

mgr inż. Joanna Wysocka-Leszczynska

„Polimorfizm rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C – związek z obrazem klinicznym zakażenia”

**Polimorfizm rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B u pacjentów
z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C – związek z obrazem klinicznym
zakażenia**

mgr inż. Joanna Wysocka – Leszczynska

Promotor:

*Prof. dr hab. Danuta Januszkiewicz – Lewandowska
Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu
Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu*

Promotor Pomocniczy:

*Dr hab. med. Ewelina Gowin
Katedra i Zakład Profilaktyki Zdrowotnej Uniwersytetu
Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu*

Poznań, 2020

Pragnę serdecznie podziękować:

Pani Profesor Danucie Januszkiewicz – Lewandowskiej za wiarę w moją osobę, okazaną pomoc i wsparcie, bez których ta praca nie powstałaby,

Pani dr hab. med. Ewelinie Gowin za pomoc merytoryczną i mobilizowanie mnie do pracy,

Pani Profesor Iwonie Lisewskiej, Pani Doktor Iwonie Bereszyńskiej oraz Wszystkim Współpracownikom z Katedry i Kliniki Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,

Wszystkim Współpracownikom Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Pracę dedykuję moim Rodzicom.

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	5
1. WSTĘP	7
1.1. Epidemiologia zakażeń wirusem C zapalenia wątroby.....	7
1.2. Budowa wirusa HCV.....	8
1.3. Zakażenie HCV - drogi transmisji wirusa i przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu C.....	13
1.4. Rola polimorfizmu interleukiny 28B w przebiegu zakażenia i odpowiedzi na leczenie przewlekłego zapalenia wątroby typu C.....	15
1.5. Pozostałe czynniki mające wpływ na przebieg zakażenia i odpowiedź na leczenie przewlekłego zapalenia wątroby typu C.....	17
1.6. Leczenie przewlekłego zapalenia wątroby typu C.....	20
2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	26
3. MATERIAŁ I METODY	28
3.1. Materiał.....	28
3.2. Metody	28
3.2.1 Izolacja HCV-RNA z surowicy.....	28
3.2.2 Oznaczanie wiremii HCV.....	29
3.2.3 Określenie genotypu HCV.....	30
3.1.4 Izolacja genomowego DNA z komórek nabłonka błony śluzowej.....	30
3.1.5 Izolacja genomowego DNA z leukocytów krwi obwodowej.....	30
3.1.6 Ocena ilości i jakości genomowego DNA.....	32
3.1.7 Oznaczenie polimorfizmów genu interleukiny 28B	33
3.1.8 Badanie ankietowe pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C.....	35
3.2.9 Analiza statystyczna.....	37
4 WYNIKI	38
4.1 Charakterystyka grupy badanej.....	38
4.2 Występowanie polimorfizmów rs12979860, rs8099917 i rs12980275 ILB w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wirusowym typu C.....	40
4.3 Charakterystyka grupy pacjentów poddanych badaniu ankietowym.....	46

4.3.1	Skuteczność prowadzonego leczenia w ankietowanej grupie 222 osób z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C.....	49
4.3.2	Analiza danych ankietowych 114 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby, którzy zwrócili ankietę.....	50
5	DYSKUSJA.....	60
6	WNIOSKI.....	73
7	PIŚMIENNICTWO.....	74
8	STRESZCZENIE.....	80
9	ABSTRACT.....	85
10	SPIS RYCIN.....	90
11	SPIS TABEL.....	92

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AFP – alfa-fetoproteina

ALT - ang. *alanine aminotransferase* – aminotransferaza alaninowa

BOC – boceprewir

DAA's – ang. *directly acting antivirals* – leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym

EOT – ang. *end of treatment response* - odpowiedź na koniec trwania terapii

EVR – ang. *early virological response* – wczesna odpowiedź wirusologiczna

gpE1/E2 – ang. *envelope protein E1/E2* – glikoproteina otoczkowa E1/E2

GWAS - ang. *genome-wide association studies* - badania asocjacji genomu

HCC - ang. *hepatocellular carcinoma* – rak wątrobowokomórkowy

HCV – ang. *hepatitis C virus* – wirus zapalenia wątroby typu C

HCV-RNA – kwas rybonukleinowy HCV

HVR - ang. *hypervariable region* – region hyperzmienny

IFN – interferon

IFNL – interferon lambda

IL – interleukina

NS – ang. *nonstructural protein* – białko niestrukturalne

ORF – ang. *open reading frame* – otwarta ramka odczytu

PCR – ang. *polymerase chain reaction*- polimerazowa reakcja łańcuchowa

PegIFN – interferon pegylowany

PWZW C – przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C

RAS – ang. *resistance associated substitution* – substytucje warunkujące oporność

RBV- rybawiryna

RGT – ang. *Response-Guided Therapy* – terapia kierowana odpowiedzią

RVR – ang. *rapid virological response* – szybka odpowiedź wirusologiczna

S – ang. *structural protein* – białko strukturalne

SD – ang. *standard deviation* – odchylenie standardowe

SNP – ang. *single nucleotid polymorphism* – pojedynczy polimorfizm nukleotydu

SVR – ang. *sustained virological response* - trwała odpowiedź wirusologiczna

TVR - telaprewir

UTR – ang. *untranslated regions* – sekwencje niekodujące

WHO – ang. *World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

WZW C – wirusowe zapalenie wątroby typu C

1. Wstęp

1.1 Epidemiologia zakażeń wirusem C zapalenia wątroby

Wirusowe zapalenie wątroby typu C (wzw typu C) od lat stanowi wielki problem epidemiologiczny na całym świecie, który pomimo postępu w leczeniu w ostatnim czasie, nadal pozostaje jednym z wyzwań współczesnej medycyny. Szacuje się, iż około 170 milionów osób jest zakażonych wirusem C zapalenia wątroby – HCV (ang. *hepatitis C virus*), co stanowi blisko 3% światowej populacji. W 2018 roku w Polsce zgłoszono 3442 nowe przypadki zakażeń HCV. Nowe rozpoznania wzw typu C raportowano we wszystkich województwach, jednakże, tak jak i w latach poprzednich, współczynnik zachorowań wykazywał znaczne wahania w zależności od regionu kraju (od 3,29 do 13,69 na 100 tys. mieszkańców). Najwyższe wartości współczynnika zachorowań na wzw typu C odnotowano w województwach lubuskim (13,69 na 100 tys. mieszkańców) oraz dolnośląskim (12,79 na 100 tys. mieszkańców), najniższe w województwach podkarpackim (3,29 na 100 tys. mieszkańców) [1]. Trend zróżnicowanej wartości współczynnika zachorowań w zależności od miejsca zamieszkania utrzymuje się od lat. Analiza przeprowadzona w 2018 roku potwierdziła te dane, wykazując, że na terenach miejskich wartości współczynnika zachorowań na wzw typu C są wyższe niż w obszarach wiejskich (odpowiednio 10,84 i 6,12 na 100 tys. mieszkańców). Biorąc pod uwagę kryterium płci oraz wieku, najwyższą wartość współczynnika zachorowań na wzw typu C odnotowano u mężczyzn w wieku lat 40 – 44 lat (15,82 na 100 tys. mieszkańców) oraz w wieku 50 - 54 lat (15,02 na 100 tys. mieszkańców). W przypadku kobiet najczęściej zachorowania zgłaszano dla grup wiekowych 55 - 59 lat i 25-29 lat (współczynnik zachorowań odpowiednio 15,23 i 14,96 na 100 tys. mieszkańców) [1]. W 2016 roku Światowa Organizacja Zdrowia przyjęła globalną strategię w zakresie zdrowia publicznego, mającą na celu eliminację wirusowych zapaleń wątroby. Głównym

założeniem tej strategii jest ograniczenie do roku 2030 zapadalności, rozpowszechnienia i umieralności z powodu wirusowych zapaleń wątroby, w tym wywołanych HCV [2].

1.2 Budowa wirusa HCV

Wirus C zapalenia wątroby to jedyny przedstawiciel rodziny *Flaviridae*. Zbudowany jest z otoczki glikoproteinowej pochodzącej od komórek gospodarza, w której osadzone są, kodowane przez wirusa, glikoproteiny E1 i E2 (ang. *envelope*) [3]. Wewnątrz otoczki znajduje się jednoniciowy, dodatnio spolaryzowany łańcuch RNA o długości około 9000 nukleotydów. W obrębie genomu wirusa występują dwie sekwencje niekodujące tzw. 3' UTR i 5' UTR (ang. *untranslated regions*) oraz sekwencja kodująca zlokalizowana w centralnej części genomu. Obie sekwencje UTR wykazują dużą zachowawczość (ponad 90%), najprawdopodobniej w związku z pełnieniem ważnych funkcji regulatorowych podczas procesów replikacji i translacji [4].

Pojedyncza otwarta ramka odczytu – ORF (ang. *open reading frame*), która zlokalizowana jest pomiędzy sekwencjami UTR, koduje prekursorową poliproteinę złożoną z 3010 - 3011 aminokwasów. Poliproteina ta ulega rozszczepieniu do 10 różnych produktów – białek strukturalnych S (ang. *structural*) i niestrukturalnych NS (ang. *non-structural*).

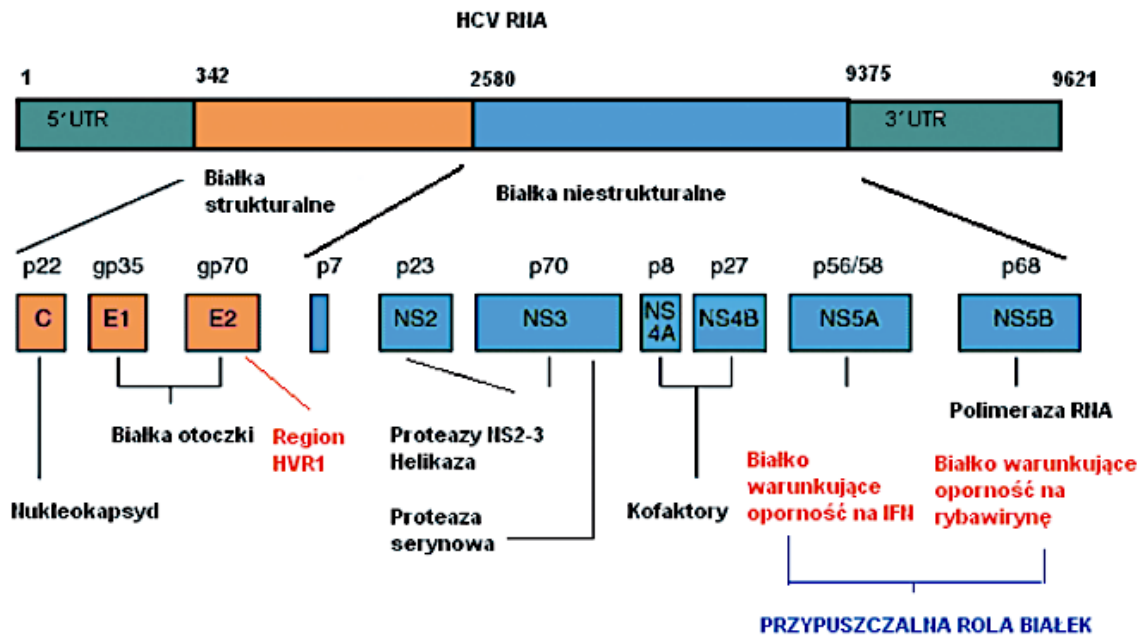
Do białek strukturalnych należą białko rdzenia C (ang. *core*) będące głównym składnikiem nukleokapsydu oraz glikoproteiny otoczki E1 i E2. Białko rdzenia wpływa na procesy metaboliczne zakażonej komórki, wchodząc w interakcje z białkami gospodarza. Wykazano też jego właściwości onkogenne. Białka otoczki E1 i E2, które są glikoproteinami, posiadają domenę hydrofobową, dzięki czemu mogą wiązać się z błoną

komórkową. Przy N końcu białka E2 znajduje się region HVR1 – nazywany hyperzmiennym, który odgrywa rolę w procesie przejścia zakażenia w stan przewlekły.

Do białek niestrukturalnych zalicza się białka NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B. Dodatkowo w zakażonych komórkach powstaje białko p7, które jest białkiem ulegającym najprawdopodobniej integracji z błoną komórkową, w której tworzy pory funkcjonujące jako kanał wapniowy [5]. Białko NS2 ma właściwości metaloproteazy i jest odpowiedzialne za katalityczne cięcie poliproteiny prekursorowej. Białko NS3 wykazuje aktywność proteazy serynowej, RNA-helikazy oraz NTP-azy. Przypuszcza się, że helikaza rozwija podwójną nić RNA w czasie replikacji, NTP-aza ma zaś za zadanie dostarczanie energii potrzebnej dla efektywnego funkcjonowania helikazy. Białko NS4A tworzy kompleks z NS3 i jest kofaktorem proteazy NS3. NS4B służy jako element „zakotwiczący” kompleks replikacyjny do błon siatki endoplazmatycznej komórki. NS5A jest proteiną mającą duże znaczenie w replikacji wirusa, gdyż w końcu N zawiera krótkie fragmenty aminokwasowe, które biorą udział w składaniu i umieszczaniu kompleksu replikacyjnego w obszarze błon okołojądrowych [6]. Ponadto liczne badania kliniczne sugerują, że NS5A odgrywa rolę w indukowaniu braku wrażliwości na interferon [7]. NS5B jest RNA – zależną polimerazą RNA, mającą kluczowe znaczenie dla syntezy dodatniej i ujemnej nici HCV – RNA [8]. Szczegółową organizację genomu HCV i zakodowanych w nim białek przedstawiono na rycinie 1.

Rycina 1

Organizacja genomu HCV i białka kodowane przez genom wirusa [Kowala-Piaskowska i wsp., 2008]

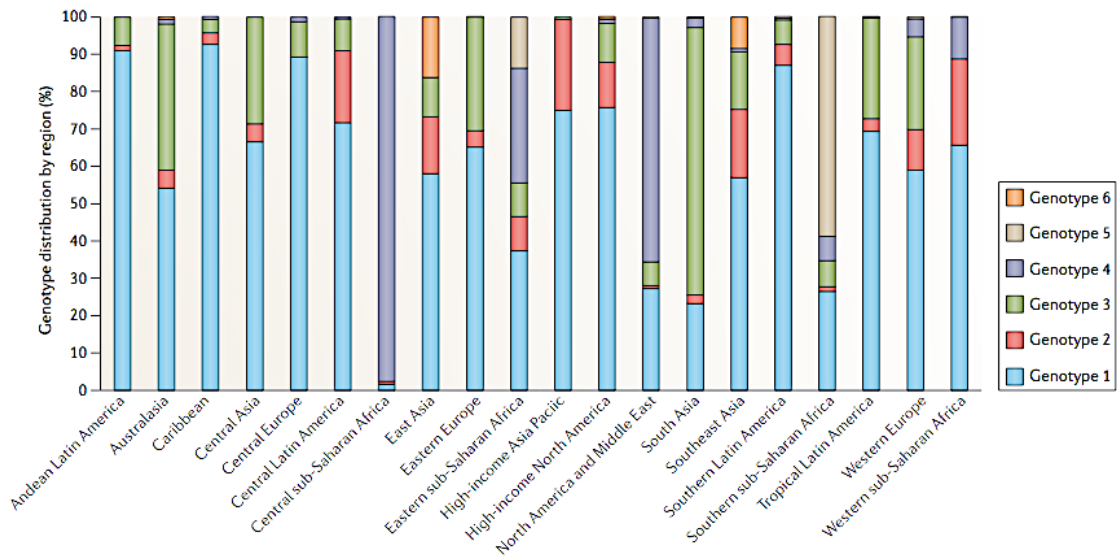


Główną cechą HCV jest heterogenność jego genomu. Związana jest ona z przebiegiem cyklu replikacyjnego, w trakcie którego błędy popełniane przez wirusową RNA-zależną polimerazę RNA nie ulegają korekcji. Częstość mutacji, określona w warunkach eksperymentalnych, wynosi $10^4 - 10^5$ zasad na cykl replikacyjny. W efekcie tych błędów replikacyjnych genom wirusa zapalenia wątroby typu C gromadzi względnie dużą ilość mutacji, co skutkuje występowaniem znacznej liczby odmiennych genetycznie wariantów, zwanych pseudogatunkami (ang. *quasispecies*) u osoby zakażonej [9]. To czy dana zmiana sekwencji zostanie utrwalona i będzie powszechnie powielana, zależy od jej wpływu na przeżywalność wirusa oraz od zdolności nowego szczepu do unikania mechanizmów odpowiedzi odpornościowej zakażonego gospodarza. Największą zmienność genetyczną przejawia odcinek kodujący fragment hyperzmienny białka otoczki

