressive course. The setting-up of the persistent HCV infection is a consequence of the mutations in the E2 gene that are giving rise to changes in the anti-receptor virus structure. Due to low titer of the virus antigens in the serum, the active HCV infection can be proved only on the basis of the presence of the RNK sequence of the virus genome by the PCR method. Recent research of the HCV infection is directed towards discovering the epitope as the candidate for the HCV infection.

Key words: Hepatitis C virus, HCV replication, HCV viremia, pathogenesis of hepatitis C, diagnosis of hepatitis C, HCV vaccine

Autor: Doc. dr sci Dobriła Stanković-Đorđević, mikrobiolog, Institut za zaštitu zdravlja u Nišu; kućna adresa: Niš, Marije Bursać 2A/2.

(Rad je Uredništvo primilo 27. decembra 2001. godine)