

mgr Maciej Piotr Janiak

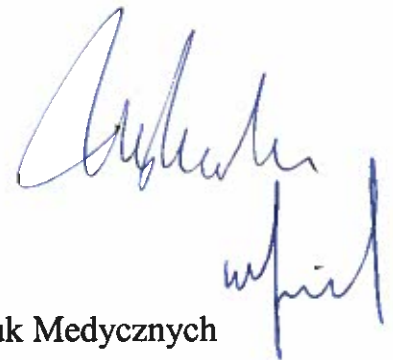
**Identyfikacja prognostycznych markerów warunkujących
przebieg ostrego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C
(HCV)**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Marek Radkowski

Promotor pomocniczy: dr hab. Kamila Caraballo Cortés

Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022

IX. Streszczenie

Problem wirusowych zapaleń wątroby jest poważnym wyzwaniem dla zdrowia publicznego na całym świecie. Głównymi czynnikami etiologicznymi są wirusy zapalenia wątroby typu B i C, które odpowiadają za 96% całkowitej śmiertelności z powodu zapaleń tego narządu. Główną przyczyną zgonów są następstwa przewlekłego zapalenia wątroby takie jak marskość i pierwotny rak wątrobowo-komórkowy (HCC). Należy podkreślić, że ponad 50% przypadków HCC wystąpiło w przebiegu przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), jak również jest on odpowiedzialny za ponad 6% przypadków marskości wątroby w skali całego świata. Z badań wynika, że na całym świecie żyje 71 milionów osób z przewlekłym zakażeniem HCV, co stanowi około 1% populacji.

Większość ostrych zakażeń HCV przebiega bezobjawowo lub z niespecyficznymi objawami, a jawna żółtaczka występuje rzadko. Z tego powodu duża część zakażeń pozostaje nierozpoznana. Efektem tego jest brak badań i niedostateczna wiedza na temat czynników zarówno wirusologicznych, jak i osobniczych działających w najwcześniejszej fazie zakażenia i wpływających na dalszy przebieg choroby. Tylko u części chorych (10-46%) dochodzi do samoistnej eliminacji HCV.

Ze względu na możliwość przenoszenia zakażeń HCV drogą krwi i produktów krwiopochodnych niezbędne stało się wprowadzenie do systemów krwiodawstwa i krwiolecznictwa testów umożliwiających wykrycie wirusa. Polska była jednym z pierwszych krajów, w którym prowadzono przesiewowe badania donacji metodami analizy kwasów nukleinowych (ang. *Nucleic Acid Testing*, NAT). Od 2002 roku wszystkie donacje badane są w kierunku obecności HCV-RNA metodami biologii molekularnej. Dzięki takiej strategii zwiększyło się znacznie bezpieczeństwo przetaczania krwi i produktów krwiopochodnych. Umożliwiło to jednocześnie wyselekcjonowanie grupy potencjalnych dawców znajdujących się w tzw. „oknie serologicznym” charakteryzującym się obecnością HCV-RNA przy jednoczesnym braku p/c anty-HCV. Taką unikalną grupę 124 potencjalnych dawców zakażonych HCV wykryto dzięki przebadaniu ponad 17 500 000 donacji. Dysponowaliśmy więc wyjątkowym materiałem, pobranym w dokładnie określonym, momencie zakażenia, umożliwiającym badanie jego fazy subklinicznej. Do końcowej analizy zakwalifikowano grupę 40 osób. U 19 z nich wykazano samoistną eliminację HCV, natomiast u 21 doszło do rozwoju fazy przewlekłej zakażenia. Pomędzy badanymi grupami nie wykazano istotnych statystycznie różnic w parametrach takich jak płeć ($p=0,06$), wiek ($p=0,64$) i występującymi czynnikami ryzyka.

Przedstawiony projekt miał na celu zbadanie czynników działających w najwcześniejszej fazie zakażenia HCV, które mają wpływ na jego samoistną eliminację. Czynniki te możemy podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa obejmuje czynniki wirusologiczne takie jak wiremia, genotyp HCV i zmienność genetyczna wirusa. Druga to czynniki osobnicze m. in. wiek, płeć, pochodzenie etniczne, polimorfizm genu IFN- λ 3 oraz nasilenie odpowiedzi immunologicznej. W celu oceny wpływu wybranych parametrów na samoistną eliminację HCV zastosowano najnowsze technologie laboratoryjne m. in. sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) i Luminex xMAP. Dzięki pirosekwencjonowaniu możliwa była analiza zmienności genetycznej HCV na podstawie regionu hiperzmiennego HVR1. Przy użyciu programu ShoRAH i LStructure dokonywano rekonstrukcji poszczególnych wariantów wirusowych z uwzględnieniem korekty błędu sekwencjonowania. Do dalszych etapów kwalifikowano holotypy występujące z prawdopodobieństwem $>95\%$. U każdego badanego oceniano parametry populacji HCV takie jak złożoność (ang. complexity), różnorodność (ang. diversity) i liczba podstawień nukleotydowych. W celu amplifikacji materiału genetycznego HCV wykorzystywane były również techniki PCR i nested-PCR, natomiast do oceny polimorfizmu genu IFN- λ 3 zastosowano real-time PCR. Odpowiedź immunologiczną oceniano wykorzystując technologię Luminex xMAP za pomocą, której badano stężenia markerów białkowych takich jak: Eotaxin, IL-1beta, IL-1RA, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p70, IP-10, MIP-1 alpha, PDGF-BB, TNF-alfa, VEGF-A, G-CSF, IFN-gamma.

W wyniku przeprowadzonych badań nie wykazano, aby czynniki wirusologiczne takie jak: poziom wiremii, genotyp i parametry zmienności genetycznej oceniane na podstawie HVR1 miały istotne znaczenie dla samoistnej eliminacji HCV na tak wczesnym etapie zakażenia. Spośród zbadanych czynników osobniczych nie uzyskano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami dla polimorfizmu rs12979860 w genie IFN- λ 3.

W grupie samoistnie eliminującej HCV wykazano istotnie statystycznie wyższe stężenia markerów charakterystycznych dla pierwotnej odpowiedzi immunologicznej takich jak IFN-gamma, TNF-alfa, IL-1 oraz IL-1RA, które jako białko ostrej fazy świadczy o nasileniu stanu zapalnego.

Podsumowując uzyskane wyniki należy stwierdzić dominującą rolę silnej pierwotnej odpowiedzi immunologicznej w samoistnej eliminacji zakażenia HCV w jego najwcześniejszej fazie. Jednocześnie wykazano brak istotnej roli ocenianych czynników wirusologicznych.