E2 (HVR-1) oraz sekwencja kodująca białko niestrukturalne p7. Obszary najbardziej stabilne genetycznie to obszary białka rdzeniowego, NS5B oraz sekwencje niekodujące (UTR) [10]. Obok dość licznych wariantów HCV charakteryzujących się niewielką odmiennością u jednego zakażonego gospodarza, występuje zjawisko heterogenności genetycznej większego stopnia, związane z występowaniem różnych genotypów i podtypów wirusa. Podstawą przyjętej klasyfikacji wirusa HCV były konserwatywne regiony genomu wirusa, kodujące przede wszystkim białka C, E1 i NS5. Do tej pory opisano 6 podstawowych genotypów HCV (oznaczonych kolejnymi cyframi arabskimi od 1 do 6) i ponad 50 podtypów (oznaczonych kolejnymi literami alfabetu np. a, b, itd.). Genotypy HCV różnią się między sobą w zakresie 30 – 35% nukleotydów w całej sekwencji, a ich występowanie jest zróżnicowane geograficznie. Genotyp 1 wirusa jest najczęściej występującym w skali świata – odpowiada za 46,2% wszystkich przypadków zakażeń na świecie, a jego podtypy 1a i 1b są najczęściej występującymi spośród wszystkich w Stanach Zjednoczonych i w Europie. Drugim najczęściej występującym genotypem jest genotyp 3 (30,1% wszystkich światowych zakażeń), którego obecność wiąże się bezpośrednio z procesem stłuszczenia hepatocytów, a w konsekwencji determinuje dużo wyższy odsetek śmiertelności pacjentów. Genotypy 2, 4 i 6 odpowiadają łącznie za około 22,8% wszystkich zakażeń, genotyp 5 izolowany jest w mniej niż 1% zakażonych [11]. Występowanie poszczególnych genotypów w wybranych regionach świata przedstawia rycina 2.

Rycina 2

Częstość występowania poszczególnych genotypów HCV w zależności od regionu świata [Thrift i wsp., 2017].



W Polsce zakażenie HCV dotyczy poniżej 1% populacji, przeważa zakażenie genotypami 1 (szczególnie 1b) i 3 (zwłaszcza 3a). Analiza częstości występowania poszczególnych genotypów na terenie Polski pokazała, że dominuje genotyp 1b (82%), rzadziej obserwuje się zakażenie genotypem 3 (11,3%), 4 (3,5%) i 1a (3,2%). Zakażenia genotypami 2, 5 i 6 oraz zakażenia o charakterze mieszanym są rozpoznawane sporadycznie. [12].

1.3 Zakażenie HCV – drogi transmisji wirusa i przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu C

Drogi zakażenia wirusem HCV mogą być różne, poczynając od kontaktu z krwią osoby zakażonej (na drodze zabiegów medycznych), poprzez przypadkowe kontakty seksualne, aż do zakażeń związanych z ekspozycją zawodową (pracownicy ochrony zdrowia). Grupą szczególnie narażoną na zakażenie są osoby przyjmujące środki odurzające w postaci iniekcji oraz osoby korzystające z gabinetów tatuaży, czy piercingu. Osobną grupę stanowią osoby, u których do zakażenia doszło na drodze wertykalnej, czyli poprzez przeniesienia zakażenia z matki na dziecko. Za dawkę zakażającą uznaje się równoważnik 100 cząstek HCV. Okres wylęgania choroby po ekspozycji wynosi od 15 do 150 dni, średnio 50 dni.

Wirus zapalenia wątroby typu C poza zmianami zapalnymi wątroby wywołuje także liczne zespoły pozawątrobowe takie jak krioglobulinemia czy chłoniaki nieziarnicze z limfocytów B. Z uwagi na długi bezobjawowy przebieg, większość osób zakażonych pozostaje nierozpoznana. Przebieg samego zakażenia HCV jest bardzo podstępny - aż 40% zakażonych przez 10 – 20 lat może nie mieć żadnych objawów lub są one słabo zaznaczone. Tylko u 10 – 15% zakażonych HCV występuje żółtaczka. O zakażeniu pacjenci dowiadują się najczęściej przypadkowo, przy okazji wykonywanych badań. Z raportu przygotowanego przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego wynika, iż w 2018 roku zgłoszone przypadki zakażeń HCV rozpoznawano głównie na podstawie oznaczeń anty-HCV wykonywanych w Podstawowej Opiece Zdrowotnej (30,5% wszystkich nowych zachorowań), w trakcie badań wykonywanych w oddziałach szpitalnych (27,3%) oraz podczas diagnostyki w poradniach lub oddziałach chorób zakaźnych (13,3%) [13].

Po ekspozycji na wirusa HCV istnieją dwa możliwe scenariusze przebiegu choroby - samoistne wyleczenie, połączone w eliminacją wirusa lub przetrwanie zakażenia. Do 40% ostrych zakażeń HCV ustępuje samoistnie, a u pozostałych osób rozwija się przewlekłe zakażenie, które ujawnia się po wielu latach, zaawansowaną chorobą wątroby. Przewlekłą postać choroby definiuje się jako utrzymywanie HCV-RNA w surowicy chorego przez okres dłuższy niż 6 miesięcy. Przyjmuje się, iż odsetek chorych, u których doszło do przejścia zakażenia HCV w stan przewlekły może wynosić nawet około 80%. U chorych z przewlekłą postacią wirusowego zapalenia wątroby typu C może dojść do rozwoju marskości wątroby (u 15-20% pacjentów) oraz pierwotnego raka wątroby [14].

Prowadzono wiele badań dotyczących wpływu szeregu czynników, zarówno po stronie gospodarza jak i samego wirusa, na przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu C. Badania wskazały na czynniki, które mają również znaczenie w procesie przetrwania zakażenia HCV. Do czynników tych zaliczyć można wiek, w którym doszło do infekcji - u osób powyżej 40 roku życia odsetek zakażonych, u których ostre zakażenie przechodzi w formę przewlekłą wynosi aż 75 – 80%. Inne czynniki, które wiążą się z przejściem zakażenia HCV w postać przewlekłą to poza płcią męską, niealkoholowe stłuszczenie wątroby, cukrzyca, nadużywanie alkoholu i nałogowe palenie tytoniu. Najistotniejszym czynnikiem po stronie gospodarza warunkującym korzystną odpowiedź na leczenie interferonem i samoistną eliminację HCV są określone polimorfizmy genu interleukiny 28B.

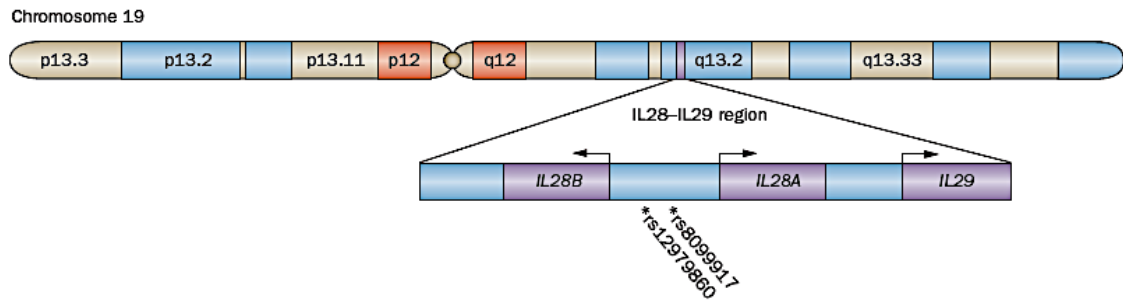
1.4 Rola polimorfizmu interleukiny 28B w przebiegu zakażenia i odpowiedzi na leczenie przewlekłego zapalenia wątroby typu C

Interferony to grupa cytokin, które są wytwarzane i uwalniane przez komórki w odpowiedzi na zakażenie wirusami, pod wpływem różnych antygenów czy polinukleotydów. Cytokiny te odgrywają wiodącą rolę w odporności przeciwwirusowej. Interferony same w sobie nie wykazują bezpośredniego działania przeciwwirusowego, ale wytworzone w odpowiedzi na zakażenie wirusami, oddziałują na inne komórki wprowadzając je w „stan gotowości przeciwwirusowej”. Można zatem przyjąć, iż uczestniczą w odpowiedzi przeciwwirusowej, antyproliferacyjnej i immunomodulującej [15].

Komórki człowieka wytwarzają pięć podstawowych rodzajów interferonów. Interferony typu I (rodzaje α , β , κ , ω) wytwarzane są przede wszystkim przez leukocyty — interferon α (IFN α), keratynocyty — interferon κ (IFN κ) lub fibroblasty — interferon β (IFN β). Interferony typu II — interferon γ (IFN γ), wytwarzane są przez limfocyty T na skutek ich kontaktu z antygenami, cytokinami lub mitogenami. Rodzina interferonów typu III, zwanych również interferonami λ , składa się z trzech rodzajów białek określanych jako IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 lub odpowiednio interleukiny IL-29, IL-28A i IL-28B. Białka te kodowane są przez trzy różne geny zlokalizowane na chromosomie 19 [Rycina 3]. W odróżnieniu od genów kodujących interferony typu I, które zawierają pojedynczy ekson, geny kodujące IL-28A i IL-28B zbudowane są z sześciu, zaś IL-29 z pięciu eksonów [16].

Rycina 3

Lokalizacja genów kodujących IL28A, IL28B i IL29 na chromosomie 19 [Hayes i wsp., 2012].



Pierwsze prace podkreślające rolę polimorfizmów pojedynczego nukleotydu - SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) genów kodujących białka uczestniczących w odpowiedzi przeciwwirusowej pojawiły się w 2009 roku. Dotyczyły polimorfizmów genu kodującego IL28B. Udowodniono, iż polimorfizm pojedynczego nukleotydu ma bezpośredni związek z samoistną eliminacją wirusa i uzyskaniem trwałej odpowiedzi na zastosowane leczenie [17]. Dotychczas wykazano, iż polimorfizm rs12979860 (C/T) genu IL28B w wariacie homozygotycznym CC wpływa na wyższą częstość trwałej odpowiedzi wirusologicznej w porównaniu do wariantu TT oraz zwiększa szansę samoistnej eliminacji zakażenia HCV [18]. Thompson i wsp. w swoich badaniach wykazali, iż wczesną odpowiedź wirusologiczną – EVR (ang. *early viral response*) uzyskuje aż 87% pacjentów posiadających wariant CC w stosunku do 38% i 28% chorych posiadających odpowiednio warianty CT i TT polimorfizmu rs12979860 (C/T) genu IL28B [19]. Podobne obserwacje dotyczyły dwóch pozostałych polimorfizmów genu IL28B rs8099917 oraz rs12980275. Pacjenci posiadający warianty homozygotyczne, odpowiednio TT i AA szybciej i korzystniej reagowali na stosowane leczenie [20].

1.5 Pozostałe czynniki mające wpływ na przebieg zakażenia i odpowiedź na leczenie przewlekłego zapalenia wątroby typu C

Opisane polimorfizmy genu IL28B to najsilniejszy, lecz nie jedyny czynnik pozwalający prognozować przebieg zakażenia i skuteczność leczenia preparatami interferonu. Prowadzono liczne badania mające na celu wskazanie optymalnych cech charakteryzujących samego wirusa, jak i zakażonej osoby, które miały dawać wysokie prawdopodobieństwo odniesienia sukcesu terapeutycznego i uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej. Wiele z analizowanych czynników wskazywana była przez różnych autorów jako cecha istotna dla przebiegu zakażenia HCV, choć zaznaczyć należy, że część publikacji wykluczała wzajemnie opisane zależności [3].

Czynnikiem, który w sposób niekwestionowany wpływa na przewidywany efekt leczenia interferonem był genotyp samego wirusa. W terapiach dwulekowych dużo gorszą odpowiedzią na leczenie charakteryzowali się pacjenci zakażeni wirusem HCV o genotypie 1 i 4, w stosunku do zakażonych genotypem 2 i 3 [20]. Pacjentom zakażonym genotypami 2 i 3 zalecało się 24-tygodniową terapię pegylowanym interferonem alfa i rybawiryną, uzyskując pozytywny efekt terapii w około 80% przypadków. Chorych zakażonych genotypem 1 i 4, związanym z gorszą odpowiedzią na leczenie, poddawano 48 tygodniowej terapii uzyskując SVR (ang. *sustained virological response*) w zaledwie 30 - 50% przypadków [21]. W terapiach trójlekowych częstsze uzyskanie SVR obserwowano u chorych zakażonych podtypem 1b genotypu 1, co wiązało się najprawdopodobniej z częstszym występowaniem mutacji warunkujących oporność na inhibitory proteazy pierwszej generacji (telaprewir i boceprewir) w przypadku genotypu 1a [22]. Drugim ważnym czynnikiem prognozującym przebieg choroby a leżącym po stronie wirusa był wyjściowy poziom wirēmii HCV mierzony przed rozpoczęciem leczenia. W przypadku

terapii dwulekowych w zakażeniu genotypem 1, niskie miano wirusa silnie korelowało z większym prawdopodobieństwem uzyskania SVR [23]. W leczeniu chorych zakażonych genotypami 2 i 3 oraz przy użyciu terapii, w których zastosowano inhibitory proteazy, wyjściowe miano wirusa miało dużo mniejszą wartość predycyjną, jednak niższy poziom wirerii pozostawał w związku z lepszą odpowiedzią na leczenie [24].

W dobie współczesnych terapii przeciwwirusowych (ang. *DAA*s, *directly acting antivirals*) o działaniu pangenotypowym genotyp wirusa przestaje mieć znaczenie przy wyborze leczenia. O wyborze leku decyduje zaawansowanie choroby wątroby oraz ewentualne wcześniejsze niepowodzenie terapeutyczne. Skuteczność terapii jest definiowana poprzez wrażliwość danych genotypów wirusa na inhibitory stosowane w leczeniu, a monitorowanie zjawiska lekooporności staje się podstawowym narzędziem kontroli przebiegu leczenia. Terapie bezinterferonowe powinny polegać na łączeniu inhibitorów NS3, NS5A i NS5B z ewentualnym uzupełnieniem o podaż rybawiryny - RBV. Niewłaściwe stosowanie leków niesie ze sobą ryzyko selekcji substytucji warunkujących oporność (*resistance associated substitution* – RAS). Istotne stają się badania mutacji powstających pod wpływem terapii w genomie wirusowym. Mutacje tego typu powinny być definiowane wraz z wprowadzaniem na rynek nowych inhibitorów w celu skutecznego monitorowania powstawania wariantów lekoopornych wirusa HCV i zastępowania nieskutecznych leków innymi kombinacjami DAAs [25]. Z uwagi na trwałość oporności największe znaczenie mają RAS dla NS5A.

Do grupy czynników będących po stronie pacjenta, które wpływają na przebieg zakażenia HCV, poza polimorfizmem genu IL28B, zalicza się płeć i wiek pacjenta, współwystępowanie innych chorób, ogólny stan wątroby, nadużywanie alkoholu i nałogowe palenie tytoniu.

Wykazano, że płeć zakażonych odgrywa rolę w samoistnej eliminacji wirusa. Potwierdzono, że u kobiet zjawisko samoistnej eliminacji występuje częściej niż u mężczyzn (odpowiednio 40% i 18%) [26].

Prowadzone badania analizujące wpływ wieku na przebieg zakażenia HCV, dowiodły, iż gorzej rokoją pod kątem uzyskania trwałej odpowiedzi wirusologicznej dojrzały mężczyźni, u których do infekcji doszło po 40-tym roku życia [27].

Wśród najczęściej wskazywanych czynników hamujących skuteczność prowadzonych terapii czołowe miejsce zajmuje alkohol, którego spożywanie przez chorych zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C zaostża postępujące procesy włóknienia oraz marskość wątroby i może prowadzić do powstawania nowotworu wątroby. Proces metabolizmu etanolu, jak i rozwoju wirusa odbywa się w hepatocytach, prowadząc w obu przypadkach do stresu oksydacyjnego, który z kolei sprzyja rozwojowi choroby i podatności gospodarza na przewlekłe zakażenie HCV [28].

Kolejnym czynnikiem po stronie gospodarza – osoby zakażonej, który istotnie oddziałuje na ogólny stan wątroby jest nadwaga pacjenta. Występowanie nadwagi nie tylko znacznie pogarsza wydolność wątroby, ale jest czynnikiem wpływającym na poziom stłuszczenia i włóknienia wątroby [29]. Charlton i wsp. wykazali u pacjentów zakażonych HCV istotny wpływ nadwagi na brak odpowiedzi na leczenie interferonem lub peginterferonem alfa w połączeniu z rybawiryną.

Badania nad wpływem palenia papierosów na przebieg terapii przeciwwirusowej u pacjentów zarażonych wirusem HCV dowiodły, iż palenie wpływa negatywnie na wyniki terapii, niezależnie od wieku, płci czy nawet ilości spożywanego alkoholu [30]. Efekt ten wynika głównie z wpływu nikotyny na metabolizm lipidów, poziom włóknienia wątroby

czy też ilości płytek krwi. Badania prowadzone przez Zimmermanna i wsp. dowiodły, iż w grupie palaczy chorujących na przewlekłe zapalenie wątroby typu C (zarażeni genotypem 1 wirusa) leczonych po raz pierwszy, stosowana terapia dwulekowa była nieskuteczna bez względu na pozostałe czynniki, takie jak stan wątroby, ilość spożywanego alkoholu, czy zażywane leki.

1.6 Leczenie przewlekłego zapalenia wątroby typu C

Miarą skuteczności prowadzonej terapii jest uzyskanie przez pacjenta trwałej odpowiedzi wirusologicznej – SVR [ang. *sustained virological response*] - czyli eliminacja HCV-RNA z surowicy krwi po 12 tygodniach od zakończenia leczenia – dla terapii bezinterferonowych i po 24 tygodniach w przypadku leczenia terapią interferonową [31]. Rodzaj odpowiedzi na stosowane leczenie przeciwwirusowe przedstawia tabela 1. Początkowo leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby C opierało się na monoterapii wykorzystującej interferon alfa. Efekty terapeutyczne nie były jednak zadowalające, a prowadzone badania wykazały, iż trwałą odpowiedź wirusologiczną po 24 tygodniach leczenia interferonem rekombinowanym uzyskiwało mniej niż 10% chorych. Wydłużenie terapii do 48 tygodni spowodowało wzrost odsetka SVR do około 15 - 20% [32]. Kolejnym krokiem było wprowadzenie do schematów leczenia terapii skojarzonej z zastosowaniem interferonu alfa i rybawiryny, która jest analogiem guanozyny. Wcześniejsze próby monoterapii opartej o leczenie samą rybawiryną nie przyniosły korzystnych rezultatów. Wykazano jednak, iż w skojarzeniu z interferonem rybawiryna zwiększa odpowiedź na leczenie w stosunku do samego interferonu alfa. Skojarzenie to niemal dwukrotnie zwiększyło skuteczność terapii, a ponadto dało szansę na wyleczenie chorych, którzy nie osiągnęli SVR po monoterapii interferonem [33].

Tabela 1

Rodzaje odpowiedzi na leczenie skierowane przeciwko wirusowi HCV [Chmielewska i wsp., 2015 oraz uzupełnione o modyfikacje autora].

Typ odpowiedzi wirusologicznej	Opis
Trwała odpowiedź wirusologiczna (ang. <i>sustained virological response</i> - SVR)	brak wirusowego RNA wykrywanego metodą PCR 12 tygodniach od zakończenia leczenia – dla terapii bezinterferonowych i po 24 tygodniach w przypadku leczenia terapią interferonową
Odpowiedź na koniec trwania terapii (ang. <i>end of treatment response</i> - EOT)	brak wirusowego RNA w chwili zakończenia terapii (po 6 lub 12 miesiącach)
Wczesna odpowiedź wirusologiczna (ang. <i>early virological response</i> - EVR) - częściowa lub kompletna	100-krotna redukcja ilości wirusowego RNA (częściowa EVR) lub całkowity brak wirusowego RNA (kompletna EVR) po 3 miesiącach stosowania terapii
Szybka odpowiedź wirusologiczna (ang. <i>rapid virological response</i> - RVR)	brak wirusowego RNA po 4 tygodniach stosowania terapii

Przyjmowanie rybawiryny wiązało się jednak z szeregiem objawów niepożądanych - pacjenci skarżyli się na występowanie wysypek, mdłości, biegunek czy kaszlu [34]. Najczęstszym efektem ubocznym leczenia rybawiryną pozostaje niedokrwistość hemolityczna. Od 2000 roku do terapii przewlekłych zapaleń wątroby typu C wprowadzono interferon pegylowany (PegIFN). Pegylacja polega na kowalencyjnym przyłączeniu glikolu polietylenowego do struktury substancji aktywnej leku, co powoduje wydłużenie jego okresu półtrwania w ustroju. Modyfikacja ta zwiększyła oddziaływanie biologiczne interferonu poprzez długotrwałe utrzymywanie stężenia leku w surowicy na jednakowym poziomie. Leczenie pegylowaną formą interferonu charakteryzowało się wyższą skutecznością terapii skojarzonej z RBV niż formy niepegylowanej. Już u ponad połowy pacjentów leczonych z powodu przewlekłego zapalenia wątroby typu C osiągnano SVR [35]. Badania prowadzone na pacjentach leczonych PegIFN w skojarzeniu z rybawiryną wykazały

dotatkowo różnice w skuteczności leczenia w zależności od genotypu wirusa HCV. Chorzy zakażeni genotypem 2 lub 3 osiągnęli wyraźnie lepsze efekty leczenia niż zakażeni innymi genotypami (szczególnie w porównaniu do chorych zakażonych genotypem 1 wirusa) [36], pomimo krótszego czasu trwania terapii (odpowiednio 24 tygodnie dla genotypu 2 i 3 wirusa i 48 tygodni dla pozostałych genotypów HCV).

Kolejnym przełomem w leczeniu przewlekłych zapaleń wątroby typu C stały się cząstki hamujące replikację wirusa HCV, powszechnie określane jako bezpośrednio działające leki przeciwwirusowe [ang. *DAAs, directly acting antivirals*). Pierwszą generacją tych leków były zarejestrowane w 2011 roku, dla genotypu 1 wirusa HCV, telaprewir i boceprewir. Punktem uchwytu obu leków jest proteaza serynowa NS3-4A. Leki te stosowano w terapiach skojarzonych z pegylowanym INF i rybawiryną, jako tak zwane terapie trójlekowe. Efekty tych terapii okazały się być niezwykle obiecujące, szczególnie w przypadku chorych wcześniej nieleczonych lub z nawrotem choroby po wcześniej prowadzonej terapii dwulekowej. SVR u pacjentów leczonych terapiami trójlekowymi uzyskiwano u ok. 75 - 79% chorych [37, 38]. Niestety terapie te wiązały się z licznymi efektami ubocznymi, szczególnie w grupie pacjentów z zaawansowaną chorobą wątroby. Dodatkowo były niezwykle kosztowne. Rok 2014 przyniósł rejestrację kolejnych DAAs, działających jako nowe inhibitory proteazy HCV. Cząsteczki te posiadają inne punkty uchwytu i działają jako inhibitory polimerazy NS5B czy inhibitory kompleksu replikacyjnego NS5A [39]. Przykładem inhibitora polimerazy NS5B jest sofosbufir, którego największą zaletą jest pangenotypowość, czyli skuteczność wobec wszystkich genotypów HCV. Badania nad stosowaniem tego preparatu w monoterapii wykazały, iż stosowany u pacjentów zakażonych genotypem 2 HCV jest wysoce skuteczny (odsetek SVR sięgał 86 - 97%), natomiast u pacjentów zakażonych innymi genotypami dawał dobre efekty (odsetek SVR ok. 90%) [33]. Aktualnie obowiązujące w Polsce schematy leczenia przewlekłych

zapaleń wątroby typu C obejmują trzy kategorie leków - bezpośrednio działające leki przeciwwirusowe (DAAs), interferony oraz kategorię leków, do której zaliczana jest rybawiryna. Wśród leków przeciwwirusowych uwzględnionych w aktualnych polskich rekomendacjach znajdują się inhibitory proteazy serynowej NS3 (glekaprewir, woksylaprewir, parytaprewir, grazoprewir), inhibitory domeny NS5A (daclataswir, elbaswir, ledipaswir, ombitaswir, pibrentaswir, welpataswir) oraz inhibitory polimerazy NS5B (dazabuwir i sofosbuwir) [40]. Zgodnie z zaleceniami Polskiej Grupy Ekspertów terapię powinno ustalać się indywidualnie dla każdego pacjenta, mając na uwadze jej dostępność, skuteczność i bezpieczeństwo chorego. Eksperci zalecają stosowanie leków DAAs w terapiach łączonych – od dwóch do trzech inhibitorów NS3, NS5A i NS5B, z ewentualnym uzupełnieniem o rybawiryne [40].

W trakcie leczenia wskazane jest monitorowanie stanu włóknienia wątroby, a w przypadku osób ze stwierdzoną marskością wątroby należy wykonywać badania diagnostyczne w kierunku raka wątrobowokomórkowego - HCC (ang. *hepatocellular carcinoma*). Obejmują one badanie ultrasonograficzne wątroby oraz dodatkowo oznaczanie poziomu w surowicy α -fetoproteiny (AFP). Badanie USG wątroby wykonuje się obowiązkowo przed rozpoczęciem terapii oraz nie później niż po 12 tygodniach od jej zakończenia, a następnie w odstępach 24-tygodniowych przez okres nie krótszy niż 4 lata po zakończeniu leczenia. U pacjentów z marskością wątroby lub dodatnim wywiadem w kierunku HCC, badania USG należy wykonywać długotrwale [40, 41, 42].

Zrozumienie zasad powstawania lekoopornych wirusów ma kluczowe znaczenie przy stosowaniu ukierunkowanych terapii przeciwwirusowych. HCV jest wirusem, który replikuje bardzo szybko. Podczas tworzenia każdego nowego wirusa enzym polimeraza powoduje średnio od 1 do 3 błędów na cykl replikacji. Wiele z tych błędów nie ma żadnego wpływu na potomny produkt wirusowy, jednak w przypadku niektórych nowo

produkowanych wirusów, błędy transkrypcji powodują zmiany w krytycznych regionach kodujących, które mogą zmienić podatność wirusa na jeden lub więcej leków stosowanych w leczeniu. Pojawienie się takich lekoopornych wirusów występuje najczęściej, gdy poziomy leku są subterapeutyczne. Dochodzi wówczas do presji selekcyjnej, a oporne wirusy zaczynają stanowić populację dominującą [43]. Niepowodzenia terapeutyczne wiążą się najczęściej z pojawieniem substytucji w genomie wirusa związanych z wystąpieniem lekooporności - RASs (ang. *resistance-associated substitutions*). Substytucje te głównie występują w regionie NS5A i są największą przeszkodą na drodze do osiągnięcia 100% skuteczności wszystkich dostępnych schematów terapeutycznych. Nadzieję na rozwiązanie tego problemu dają prowadzone obecnie badania kliniczne nad optymalizacją leczenia, które polegać mają na odpowiednim scharakteryzowaniu pacjenta pod kątem dostępnego profilu oporności wraz z wydłużeniem czasu trwania terapii i dodaniu rybawiryny, jak również zastosowaniu leków pangenotypowych, które wydają się być w pełni skuteczne, także w przypadku wystąpienia RASs.

Coraz wyższa skuteczność terapii bezinterferonowych przewlekłych zapaleń wątroby typu C budziła do niedawna nadzieję na możliwość całkowitej eliminacji zakażenia HCV w skali globalnej. Najnowsze badania dowodzą jednak, iż terapie oparte na stosowaniu DAAs choć wykazują się dużą skutecznością, nie eliminują tego światowego problemu w sposób ostateczny - wielu pacjentów, którzy uzyskali SVR po zastosowaniu terapii pozostaje bowiem w grupie ryzyka re-infekcji. U pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby terapie te nie stymulują bowiem wystarczająco limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺, które odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej przeciwko infekcji HCV [44,45]. Silna i szeroka odpowiedź limfocytów T obserwowana jest bowiem u osób, które spontanicznie eliminowały zakażenie HCV w odróżnieniu od pacjentów, u których choroba przyjmowała postać przewlekłą, a którzy charakteryzowali się słabą i wąską odpowiedzią

przy udziale limfocytów T [46]. Z tego powodu trwają prace nad stworzeniem profilaktycznego szczepienia dedykowanego pacjentom, którzy z powodzeniem zakończyli terapię DAAs, a z powodu stylu życia mogą być narażeni na kolejne zakażenie [47].

Niezbędnym warunkiem musiałyby być jednak nieograniczona dostępność do nowoczesnych terapii, które ze względu na ich wciąż wysokie koszty nie są oferowane wszystkim pacjentom.

Drugim bezwzględny warunkiem musiałyby być powszechna i wczesna wykrywalność zakażenia HCV [36]. Obecnie największym problemem dotyczącym zagadnienia zakażeń HCV pozostaje niezidentyfikowana ilość osób zakażonych tym wirusem. Szacuje się, że na świecie jest takich osób aż 160 milionów, w Polsce liczbę tę określa się na poziomie 200 tysięcy osób. Najbardziej niebezpieczne jest to, że aż 80% z tych osób nie wie o swoim zakażeniu, stanowiąc zagrożenie dla otoczenia i uniemożliwiając eradykację wirusa zarówno w Polsce jak i na świecie [48].

2. Cel i założenia pracy

Rodzaj leczenia i jego skuteczność warunkowane określonym genotypem chorego to aktualny trend współczesnej medycyny. Zainteresowanie tym zagadnieniem dotyczy także osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C. Przed wprowadzeniem terapii obejmującej bezpośrednio działające leki przeciwwirusowe (DAAs) stosowano leczenie z zastosowaniem pegylowanego interferonu w połączeniu z rybawiryną, które charakteryzuje się stosunkowo niską skutecznością przy równoczesnej wysokiej uciążliwości dla pacjentów, związanej z licznymi objawami ubocznymi, takimi jak gorączka, stan podgorączkowy, uczucie zmęczenia, bóle głowy i mięśni czy zaburzenia snu. Biorąc pod uwagę te ograniczenia, prowadzono badania w kierunku znalezienia czynników predykcyjnych jeszcze przed rozpoczęciem leczenia, które wskażą najwyższą możliwość eliminacji HCV. Jednym z najważniejszych odkryć była identyfikacja polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu kodującego interferon lambda 3 (*INFL3*) - interleukinę 28B (IL-28B). Badania wskazały, iż określony genotyp genu kodującego interleukinę 28B wpływa bezpośrednio na przebieg choroby i odpowiedź na leczenie u osób zakażonych wirusem HCV. Opisane polimorfizmy IL28B to najsilniejszy, lecz nie jedyny czynnik pozwalający prognozować przebieg zakażenia i skuteczność prowadzonego leczenia. Do grupy pozostałych czynników zalicza się płeć i wiek pacjenta, współwystępowanie innych chorób, stan funkcji wątroby, nadużywanie alkoholu i nałogowe palenie tytoniu.

Mając powyższe na uwadze określono założenia i cel pracy, które miały odpowiedzieć na pytanie jakie czynniki związane z wirusem HCV i gospodarzem - osobą zakażoną wpływają na przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu C i odpowiedź na zastosowane leczenie w grupie pacjentów z rejonu Wielkopolski.

Cel pracy realizowano poprzez:

1. Określenie występowania wariantów polimorfizmów rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu IL28B w badanej grupie pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C.
2. Analizę związku występowania określonego wariantu polimorfizmu genu IL28B z obrazem klinicznym zakażenia, genotypem wirusa i jego kinetyką.
3. Analizę czynników metabolicznych, współistnienia chorób przewlekłych, konsumpcji alkoholu i palenia tytoniu i ich wpływu na przebieg procesu leczenia u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C.

3. Materiał i metody

3.1 Materiał

Grupę badaną stanowiło 611 osób (332 mężczyzn i 279 kobiet) w wieku 20 – 74 lat, będących pacjentami Poradni Chorób Zakaźnych Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia w Poznaniu w latach 2014 - 2017. Kryterium doboru do grupy badanej stanowiło potwierdzenie obecności HCV-RNA - materiału genetycznego wirusa C zapalenia wątroby w surowicy krwi pacjentów. Analizowane dane obejmowały: płeć, wiek badanych, rodzaj stosowanego leczenia, odpowiedź na leczenie, poziom aminotransferazy alaninowej - ALT, genotyp wirusa i wielkość wirerii HCV oraz rodzaj polimorfizmów genu interleukiny 28B. Za kryterium odpowiedzi na zastosowane leczenie przyjęto uzyskanie przez pacjentów trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR), co jest równoznaczne z brakiem obecności HCV RNA po 24 tygodniach terapii.

Wszyscy pacjenci zostali poinformowani o celu i zakresie badań. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu - numer uchwały 340/15 z dnia 09.04.2015 roku.

3.2 Metody

3.2.1. Izolacja HCV-RNA z surowicy

Do próbki o pojemności 2 ml dodawano 200 µl próbki surowicy i 640 µl przygotowanej wcześniej mieszaniny MasterMix składającej się z buforu lizującego (*Lysis Buffer RV*), roztworu *Carrier RNA* i Proteinazy K. Następnie próbkę inkubowano przez 10 minut w temperaturze 65°. W kolejnym etapie do próbki dodawano 400 µl roztworu *Binding Solution* i całość mieszano poprzez pipetowanie. Z tak przygotowanego roztworu przenoszono 650 µl na minikolumnę, inkubowano przez 1 minutę, a następnie wirowano przez minutę przy obrotach 6000 x g. Po wirowaniu próbkę 2 ml odrzucano, a minikolumnę przenoszono do nowej czystej próbki o pojemności 2 ml. Następnie próbkę poddawano dwukrotnie płukaniu (600 µl buforu płuczającego - *Wash Buffer R1* i *Wash Buffer R2*), każdorazowo próbkę wirując przez minutę przy obrotach 6000 x g. Następnie odrzucano tę próbkę 2 ml, a minikolumnę przenoszono do czystej próbki 2 ml i wirowano przez dodatkową minutę przy maksymalnych obrotach. Etap ten zapewnić ma usunięcie pozostałości etanolu. Po wirowaniu próbkę 2 ml odrzucano, a minikolumnę przenoszono do czystej 1,5 ml próbki. W ostatnim etapie na minikolumnę nanoszono 60 µl buforu elucyjnego (*Elution Buffer R*) podgrzanego do temperatury 65°C. Po 3- minutowej inkubacji, całość wirowano przez 1 minutę przy 6000 x g. Na tym etapie wirusowy RNA wmywany jest z minikolumny. Po wirowaniu minikolumnę odrzucano, a otrzymany eluat wykorzystywany jest do dalszych badań. Wszystkie izolaty przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.2. Oznaczanie wiremii HCV

Dla oznaczania wiremii HCV zastosowano test *Gene-Proof Hepatitis C Virus HCV* (GeneProof a.s.) o czułości metody 50 IU/ml. Detekcja HCV opierała się na amplifikacji sekwencji 5` UTR wirusa i pomiarze wzrostu poziomu fluorescencji barwnika FAM w obecności wzorców wiremii HCV. Metodyka oznaczania HCV-RNA jest szczegółowo opisana przez producenta testu, w skrócie została przedstawiona poniżej. Do próbek typu PCR dodawano 40 µl roztworu MasterMix i 10 µl próbek po izolacji materiału genetycznego. Całość próbek krótko zwirowano i umieszczono w termocyklerze zgodnie z programem przeznaczonym do amplifikacji materiału genetycznego.

3.2.3. Określenie genotypu HCV

Genotyp HCV oznaczano przy użyciu testu VERSANT HCV Genotype 2.0 Assay (*LiPA*). Test ten wykorzystuje technologię odwrotnej hybrydyzacji do wykrywania genotypów 1-6 i podtypów 1a i 1b.

Badania molekularne oznaczania wiremii i genotypu HCV wykonywano w Zakładzie Diagnostyki Medycznej w Poznaniu, jako rutynowe badania diagnostyczne.

3.2.4. Izolacja genomowego DNA z komórek nabłonka błony śluzowej

Materiałem wyjściowym do badań w przypadku 118 pacjentów były komórki nabłonka błony śluzowej jamy ustnej. Do izolacji genomowego DNA dla tych prób wykorzystano zestaw *Invisorb® Spin Tissue Mini Kit /Stratec molecular/*. Procedurę izolacji przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producenta. Wymazy (dwie sztuki na jedną próbę) przenoszono do próbki zawierającej 600 µl buforu do lizy (oznaczonego przez

producenta symbolem „G”) i 40 µl enzymu *Proteinazy K* (Sigma-Aldrich). Całość inkubowano przez 15 minut w temperaturze 65°C (mieszając). Po inkubacji wymazówki odrzucano, a do otrzymanego lizatu dodawano po 300 µl buforu wiążącego oznaczonego symbolem „A” (*Binding Buffer A*). Całość próbki nanoszono na minikolumnę zawierającą żłozę krzemionkowe, umieszczoną na drugiej probówce o objętości 2 ml. Po inkubacji trwającej 1 minutę (w temperaturze pokojowej) minikolumnę z zawartością wirowano przez 2 minuty przy obrotach 11 000 x g (w temperaturze pokojowej). Następnie odrzucano przesącz, a minikolumnę umieszczano w nowej, czystej probówce o objętości 2 ml. Dwukrotnie próbkę poddawano płukaniu przy użyciu 550 µl buforu płuczającego (*Wash Buffer*) i wirowano przez 1 minutę przy obrotach 11 000 x g (w temperaturze pokojowej). Po odrzuceniu przesączu, minikolumnę umieszczano w czystej probówce o objętości 2 ml i wirowano przez 4 minuty przy maksymalnych obrotach w temperaturze pokojowej, w celu osuszenia membrany. Po wirowaniu minikolumnę umieszczano w czystej probówce o pojemności 1,5 ml typu Eppendorf. W ostatnim etapie na minikolumnę nanoszono 60 µl buforu elucyjnego (*Elution Buffer*) o temperaturze 52°C. Po inkubacji trwającej 3 minuty w temperaturze pokojowej całość wirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Po wirowaniu minikolumnę odrzucano, a otrzymany eluat wykorzystywano do dalszych badań. Wszystkie izolaty przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.5. Izolacja genomowego DNA z leukocytów krwi obwodowej

Dla pozostałych 493 próbek materiałem wyjściowym do badań była krew obwodowa pobrana na EDTA i wirowana w gradiencie gęstości *Histopaque®-1077* (Sigma-Aldrich) w celu uzyskania frakcji komórek jednojądrzastych (PBMCs – ang. *peripheral blood mononuclear cells*). Genomowe DNA izolowano z 1 x 10⁶ PBMCs zawieszonych w

roztworze soli buforowanej fosforanami (do 200 µl) przy pomocy zestawu *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit* (Qiagen). Procedurę izolacji przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producenta.

W pierwszym etapie do 1×10^6 PBMCs dodawano 20 µl enzymu *Proteinazy K* (Sigma-Aldrich). Całość mieszano poprzez pipetowanie i dodawano 200 µl buforu lizującego (*Buffer AL*). Następnie próbkę mieszano przy użyciu vortexu przez 15 sekund i inkubowano w temperaturze 56°C przez 10 minut. Po lizie próbkę ponownie krótko wirowano. W kolejnym etapie do próby dodawano 200 µl etanolu (96%). Całość mieszano przy użyciu vortexu przez 15 sekund, a następnie próbkę ponownie wirowano. Tak przygotowany roztwór przenoszono na minikolumnę zawierającą złożę krzemionkowe, umieszczoną w próbówce o pojemności 2 ml. Następnie minikolumnę z roztworem wirowano przez 1 minutę przy obrotach 6000 x g (w temperaturze pokojowej). Po wirowaniu próbkę 2 ml odrzucano, a minikolumnę przenoszono do nowej czystej próbówki o pojemności 2 ml. Następnie próbkę poddawano dwukrotnie płukaniu (500 µl buforu płuczącego (*Buffer AW1* i *Buffer AW2*)). Całość wirowano przez 3 minuty przy obrotach 20 000 x g. Następnie odrzucano próbkę 2 ml, a minikolumnę przenoszono do czystej próbówki 2 ml i wirowano przez dodatkową minutę przy maksymalnych obrotach. Po wirowaniu próbkę 2 ml odrzucano, a minikolumnę przenoszono do czystej 1,5 ml próbówki. W ostatnim etapie na minikolumnę наносzono 60 µl buforu elucyjnego (*Buffer AE*). Po 5- minutowej inkubacji, całość wirowano przez 1 minutę przy 6000 x g. Na tym etapie DNA wymywany jest z minikolumny. Po wirowaniu minikolumnę odrzucano, a otrzymany eluat wykorzystywano do dalszych badań. Wszystkie izolaty przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.6. Ocena ilości i jakości genomowego DNA

Po wyizolowaniu DNA z badanych próbek, istotnym dla dalszej analizy genetycznej jest oznaczenia stężenia i czystości uzyskanego preparatu. W tym celu dokonywano pomiaru spektrofotometrycznego przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Stężenie otrzymanego preparatu DNA obliczano z pomiaru absorpcji przy długości fali 260 nm. Przyjmuje się, że gdy A260 równa się 1, to stężenie dwuniciowego DNA (dsDNA) wynosi około 50 µg/ml. Jest to wartość przybliżona, ponieważ wartość współczynnika ekstynkcji zależy od składu zasad azotowych w DNA. Miarą czystości uzyskanego w procesie izolacji DNA jest stosunek A260/A280, a dokładniej jest to miarą zanieczyszczenia DNA białkami (maksimum absorpcji UV dla białek wynosi 280 nm). Przyjmuje się, że preparat DNA jest czysty, jeżeli A260/A280 mieści się w zakresie 1,8-2,0. Wszystkie izolaty DNA spełniały kryteria jakości oraz wystarczającej ilości matrycy do dalszych analiz.

3.2.7. Oznaczenie polimorfizmów genu interleukiny 28B

Kolejnym etapem badań była amplifikacja wyizolowanego DNA ze starterami dla określonych fragmentów genu IL-28B przy wykorzystaniu techniki PCR (ang. *polymerase chain reaction*). W wyniku tej reakcji uzyskiwano produkty o wielkościach przedstawionych w tabeli 2.

Reakcja PCR przeprowadzana była w próbkach o całkowitej objętości równej 25 µl. Do reakcji używano bufor reakcyjny z 15 mM MgCl₂, dNTP o stężeniu wyjściowym 10mM, JumpStart™ Taq DNA Polymerase o stężeniu 2,5 IU/µl, startery F i R o stężeniach 20µM, matrycowy DNA oraz wodę. Dla polimorfizmów rs8099917 i rs12980275 w mieszaninie

reakcyjnej stosowano roztwór 25mM MgCl₂. Szczegółowe warunki reakcji PCR przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 2

Sekwencje starterów dla wybranych polimorfizmów genu interleukiny 28 B oraz wielkość uzyskanych produktów amplifikacji.

Gen	Polimorfizm	Starter	Sekwencja startera (5' - ... -3')	Wielkość Produktu
<i>IL28B</i>	rs12979860	F	GCGCTTATCGCATACGGCTA	189 pz
		R	GGGGCGAGGGGCTTTGCT	
<i>IL28B</i>	rs8099917	F	AGTCTTGTATTTACCTCCTGGAG	307 pz
		R	GCACTAGCTCTTGTCATTTGCCT	
<i>IL28B</i>	rs12980275	F	GAAGGAAGTTCTGACACATGCT	280 pz
		R	TGGTCCTAGTGGTGTGTTGCT	

Tabela 3

Warunki reakcji PCR zastosowane przy amplifikacji wybranych fragmentów polimorficznych genu interleukiny 28 B.

Etap		Temperatura	Czas
Aktywacja JumpStart™ Taq DNA Polymerase		94 °C	3 min.
Denaturacja	45 x	94 °C	15 s
przyłączenie starterów		60 °C ¹⁾ / 57 °C ²⁾ / 60 °C ³⁾	30 s
Synteza		72 °C	30 s

¹⁾ rs12979860, ²⁾ rs8099917, ³⁾ rs12980275

Uzyskane produkty oczyszczano z wykorzystaniem zestawu *NucleoSpin® Gel and PCR Clean up* (Macherey-Nagel) zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie sekwencjonowano wykorzystując metodę Sangera. Oznaczenia trzech badanych

polimorfizmów genu interleukiny 28B - rs12979860, rs8099917 i rs12980275 wykonano w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.

3.2.8. Badanie ankietowe pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C

Narzędziem wykorzystanym w tej części badań była autorska ankieta opracowana do celów niniejszej pracy. Jej wypełnienie było dobrowolne, a osoby, które zdecydowały się na jej wypełnienie wyrażały pisemną zgodę. Ankietę wysłano do 222 osób, dla których uzyskano pełne dane kliniczne - co stanowi 36,3% całej grupy badanej. Ze względu na retrospektywny charakter badań, grupa ta była mniejsza niż pierwotnie zakładano (pierwotnie zakładano badania ankietowane całej grupy badanej).

Ankieta zawierała pytania do samodzielnego wypełnienia o charakterze półotwartym i otwartym. Pytania dotyczyły zagadnień obejmujących występowanie u ankietowanych chorób współistniejących, nawyków związanych z paleniem papierosów czy spożyciem alkoholu oraz informacje o przyjmowanych lekach, jak również pytania dotyczące masy ciała i wzrostu. Odsetek zwrotu ankiet wyniósł 51,58% (114 ankiet). Wzór ankiety przedstawiono na rycinie 4.

Rycina 4

Badanie ankietowe pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C.

Szanowna Pani, Szanowny Panie,

Prowadzimy badanie naukowe, którego celem jest poprawa wyników leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu c. Tytuł tego badania brzmi: „Polimorfizm rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C - związek z obrazem klinicznym zakażenia, genotypem wirusa i jego kinetyką.” W badaniu planowana jest analiza, pozostających w dokumentacji medycznej Poradni Chorób Zakaźnych Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia wyników oznaczeń laboratoryjnych między innymi poziomu ALAT, wirerii i genotypu HCV, polimorfizmu IL28B oraz zastosowanego leczenia.

Zwracamy się z wielką prośbą o udział w badaniu. Jeśli wyrażą Państwo na to zgodę proszę o uzupełnienie danych zawartych w ankiecie poniżej. Równocześnie zobowiązujemy się do traktowania Państwa danych osobowych jako poufnych.

1. Imię, nazwisko.....
2. Data i miejsce urodzenia.....
3. Wiek Pani/Pana, w chwili rozpoznania zapalenia wątroby typu C
4. Masa ciała (kg).....Wzrost (cm).....Obwód pasa(cm).....
5. Czy choruje Pani/Pan na cukrzycę?.....
6. Czy ma Pani/Pan podwyższone poziomy cholesterolu? Jeżeli tak to czy leczy się Pani/Pan z tego powodu?.....
7. Czy choruje Pani/Pan na nadciśnienie?.....
8. Czy jest Pani/Pan pod opieką poradni specjalistycznych? Jeżeli tak to jakich?
.....
9. Czy przyjmuje Pani/Pan przewlekle leki? Jeżeli tak to jakie?.....
10. Czy pali Pani/Pan papierosy? Deklarowana ilość wypalanych papierosów:
sporadycznie
codziennie do 5 papierosów
codziennie 5-10 papierosów
codziennie powyżej 10 papierosów.....
11. Jak często spożywa Pani/Pan alkohol?(proszę zaznaczyć właściwą odpowiedź)
codziennie
kilka razy w tygodniu
kilka razy w miesiącu
raz w miesiącu
rzadziej niż raz w miesiącu

Ja niżej podpisana/podpisany wyrażam zgodę na użycie wyżej wymienionych danych we wspomnianym badaniu w celach naukowych

Podpis.....

Miejsce.....Data.....

3.2.9. Analiza statystyczna

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Do określenia istotności różnic użyto testu Chi kwadrat lub testu Fischera dla tablic 2x2 z obliczeniem OR oraz testu U-Manna-Whitneya. Istotność różnic wykazano dla poziomu $p < 0.05$.

Częstość występowania genotypów genu interleukiny 28B w badanej grupie została porównana z częstością oczekiwaną wynikającą z równowagi Hardy’ego-Weinberga za pomocą kalkulatora statystycznego udostępnionego przez Tufts University, USA. Analizę nierównowagi sprzężeń przeprowadzono przy wykorzystaniu programu HaploView 4.2 (Broad Institute, USA).

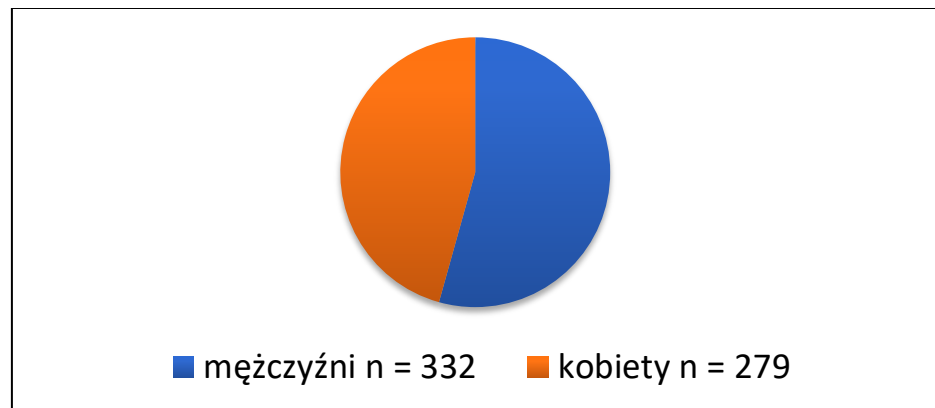
4. Wyniki

4.1. Charakterystyka grupy badanej

Grupę badaną stanowiło 611 osób (332 mężczyzn i 279 kobiet) w wieku od 20 do 74 lat, będących pacjentami Poradni Chorób Zakaźnych Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia w Poznaniu w latach 2014 - 2017. Kryterium doboru do grupy badanej stanowiło potwierdzenie materiału genetycznego wirusa C zapalenia wątroby w surowicy krwi pacjentów. Rozkład płci w całej badanej grupie był zbliżony, a stosunek kobiet do mężczyzn wynosił 1:1,19 (rycina 5). W zależności od wieku zachorowania wyodrębniono trzy podgrupy wiekowe: grupa ≤ 39 lat, grupa w przedziale wiekowym 40-64 lata i grupa osób ≥ 65 lat. Porównanie częstości zachorowań w poszczególnych przedziałach wiekowych pomiędzy kobietami i mężczyznami wykazało, że najczęściej chorowali mężczyźni młodsi (≤ 39 lat), choć różnica ta nie była istotna ($p=1,21$) (rycina 6). Mediana wieku chorych całej grupy wyniosła 42 lata, w tym 37 lat dla kobiet i 44 lata dla mężczyzn.

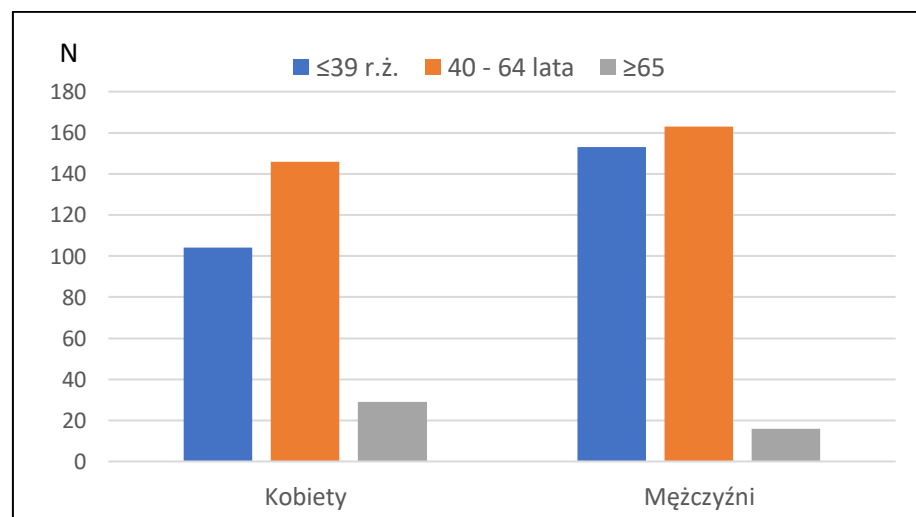
Rycina 5

Rozkład płci w badanej grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C.



Rycina 6

Rozkład wieku w badanej grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C w zależności od płci.



4.2. Występowanie polimorfizmów rs12979860, rs8099917 i rs12980275 IL28B w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wirusowym typu C

Analizie poddano trzy polimorfizmy genu interleukiny 28B - rs12979860, rs8099917 i rs12980275. Porównując częstość występowania wariantów wszystkich trzech polimorfizmów najczęściej występował wariant CT rs12979860, najrzadziej natomiast wariant GG rs8099917. Korzystny genotyp CC polimorfizmu rs12979860 wykazano u 98 pacjentów (16,0%), genotyp CT u 390 pacjentów (63,9% badanej grupy), a genotyp TT u 123 pacjentów (20,1%). W przypadku polimorfizmu rs8099917 korzystny genotyp TT stwierdzono u 256 pacjentów (41,9%), genotyp GT u 307 pacjentów (50,2% badanej grupy), a niekorzystny genotyp GG u 48 chorych (7,9%). W trzecim badanym polimorfizmie rs12980275, wariant korzystny AA odnotowano u 131 pacjentów (21,4%), AG u 373 chorych (61,0% badanej grupy), a niekorzystny genotyp GG stwierdzono u 107 pacjentów (17,6%). Graficzne porównanie wyników przedstawiono na rycinie 7, a szczegółowy rozkład występowania poszczególnych wariantów dla badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B przedstawiono w tabeli 4.

Obecność co najmniej dwóch polimorfizmów genu interleukiny 28B w korzystnych wariantach (CC, TT, AA) stwierdzono u 224 pacjentów (36,7%), w tym u 99 kobiet i 125 mężczyzn. Występowanie homozygot w wariantach korzystnych dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B odnotowano u 96 pacjentów (15,7%), w tym u 47 kobiet i 49 mężczyzn. Stwierdzono, że dystrybucja genotypów dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B nie była zgodna z rozkładem oczekiwanym zgodnie z prawem Hardy'ego-Weinberga ($p < 0,05$). Nierównowaga sprzężeń była umiarkowana pomiędzy polimorfizmami rs12979860 i rs8099917 ($r^2=0,42$) oraz między rs8099917 i rs12980275 ($r^2=0,47$). Polimorfizm rs12979860 pozostawał w silnej

nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem rs12980275 ($r^2=0,76$). Wartości D' dla rs12979860, rs8099917 i rs12980275 były większe od 0,95. Wartości D' dla rs12979860 i rs8099917, rs8099917 oraz rs12980275, rs12979860 i rs12980275 wynosiły odpowiednio 0,98, 0,96 i 0,95.

Tabela 4

Występowanie polimorfizmów rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B w badanej grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wirusowym typu C.

Polimorfizm rs12979860 (SNP C/T) - występują 3 możliwe warianty: C/C, C/T, T/T.

Genotyp:	Liczba pacjentów:
C/C	98
C/T	390
T/T	123
OGÓLEM:	611

Polimorfizm rs8099917 (SNP T/G) występują 3 możliwe warianty: T/T, T/G, G/G.

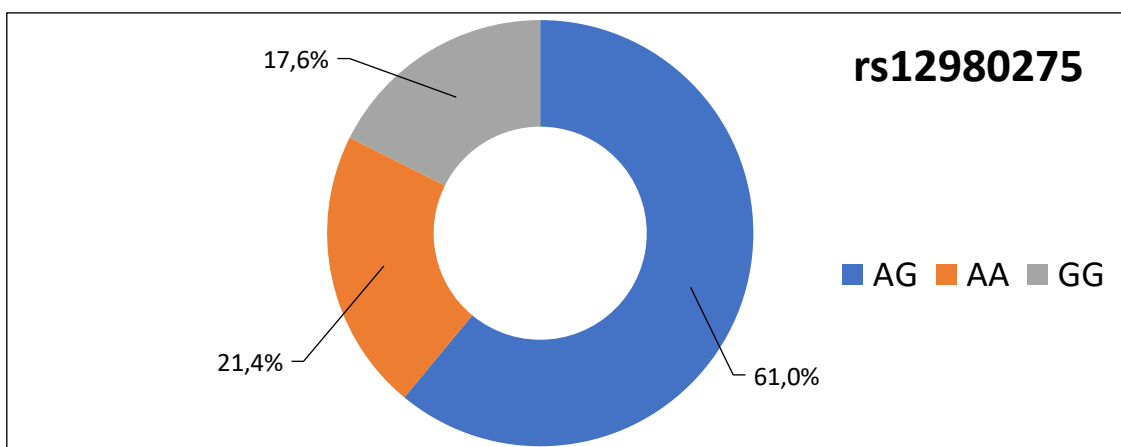
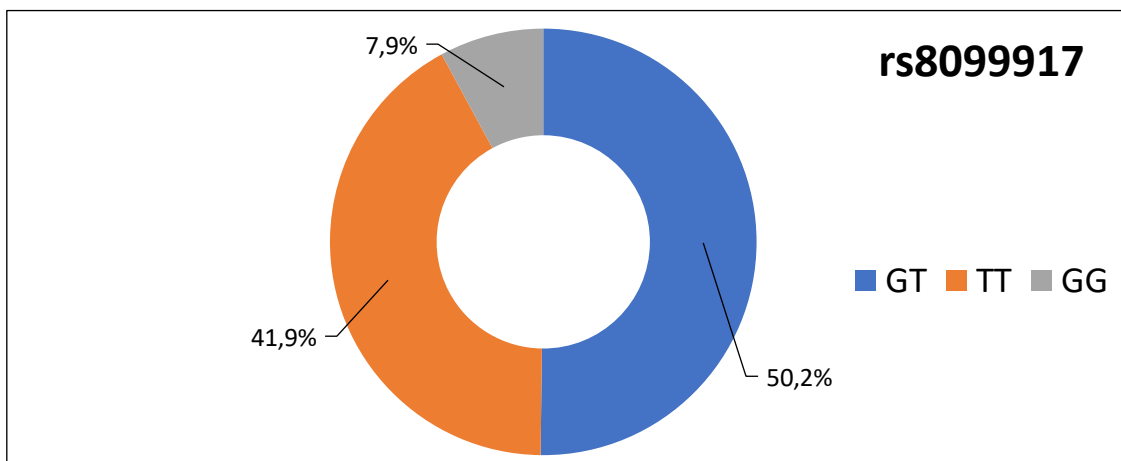
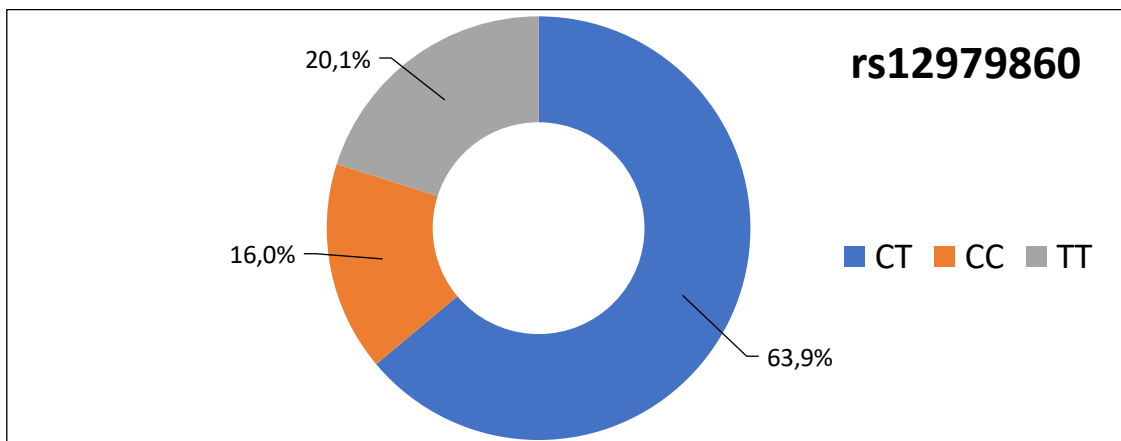
Genotyp:	Liczba pacjentów:
T/T	256
T/G	307
G/G	48
OGÓLEM:	611

Polimorfizm rs1298275 (SNP A/G) występują 3 możliwe warianty: A/A, A/G, G/G.

Genotyp:	Liczba pacjentów:
A/A	131
A/G	373
G/G	107
OGÓLEM:	611

Rycina 7

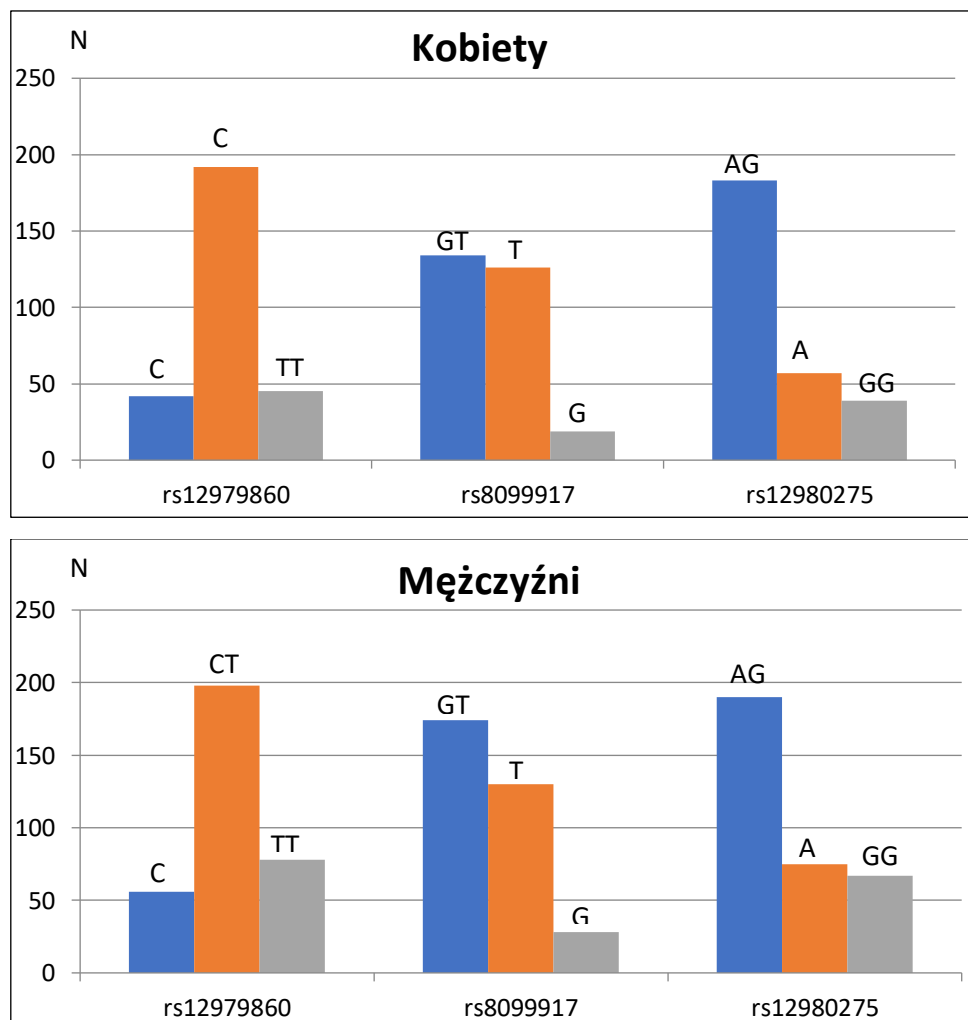
Udział procentowy występowania poszczególnych wariantów badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wirusowym typu C.



Dodatkowo przeanalizowano częstość występowania badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B odrębnie w grupie kobiet i mężczyzn (rycina 8). Nie wykazano istotnie częstszego występowania określonego wariantu polimorficznego genu interleukiny 28B w grupie kobiet w porównaniu z grupą mężczyzn ($p=1,08$).

Rycina 8

Rozkład polimorfizmów genu interleukiny 28B w zależności od płci pacjentów w grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C.

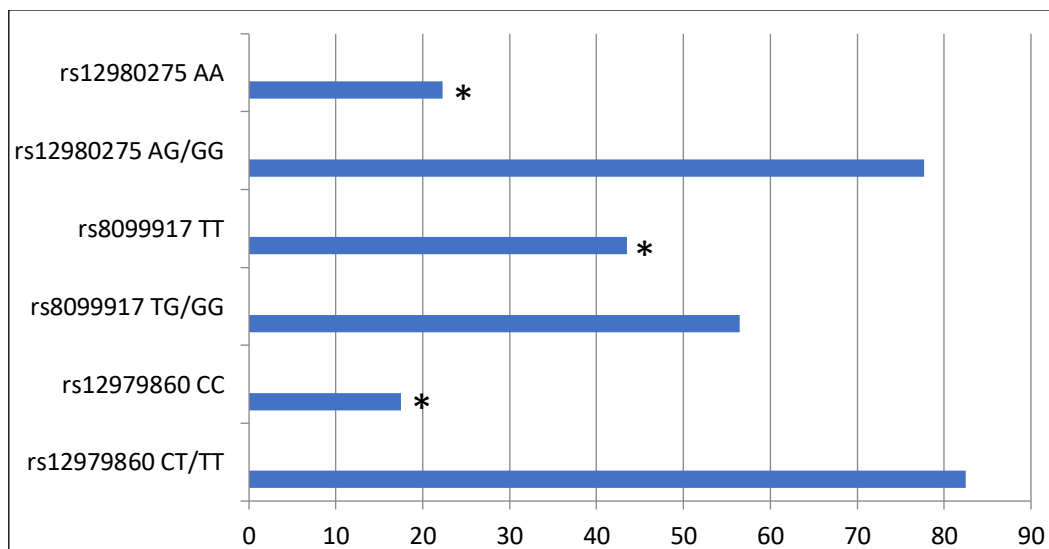


Poza oceną występowania określonych genotypów przeanalizowano także częstość występowania alleli poszczególnych polimorfizmów genu interleukiny 28B (rycina 9).

Porównując częstość występowania poszczególnych alleli dla wszystkich trzech polimorfizmów genu interleukiny 28B wykazano, że najczęstszym z występujących alleli był allel T rs809917, najrzadziej obserwowano natomiast allel G rs809917. Dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w analizowanej grupie chorych istotnie częściej obserwowano warianty niekorzystne w odniesieniu do przebiegu choroby i odpowiedzi na zastosowane leczenie ($p=0,03$). Graficzne przedstawienie uzyskanych wyników pokazano na rycinie 9.

Rycina 9

Częstość występowania alleli badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem typu C. Gwiazdkami zaznaczono korzystne pod względem przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie warianty polimorficzne genu interleukiny 28B.

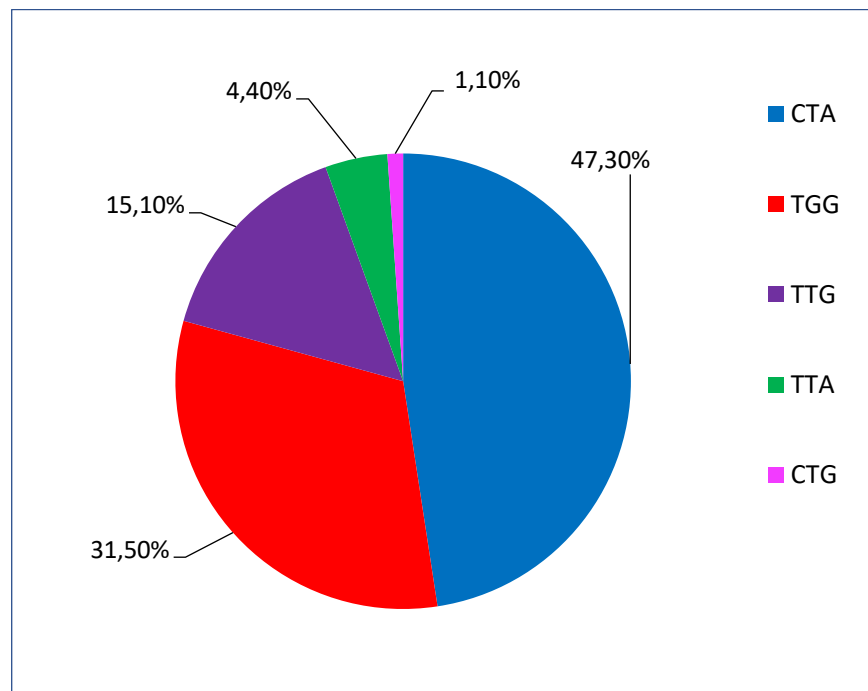


Kolejno dokonano analizy częstości występowania haplotypów dla badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w analizowanej grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. Najczęściej występującym haplotypem genu

interleukiny 28B był haplotyp CTA - stwierdzono go w 47,3% przypadków, najrzadziej zaś, bo zaledwie w 1,1% przypadków występował haplotyp CTG (rycina 10). Pozostałe haplotypy występowały odpowiednio z częstością 31,5% - TGG, 15,1% - TTG i 4,4% - TTA.

Rycina 10

Rozkład procentowy analizowanych haplotypów genu interleukiny 28B w badanej grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C.



4.3. Charakterystyka grupy pacjentów poddanych badaniu ankietowym

Do szczegółowej analizy, spośród badanej grupy, wybrano 222 osoby (co stanowi 36,3% całej grupy), których dane kliniczne były pełne i pozwoliły na dalszą analizę. Ze względu na retrospektywny charakter badań, nie istniała możliwość uzupełnienia brakujących informacji u pozostałych osób z grupy badanej. Niemal wszyscy pacjenci poddani badaniu ankietowemu (219 osób) leczeni byli z zastosowaniem dwulekowej terapii przeciwwirusowej opartej na skojarzonym podawaniu pegylowanego interferonu alfa wraz z rybawiryną. Pozostałe osoby poddane były terapii trójlekowej z dodaniem omeprviru (2 osoby) lub monoterapii z użyciem pegylowanego interferonu alfa (1 osoba). U wszystkich pacjentów poddanych badaniu ankietowemu oznaczono genotyp wirusa HCV, określono wiremię przed rozpoczęciem terapii oraz zbadano warianty polimorficzne genu interleukiny 28B.

Grupę pacjentów poddanych badaniu ankietowemu i leczonych przeciwwirusowo stanowiło 89 kobiet i 133 mężczyzn w wieku od 20 do 74 lat, z medianą wieku wynoszącą odpowiednio 41 lat dla kobiet i 44 lata dla mężczyzn. Średni poziom wiremii przed rozpoczęciem leczenia mieścił się w granicach $2,13 \times 10^3$ – $12,36 \times 10^6$ IU/ml dla kobiet i $4,22 \times 10^3$ – $9,64 \times 10^6$ IU/ml dla mężczyzn. Dane osób grupy poddanej badaniu ankietowemu obejmujące wiek, płeć, polimorfizm genu IL28B oraz rodzaj zastosowanej terapii przedstawia tabela 5.

Tabela 5

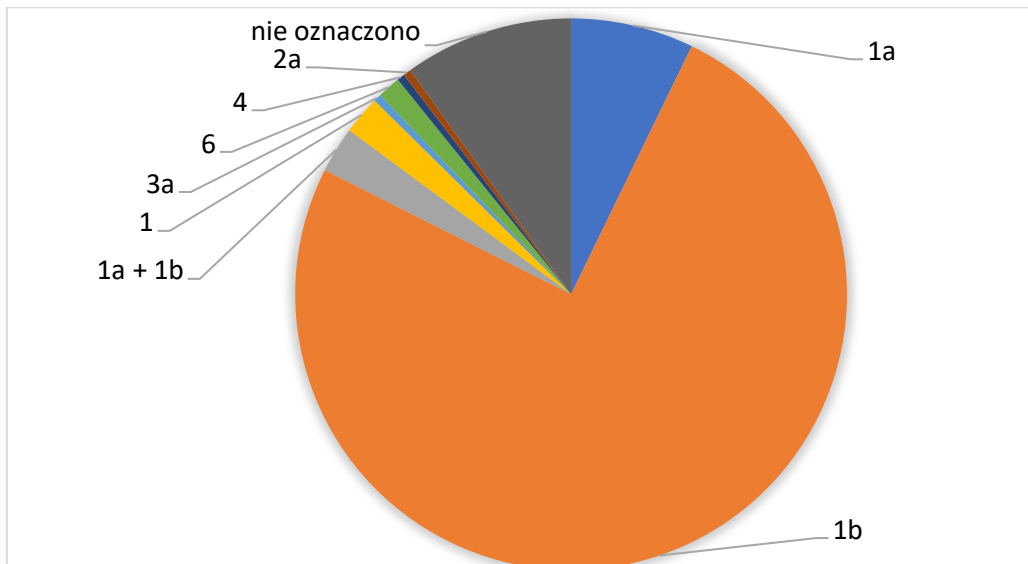
Dane 222 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C poddanych badaniu ankietowemu.

Zmienna	Kobiety		Mężczyźni	
	N	%	n	%
Wiek	89	40,1	133	59,9
• ≤39 r. ż.	28	12,6	48	21,6
• 40 – 64 r. ż.	50	22,5	70	31,5
• ≥65 r. ż.	11	5,0	15	6,8
Polimorfizmy IL28B				
rs12979860				
• homozygota CC	18	8,0	26	11,7
• pozostałe genotypy	71	32,1	107	48,2
rs8099917				
• homozygota TT	45	20,3	52	23,4
• pozostałe genotypy	44	19,8	81	36,5
rs12980275				
• homozygota AA	23	10,3	34	15,3
• pozostałe genotypy	66	29,8	99	44,6
Stosowane leczenie				
- Pegasys	24	9,2	39	17,5
- Pegasys/Pegintron	24	9,2	43	19,4
- Pegintron	40	18,0	47	21,2
- Terapia trójlekowa	-	-	2	0,9
- Inne	1	0,4	2	0,9

Analiza genotypu HCV w grupie 222 chorych pokazała, że najczęściej występującym genotypem był genotyp 1b (u 167/222 chorych - 75%). Pozostałe genotypy wirusa wykrywano zdecydowanie rzadziej: genotyp 1a u 16/222 osoby (7%), genotyp 3a u 3 pacjentów (1%) oraz po jednym genotypie 2a, 4 i 6. Występowanie mieszanych genotypów 1a+1b stwierdzono u 6 osób (3%). U 5 chorych (2%) określono jedynie genotyp jako 1, bez możliwości dalszego typowania. Nie udało się oznaczyć genotypu HCV u 22 osób, co stanowiło 10% grupy chorych poddanych badaniu ankietowemu. Częstość występowania poszczególnych genotypów HCV została szczegółowo przedstawiona na rycinie 11.

Rycina 11

Występowanie poszczególnych genotypów wirusa HCV w grupie 222 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C poddanych badaniu ankietowemu.

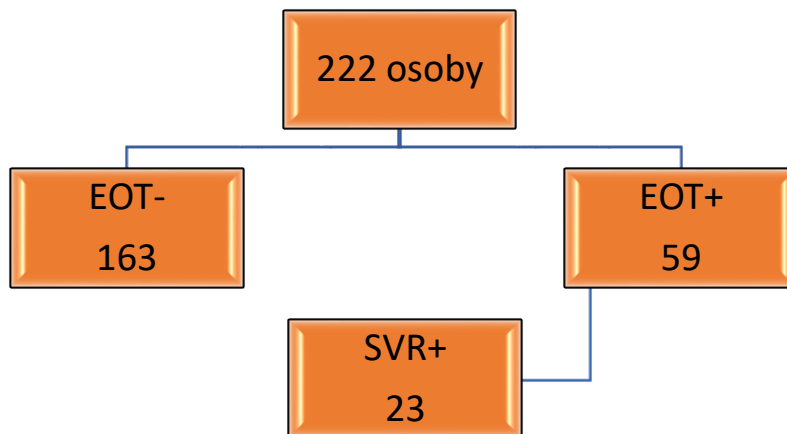


4.3.1 Skuteczność prowadzonego leczenia w ankietowanej grupie 222 osób z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C

Skuteczność prowadzonego leczenia monitorowana była poprzez ilościową ocenę materiału genetycznego HCV w surowicy krwi pacjentów. Pomiarów tych dokonywano odpowiednio po upływie czterech, dwunastu, dwudziestu czterech i czterdziestu ośmiu tygodni leczenia. Ostatniej oceny skuteczności prowadzonej terapii dokonywano także po upływie sześciu miesięcy od zakończenia leczenia. W pracy przeanalizowano dwa najważniejsze punkty czasowe – to jest moment zakończenia leczenia przeciwwirusowego i okres 6 miesięcy od zakończenia terapii. Spośród wszystkich 222 leczonych osób, 59 osób (27%) uzyskało odpowiedź na zakończenie terapii (48 tygodni, EOT- ang. *End of Treatment Response*). Spośród nich tylko 23 pacjentów (10% całej grupy leczonych) uzyskało trwałą odpowiedź wirusologiczną (SVR- ang. *Sustained Viral Response*). Pozostałe 199 osób (90%), to pacjenci, którzy nie uzyskali trwałej eliminacji HCV RNA. Graficzne przedstawienie wyników leczenia w grupie chorych poddanych badaniu ankietowemu przedstawia rycina 12.

Rycina 12

Wyniki leczenia w grupie 222 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby poddanych badaniu ankietowemu (EOT+ uzyskanie odpowiedzi na koniec terapii – eliminacja HCV RNA; EOT- brak uzyskania odpowiedzi na koniec leczenia, SVR+ uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej – trwała eliminacja HCV RNA).



4.3.2 Analiza danych ankietowych pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby.

Grupa pacjentów, która odesłała ankietę obejmowała 114 osób. Zwrot ankiet wyniósł 51,4%. W tej grupie chorych było 58 kobiet i 56 mężczyzn w wieku od 20 do 70 lat. Na podstawie obliczonego wskaźnika BMI ustalono, iż 68 osób spośród 114 cechowało się nadwagą – BMI ≥ 25 (59,6%), 45 pacjentów (39,5%) posiadało BMI w przedziale 18,5 – 24,99, a jedna osoba charakteryzowała się niedowagą - BMI $\leq 18,5$ (0,9%). W analizowanej grupie 114 pacjentów 30 osób chorowało na nadciśnienie (26,3%), 14 pacjentów na cukrzycę (12,3%), a 13 chorych (11,4%) deklarowało podwyższony poziom cholesterolu. Z całej grupy 37 spośród 114 osób (32,5%) odpowiedziało, że pali okazjonalnie, a 25 osób (21,9%)

było nałogowymi palaczami. Analiza wypełnionych ankiet pozwoliła również ustalić deklaracyjną częstość spożycia alkoholu. Trzy osoby (2,6%) spożywały alkohol kilka razy w tygodniu, 13 pacjentów (11,4%) kilka razy w miesiącu, 13 chorych (11,4%) raz w miesiącu, 50 osób rzadziej niż raz w miesiącu (43,9%), zaś 35 chorych (30,7%) deklarowało, iż nie spożywa alkoholu wcale.

Szczegółową charakterystykę badanych pod kątem chorób przewlekłych, spożycia alkoholu, palenia papierosów przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6

Szczegółowa charakterystyka danych 114 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby, którzy zwrócili ankietę.

Zmienna	Kobiety		Mężczyźni	
	N	%	N	%
	58	50,9	56	49,1
Wiek				
≤39 r. ż.	25	21,9	20	17,5
40 – 64 r. ż.	28	24,6	34	29,8
≥65 r. ż.	5	4,4	2	1,8
Body mass index (BMI)				
≤18,5	1	0,9	-	-
18,5 – 24,99	33	28,9	12	10,5
≥ 25	24	21,0	44	38,7
Występowanie cukrzycy				
Tak	-	-	14	12,3
Nie	58	50,9	42	36,8
Występowanie nadciśnienia				
Tak	15	13,1	15	13,1
Nie	43	37,7	41	36,1
Podwyższony poziom cholesterolu				
Tak	9	7,9	4	3,5
Nie	49	43,0	52	45,6
Palenie papierosów				
Tak	11	9,7	14	12,3
Okazjonalnie	12	10,5	25	21,9
Nie	47	41,2	42	36,8
Spożycie alkoholu				
Kilka razy w tygodniu	1	0,9	2	1,8
Kilka razy w miesiącu	6	5,3	7	6,1
Raz w miesiącu	8	7,0	5	4,4
Rzadziej niż raz w miesiącu	27	23,6	23	20,2
Nigdy	16	14,0	19	16,7

„Polimorfizm rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C – związek z obrazem klinicznym zakażenia”

Dla wszystkich 114 osób z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby, które zwróciły ankietę, dokonano analizy danych klinicznych dotyczących poziomu wirerii HCV przed rozpoczęciem leczenia, genotypu HCV oraz genotypu IL-28B. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 7.

Tabela 7

Wiremia i genotyp HCV, genotyp IL28B oraz odpowiedź na stosowane leczenie w grupie 114 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby, którzy zwrócili ankietę.

Zmienna	Kobiety		Mężczyźni	
	N	%	N	%
	58	50,9	56	49,1
Średnia wiremia HCV [IU/ml] SD [IU/ml]	3,52 x 10 ⁵ 11,64 x 10 ⁵		3,76 x 10 ⁵ 12,17 x 10 ⁵	
Genotyp HCV				
1a	7	6,1	4	3,5
1b	47	41,2	46	40,3
1 a + b	1	0,9	1	0,9
1	1	0,9	3	2,6
4a/4c/4d	-	-	1	0,9
Nie oznaczono	2	1,8	1	0,9
Genotyp IL28B				
rs12979860 homozygota CC	7	6,1	11	9,7
rs12979860 pozostałe genotypy	51	44,7	45	39,5
rs8099917 homozygota TT	21	18,3	19	16,7
rs8099917 pozostałe genotypy	37	32,5	37	32,5
rs12980275 homozygota AA	10	8,7	11	9,7
rs12980275 pozostałe genotypy	48	42,1	45	39,5
Eliminacja HCV-RNA				
Samoistna	-	-	-	-
Po leczeniu	5	4,4	10	8,7

W dalszej części pracy przedstawiono analizę zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami a przebiegiem zakażenia HCV oraz efektem terapii przeciwwirusowej. Pośród 114 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby, którzy zwrócili ankietę przeanalizowano dane w momencie rozpoczęcia leczenia uwzględniające płeć (kobiety vs mężczyźni), aktywność aminotransferazy alaninowej (wartości ALT \leq 40 U/l vs $>$ 40U/l), poziom wirerii (niska wirerii vs wysoka) oraz efekt terapii przeciwwirusowej (SVR+ vs SVR-).

Wyjściowy poziom wirerii oznaczono dla 108 pacjentów spośród 114 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby, którzy zwrócili ankietę. Analizy dokonano względem dwóch wartości wyjściowego poziomu wirerii HCV – odpowiednio 400 000 IU/ml i 600 000 IU/ml. W obu przypadkach wykazano istotną zależność pomiędzy poziomem wirerii a polimorfizmami genu IL28B. Allel rs12979860C i rs12980275A występował istotnie rzadziej u chorych z poziomem wirerii w surowicy \leq 400 000 IU/ml. Genotypom genu IL28B rs12979860CC, rs8099917TT i rs12980275AA istotnie częściej towarzyszył wysoki poziom wirerii HCV w surowicy $>$ 400 000 IU/ml. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 8 i 9.

Tabela 8

Analiza wybranych parametrów klinicznych w odniesieniu do wyjściowej wielkości wirerii HCV w surowicy pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, którzy zwrócili ankietę.

Zmienna	Poziom wirerii ≤400 000 IU/ml (n=89)	Poziom wirerii >400 000 IU/ml (n=19)	OR (95% CI)	P
Płeć K / M n (%)	45(50,6) / 44(49,4)	9(47,4) / 10(52,6)	1.136 (0.422-3.064)	0.806
Wiek mediana (zakres) ≤40 / >40	52 (20-68) 33(37) / 56(63)	43 (24-70) 8(42,1) / 11(57,9)	0.810 (0.296-2.218)	0.103 0.680
BMI ≤25 / >25	43(48,3)/46(51,7)	8(42,1)/11(57,9)	1.285 (0.472-3.498)	0.624
Obwód pasa* prawidłowy/ nieprawidłowy	38(42,7) / 51(57,3)	8(42,1) / 11(57,9)	0.686 (0.243-1.937)	0.475
Cukrzyca Nie/Tak	78(87,6) / 11(12,4)	18(94,7) / 1(5,3)	0.394 (0.048-3.250)	0.467
Nadciśnienie Nie/Tak	64(71,9) / 25(28,1)	15(78,9) / 4(21,1)	0.672 (0.203-2.223)	0.512
Hypercholesterolemia Nie/Tak	80(89,9) / 9(10,1)	17(89,5) / 2(10,5)	1.046 (0.207-5.280)	1.0
Palenie papierosów Nie/Tak	72(80,9) / 17(19,1)	14(73,7) / 5(26,3)	1.607 (0.506-5.106)	0.524
Spożycie alkoholu Nie/Tak				
<kilka razy w tygodniu	29(32,6) / 60 (67,4)	3(15,8) / 16(84,2)	2.578 (0.695-9.557)	0.145
<kilka razy w miesiącu	86(96,6) / 3 (3,4)	19(100) / 0(0)	0.634 (0.031-12.775)	1.0
często	75(84,3) / 14 (15,7)	17(89,5) / 2(10,5)	0.630 (0.131-3.037)	0.732
genotyp HCV 1b/1a	79(88,8)/10(11,2)	16(84,2)/3(15,8)	1.425 (0.352-5.769)	0.700
SNP rs12979860 CC/CT/TT C/T CC/CT+TT	8(9,0)/61(68,5)/20(22,5) 77/101 8 (9) / 81 (91)	9(47,4)/8(42,1)/2(10,5) 26 / 12 9 (47) / 10 (53)	0.352 (0.167-0.742) 0.110 (0.035-0.349)	0.005** 0.0002
SNP rs8099917 TT/TG/GG T/G TT/TG+GG	26(29,2)/57(64,0)/6(6,8) 109/69 26 (29) / 63 (71)	11(57,9)/7(36,8)/1(5,3) 29/9 11 (58) / 8 (42)	0.490 (0.219-1.098) 0.3 (0.108-0.831)	0.079 0.017
SNP rs12980275 AA/AG/GG A/G AA/AG+GG	11(12,4)/64(71,9)/14(15,7) 86/92 11 (12) / 78 (88)	9(47,4)/8(42,1)/2(10,5) 26/12 9 (47) / 10 (53)	0.431 (0.205-0.908) 0.157 (0.052-0.471)	0.031 0.001

* Obwód pasa: prawidłowy dla kobiet: <80; prawidłowy dla mężczyzn: <94

** różnice istotne statystycznie oznaczono kolorem czerwonym

„Polimorfizm rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C – związek z obrazem klinicznym zakażenia”

Tabela 9

Analiza wybranych parametrów klinicznych w odniesieniu do wyjściowej wielkości wirerii HCV w surowicy pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, którzy zwrócili ankietę.

Zmienna	Poziom wirerii ≤600 000 (n=93)	Poziom wirerii >600 000 (n=15)	OR (95% CI)	P
Płeć K/M	n (%) 47(50,5)/46(49,5)	n (%) 7(46,7)/8(53,3)	1.168 (0.392-3.483)	1
Wiek mediana (zakres) >40/≤40	42 (5-65) 49(52,7)/44(47,3)	35 (18-50) 5(33,3)/10(66,7)	- 2.342 (0.740-7.407)	0.057 0.140
BMI ≤25/>25	44(47,3)/49(52,7)	7(46,7)/8(53,3)	1.026 (0.344-3.062)	1
obwód pasa* prawidłowy/nieprawidłowy	39(41,9)/54(58,1)	6(40,0)/8(60,0)	0.755 (0.239-2.382)	0.766
Cukrzyca Nie/Tak	82(88,2)/11(11,8)	14(93,3)/1(6,7)	0.533 (0.064-4.455)	0.696
Nadciśnienie Nie/Tak	66(71,0)/27(29,0)	12(80,0)/3(20,0)	0.635 (0.116-2.434)	0.557
wysoki poziom cholesterolu Nie/Tak	84(90,3)/9(9,7)	13(86,7)/2(13,3)	1.436 (0.279-7.401)	0.665
palenie papierosów Nie/Tak	75(80,6)/18(19,4)	12(80,0)/3(20,0)	1.028 (0.263-4.029)	1
spożycie alkoholu Nie/Tak <kilka razy w tygodniu <kilka razy w miesiącu często	30(32,3)/63(67,7) 90(96,8)/3(3,2) 77(82,8)/16(17,2)	2(13,3)/13(86,7) 15(100,0)/0(0,0) 15(100,0)/0(0,0)	3.095 (0.656-14.597) 0.834 (0.041-16.953) 0.152 (0.009-2.661)	0.222 1 0.120
Genotype HCV 1b/1a, n (%)	79(84,9)/10(10,8)	13(86,7)/2(13,3)	1.823 (0.442-7.522)	0.414
SNP rs12979860 CC/CT/TT C/T CC/CT+TT	10(10,8)/63(67,7)/20(21,5) 83/103 10(10,8)/83(89,2)	7(46,7)/6(40,0)/2(13,3) 20/10 7(46,7)/8(53,3)	0.403 (0.179-0.908) 0.138 (0.041-0.461)	0.030** 0.002**
SNP rs8099917 TT/TG/GG T/G TT/TG+GG	28(30,1)/59(63,4)/6(6,5) 115/71 28(30,1)/65(69,9)	9(60,0)/5(33,3)/1(6,7) 23/7 9(60,0)/6(40,0)	0.493 (0.201-1.208) 0.287 (0.093-0.884)	0.152 0.038**
SNP rs12980275 AA/AG/GG A/G AA/AG+GG	13(14,0)/66(71,0)/14(15,0) 92/94 13(14,0)/80(86,0)	7(46,7)/6(40,0)/2(13,3) 20/10 7(46,7)/8(53,3)	0.489 (0.217-1.102) 0.186 (0.058-0.599)	0.114 0.007**

* Obwód pasa: prawidłowy dla kobiet: <80; prawidłowy dla mężczyzn: <94

** różnice istotne statystycznie oznaczono kolorem czerwonym

Spośród 114 osób z grupy która wypełniła ankietę, 15 osób (13,1%) uzyskało SVR po zastosowanym leczeniu. U 67 osób (58,8%) terapia okazała się nieskuteczna, natomiast u pozostałych 32 osób z tej grupy badanych (28,1%) terapię przerwano zgodnie z prośbą pacjentów, głównie ze względu na złą tolerancję stosowanego leczenia lub nadzieje związane z leczeniem nowej generacji w przyszłości. Analiza wybranych parametrów klinicznych pacjentów poddanych terapii przeciwwirusowej, genotypu HCV oraz genotypu genu IL28B względem uzyskanej odpowiedzi na leczenie wskazuje jedynie na istotny związek między odpowiedzią na leczenie a występowaniem określonych polimorfizmów genu IL28B rs12979860, rs8099917, rs12980275. Ustalono, że u chorych z genotypem rs12979860CC szansa na uzyskanie odpowiedzi na leczenie jest około 13 razy większa niż u nosicieli allelu T, z kolei u chorych z genotypem rs8099917TT jest około 4 razy większa niż u nosicieli allelu G, a u chorych z genotypem rs12980275AA około 6 razy większa niż u nosicieli allelu G. Omówione wyniki zestawiono w tabeli 10.

Spośród pacjentów poddanych terapii przeciwwirusowej, pomiaru aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) przed rozpoczęciem terapii dokonano u 56 pacjentów. Stwierdzono, że chorzy bez otyłości ($BMI \leq 25$) mają istotnie większą szansę (około 3,5-krotną) na prawidłowy poziom ALT w porównaniu do chorych z otyłością ($BMI > 25$). Wyniki analizy zestawiono w tabeli 11.

„Polimorfizm rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C – związek z obrazem klinicznym zakażenia”

Tabela 10

Analiza wybranych parametrów klinicznych w odniesieniu do uzyskania SVR w grupie pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, którzy zwrócili ankietę.

Zmienna	SVR (n=15)	Brak SVR (n=67)	OR (95% CI)	P
Płeć K/M, n (%)	5 (33,3)/10 (66,7)	32 (47,8)/35 (52,2)	0.643 (0.191-2.168)	0.475
Wiek mediana (zakres) >40/≤40, n (%)	41 (18-58) 9(60,0)/6 (40,0)	44 (14-61) 39 (58,2)/28 (41,8)	- 0.911 (0.275-3.011)	0.749 0.886
BMI ≤25/>25, n (%)	6(40,0)/9 (60,0)	31 (46,2)/36 (53,8)	0.667 (0.205-2.165)	0.498
obwód pasa* Prawidłowy/nieprawidłowy, n (%)	5(33,3)/10 (66,7)	25 (37,3)/42 (62,7)	1.074 (0.305-3.781)	1
Cukrzyca Nie/Tak, n (%)	15(100,0)/0 (0,0)	57(85,0)/10 (15,0)	6.506 (0.354-119.633)	0.181
Nadciśnienie Nie/Tak, n (%)	12(80,0)/3 (20,0)	42 (62,7)/25 (37,3)	2.4 (0.596-9.671)	0.209
wysoki poziom cholesterolu Nie/Tak, n (%)	13(86,7)/2 (13,3)	59 (88,0)/8 (12,0)	0.929 (0.167-5.17)	1
palenie papierosów Nie/Tak, n (%)	13(86,7)/2 (13,3)	52 (77,6)/15 (22,4)	1,711 (0.331-8.850)	0.714
spożycie alkoholu Nie/Tak, n (%) rzadziej/kilka razy w miesiącu, n (%) rzadziej/kilka razy w tygodniu i częściej często, n (%)	5(33,3)/10 (66,7) 15(100,0)/0 (0,0) 15(100,0)/0 (0,0)	18 (26,9)/49 (73,1) 58 (86,6)/9(13,4) 66 (98,5)/1 (1,5)	1.186 (0.340-4.0) 0.979 (0.038-25.288) 5.602 (0.301-104.044)	1 1 0.182
genotyp HCV* 1b/1a, n (%)	15(100,0)/0 (0,0)	54 (80,6)/7 (10,4)	4.542 (0.241-85.746)	0.321
wiremia HCV RNA mediana (zakres) x10 ³ ≤400 000/>400 000, n (%) ≤600 000/>600 000, n (%) ≤800 000/>800 000, n (%)	71 (9.43-10600) 12 (80,0)/3 (20,0) 13 (86,7)/2 (13,3) 13 (86,7)/2 (13,3)	55.85 (1.08-4050) 49 (73,1)/16 (23,9) 52 (77,6)/13 (19,4) 54 (80,6)/11 (16,4)	- 0.923 (0.215-3.967) 1.5 (0.286-7.856) 1.3 (0.24506.913)	0.904 1 0.721 1
SNP rs12979860 CC/CT/TT C/T CC/CT+TT	7 (46,7)/8 (53,3)/0 (0,0) 22 /8 7 (46,7)/8 (53,3)	10(14,9)/45 (67,2)/12 (17,9) 65/69 10 (14,9)/57 (85,1)	4.019 (1.624-9.945) 13.125 (2.793-61.687)	0.002** 0.0009**
SNP rs8099917 TT/TG/GG T/G TT/TG+GG	10 (66,7)/5 (33,3)/0 (0,0) 25 /5 10 (66,7)/5 (33,3)	25 (37,3)/39 (58,2)/3 (4,5) 89 /45 25 (37,3)/42 (62,7)	3.136 (0.103-8.911) 4.4 (1.280-15.128)	0.027** 0.014**
SNP rs12980275 AA/AG/GG A/G AA/AG+GG	7 (46,7)/8 (53,3)/0 (0,0) 22 /8 7 (46,7)/8 (53,3)	13 (19,4)/47 (70,1)/7 (10,5) 73/64 13 (19,4)/54 (80,6)	2.862 (1.165-7.034) 6.125 (1.625-23.088)	0.019** 0.009**

* Obwód pasa: prawidłowy dla kobiet: <80; prawidłowy dla mężczyzn: <94

** różnice istotne statystycznie oznaczono kolorem czerwonym

„Polimorfizm rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C – związek z obrazem klinicznym zakażenia”

Tabela 11

Analiza wybranych parametrów klinicznych w odniesieniu do poziomu ALT w surowicy pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, którzy zwrócili ankietę.

Zmienna	ALT prawidłowy (≤40) (n=23)	ALT nieprawidłowy (>40) (n=33)	OR (95% CI)	P
Płeć K/M, n (%)	13 (56,5) / 10 (43,5)	13 (39,4) / 20 (60,6)	2.0 (0.679-5.892)	0.206
wiek (diagnoza) mediana (zakres) >40/≤40, n (%)	42 (18-61) 12 (52,2) / 11 (47,8)	45 (18-59) 18 (54,6) / 15 (45,4)	- 0.788 (0.266-2.333)	0.596 0.663
BMI ≤25/>25, n (%)	16 (70,0) / 7 (30,0)	13 (39,4) / 20 (60,6)	3.517 (1.136-10.884)	0.026**
obwód pasa* Prawidłowy/nieprawidłowy, n (%)	10 (43,5) / 13 (56,5)	9 (27,3) / 24 (72,7)	2.121 (0.666-6.760)	0.247
Cukrzyca Nie/Tak, n (%)	21 (91,3) / 2 (8,7)	29 (87,9) / 4 (12,1)	1.448 (0.242-8.656)	1
Nadciśnienie Nie/Tak, n (%)	18 (78,3) / 5 (21,7)	22 (66,7) / 11 (33,3)	1.8 (0.528-6.140)	0.385
wysoki poziom cholesterolu Nie/Tak, n (%)	19 (82,3) / 4 (17,7)	29 (87,9) / 4 (12,1)	0.655 (0.146-2.942)	0.704
palenie papierosów Nie/Tak, n (%)	18 (78,3) / 5 (21,7)	25 (75,8) / 8 (24,2)	1.152 (0.323-4.107)	0.823
spożycie alkoholu Nie/Tak, n (%)				
rzadziej/kilka razy w tygodniu, n (%)	5 (21,7) / 18 (78,3)	13 (39,4) / 20 (60,6)	0.427 (0.127-1.436)	0.164
rzadziej/kilka razy w miesiącu i częściej często, n (%)	22 (95,7) / 1 (4,3)	33 (100,0) / 0 (0,0)	0.224 (0.009-5.745)	0.411
	19 (82,3) / 4 (17,7)	32 (97,0) / 1 (3,0)	0.148 (0.015-1.428)	0.147
genotyp HCV 1b/1a, n (%)	20 (87,0) / 3 (13,0)	30 (90,9) / 3 (9,1)	0.444 (0.068-2.903)	0.639
wiremia HCV RNA mediana (zakres) x10 ³	54.3 (1.69-4050)	71.2 (1.08-2900)	-	0.522
≤400 000/>400 000, n (%)	17 (73,9) / 6 (26,1)	24 (72,7) / 9 (27,3)	1.275 (0.363-4.484)	0.762
≤600 000/>600 000, n (%)	17 (73,9) / 6 (26,1)	27 (81,8) / 6 (18,2)	0.756 (0.199-2.865)	0.739
≤800 000/>800 000, n (%)	17 (73,9) / 6 (26,1)	28 (84,8) / 5 (15,2)	0.607 (0.153-2.409)	0.723
SNP rs12979860 CC/CT/TT C/T CC/CT+TT	5 (21,7) / 18 (78,3) /0 (0,0) 28 / 18 5 (21,7) / 18 (78,3)	6 (18,2) / 20 (60,6) / 7 (21,2) 32 / 34 6 (18,2) / 27 (81,8)	1.653 (0.770-3.548) 1.25 (0.331-4.718)	0.196 0.742
SNP rs8099917 TT/TG/GG T/G TT/TG+GG	9 (39,1) / 14 (60,9) /0 (0,0) 32 / 14 9 (39,1) / 14 (60,9)	15 (45,4) / 16 (48,5) / 2 (6,1) 46 / 20 15 (45,4) / 18 (54,6)	0.994 (0.438-2.253) 0.771 (0.261-2.276)	1 0.639
SNP rs12980275 AA/AG/GG A/G AA/AG+GG	6 (26,1) / 17 (73,1) /0 (0,0) 29 / 17 6 (26,1) / 17 (73,1)	8 (24,2) / 22 (66,7) / 3 (9,1) 38 / 28 8 (24,2) / 25 (75,8)	1.157 (0.581-2.722) 1.103 (0.324-3.754)	0.560 1

* Obwód pasa: prawidłowy dla kobiet: <80; prawidłowy dla mężczyzn: <94

** różnice istotne statystycznie oznaczono kolorem czerwonym

5. Dyskusja

Od czasu zidentyfikowania w 1989 roku wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) jako czynnika wywołującego zapalenie wątroby, dokonał się olbrzymi postęp zarówno w rozpoznawaniu choroby, poznaniu kliniki zakażeń HCV, jak i w jego leczeniu. Uważa się, że wirusem HCV zakażone jest około 2,4% - 3% światowej populacji tj. od 170 do 200 milionów ludzi. Z powodu braku miarodajnych badań szacuje się, że 1,9% polskiego społeczeństwa może być nosicielami wirusa HCV [49]. Istotnym problemem pozostaje niska wykrywalność i niedostateczna identyfikacja osób będących nosicielami HCV, co może skutkować stałym powiększaniem się liczby osób zakażonych tym wirusem, pomimo aktualnie stosowanych skutecznych form terapii. Zakażenie HCV zwykle przebiega bez objawów lub skąpoobjawowo, a około 60% spośród osób zakażonych choruje na postać przewlekłą. U około 20% chorych przewlekle zakażonych wirusem dochodzi do rozwoju marskości wątroby lub raka wątrobowo komórkowego, a manifestacja pozawątrobowa przewlekłych zakażeń HCV ma miejsce u 30-40% chorych. Wykazano udział zakażenia HCV w indukowaniu rozrostów nowotworowych takich jak chłoniaki limfocytarne, czy szpiczaki, a inne choroby współwystępujące z zakażeniem HCV to krioglobulinemia mieszana, schorzenia o podłożu autommunologicznym (zapalenie tarczycy, AIH), choroby nerek (kłębkowe zapalenie nerek), schorzenia dermatologiczne (liszaj płaski, porfiria skórna późna), czy cukrzyca.

Podstawowym celem prowadzonego leczenia jest eliminacja zakażenia HCV oraz zatrzymanie lub ograniczenie ryzyka rozwoju marskości wątroby i raka wątrobowo komórkowego [50]. Innym bardzo ważnym celem leczenia jest eliminacja potencjalnych źródeł nowych zakażeń. Obecne opcje terapeutyczne – bezinterferonowe, oparte na DAA są nie tylko skuteczne, ale i bezpieczne, a zastosowanie w skojarzeniu ze sobą leków z różnych

grup DAA podniosło jeszcze bardziej efektywność prowadzonego aktualnie leczenia. Badanie genotypu HCV i ocena zaawansowania zmian chorobowych wątroby były głównymi czynnikami różnicującym postępowanie terapeutyczne. Wprowadzenie do terapii leków pangenotypowych spowodowało, że oznaczanie genotypu HCV traci stopniowo na znaczeniu. Uważa się, że leczenie jest skuteczne, jeżeli po 12 tygodniach od jego zakończenia nie stwierdza się we krwi HCV-RNA lub antygen rdzeniowego (HCVcAg) [51]. Na przebieg choroby i skuteczność terapii poza rodzajem leczenia wpływają również czynniki zależne od gospodarza, takie jak genotyp IL28B, pochodzenie etniczne, wiek, otyłość, zaawansowanie włóknienia wątroby, współistniejące zakażenie innymi wirusami, miano wiremii czy niekorzystne nawyki żywieniowe oraz nadużywanie alkoholu i palenie papierosów.

IFNL3 (IFN- λ 3, IL28B) wraz z IFNL1 (IFN- λ 1, IL29) i IFNL2 (IFN- λ 2, IL28A) należą do rodziny cytokin, z których wszystkie są kodowane przez geny skupione na chromosomie 19. IFNL, podobnie jak IFN- α i β regulują transkrypcję genów stymulowanych przez interferon (ISG), które są wymagane do kontroli infekcji wirusowych. Ponadto stwierdzono, że IFNL3 wpływa również na adaptacyjną odpowiedź immunologiczną i zdolność do hamowania replikacji HCV *in vitro*. Seria badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS) wykazała, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) genu IFNL3 (IL28B) jest silnie powiązany z odpowiedzią na terapię interferonową u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, a także z naturalnym klirensom HCV RNA. Wśród badanych SNP-ów polimorfizmy rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu IL28B mają potwierdzoną rolę w przewidywaniu SVR i samodzielnej eliminacji HCV-RNA. Dokładny mechanizm odpowiedzialny za te silne relacje pozostaje jednak niejasny. Uważa się, że korzystny allel polimorfizmu IL28B jest związany ze zmniejszoną, indukowaną przez HCV degradacją

mRNA IL28B i w ten sposób ze zwiększoną samoistną eliminacją HCV. Co więcej wydaje się, że w przypadku obecności korzystnych wariantów IL28B, dwa miRNA indukowane przez HCV (miR-208b i miR-499a-5p) nie mogą wiązać się z mRNA IL28B i hamować jego ekspresji.

Mając powyższe na uwadze w pracy przeanalizowano częstość występowania polimorfizmów rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu IL28B w grupie pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C z rejonu Wielkopolski. Dodatkowo przeanalizowano związek występowania określonego wariantu genu IL28B z obrazem klinicznym zakażenia, genotypem wirusa i jego kinetyką. Dokonano także analizy czynników metabolicznych, konsumpcji alkoholu i palenia tytoniu oraz ich wpływu na przebieg procesu leczenia u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. W tym ostatnim przypadku posłużono się ankietą, która zawierała pytania do samodzielnego wypełnienia o charakterze półotwartym i otwartym. Pytania dotyczyły zagadnień obejmujących występowanie u ankietowanych chorób współistniejących, nawyków związanych z paleniem papierosów czy spożyciem alkoholu oraz informacje o przyjmowanych lekach, jak również pytania dotyczące masy ciała i wzrostu. Odsetek zwrotu ankiet wyniósł 51,58%. Grupę badaną stanowiło 611 osób (332 mężczyzn i 279 kobiet) w wieku 20 – 74 lat, będących pacjentami Poradni Chorób Zakaźnych Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia w Poznaniu w latach 2014 - 2017.

Częstość występowania poszczególnych wariantów polimorfizmu genu IL28B jest zmienna i ściśle związana z etnicznym pochodzeniem pacjentów. Badania prowadzone w krajach azjatyckich wykazują istotnie wyższą częstość występowania genotypu CC polimorfizmu rs12979860. W Chinach wartość ta wyniosła 93,94% [52] w Indiach 59,09%

[53]. Dla porównania analiza częstości występowania polimorfizmów IL28B prowadzona u pacjentów rasy kaukaskiej wykazała, iż dominującym wariantem polimorfizmu rs12979860 jest CT (50%). W grupie tej korzystny wariant homozygotyczny CC tego polimorfizmu stwierdzono u 39% badanych [54]. W badaniach prowadzonych we Włoszech uzyskano bardzo zbliżone wyniki – 52,8% pacjentów to warianty heterozygotyczne CT, natomiast wariant homozygotyczny CC występował u 32,6% osób [55]. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy - przeważającym genotypem polimorfizmu rs12979860 IL28B u pacjentów z obszaru Wielkopolski również był wariant CT (63,9% badanej grupy), natomiast korzystny wariant CC wystąpił u stosunkowo niewielkiej grupy osób – zaledwie u 16% badanych. Analiza drugiego z badanych polimorfizmów – rs8099917 genu IL28B wykazała, iż dominującym w badanej grupie genotypem był wariant GT (50,2%), natomiast korzystny dla tego polimorfizmu wariant homozygotyczny TT wystąpił u 41,9% pacjentów. Porównując te wyniki do badań prowadzonych u pacjentów z różnych regionów świata, zaobserwować można niższą niż oczekiwana częstość występowania korzystnego genotypu. Badania prowadzone na Tajwanie wykazały częstość występowania genotypu TT na poziomie 94,4% [56], natomiast w Urugwaju 57,7% [57]. Badania prowadzone wśród pacjentów rasy kaukaskiej wykazały, iż 55% badanych posiada korzystny wariant TT [54]. Trzeci z analizowanych polimorfizmów – rs1298275 genu IL28B jest jak do tej pory najrzadziej badany. Przeprowadzona metaanaliza, do której włączono szesnaście prac porównujących dziewiętnaście niezależnych badań dotyczących występowania polimorfizmu rs1298275 (SNP A/G) u osób zakażonych HCV, w tym u chorych z pWZW C wykazała, iż pacjenci posiadający wariant homozygotyczny AA tego polimorfizmu osiągają SVR szybciej w stosunku do osób będących nosicielami wariantów AG i GG [58]. Genotyp AA tego polimorfizmu genu IL28B był czynnikiem, który determinuje szybsze uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej zwłaszcza w przypadku pacjentów będących

nosicielami wirusa HCV o genotypie 1 i 4. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wykazały, iż niemal wszyscy badani pacjenci z korzystnym polimorfizmem rs12979860 mają również korzystny wariant polimorfizmu rs8099917 genu IL28B. Zjawisko to było już wcześniej opisywane [59]. Dalsza analiza pozwoliła ustalić, że niemal wszystkie te osoby posiadają również korzystny wariant polimorfizmu rs1298275 genu IL28B. Stąd wysunąć można wniosek, że oznaczanie wszystkich trzech polimorfizmów genu IL28B nie jest konieczne, gdyż współwystępowanie korzystnych wariantów pozwala na ograniczenie badań do jednego polimorfizmu genu IL28B - najczęściej występującego rs8099917.

Obecność co najmniej dwóch polimorfizmów genu IL28B w korzystnych wariantach (CC, TT, AA) stwierdzono zaledwie u blisko 37% pacjentów. Występowanie homozygot w wariantach korzystnych dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu IL28B odnotowano tylko u 16% pacjentów. Stwierdzono, że dystrybucja genotypów dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu IL28B nie była zgodna z rozkładem oczekiwanym zgodnie z prawem Hardy'ego-Weinberga ($p < 0,05$). Dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w analizowanej grupie chorych istotnie częściej obserwowano warianty niekorzystne w odniesieniu do przebiegu choroby i odpowiedzi na zastosowane leczenie. Najczęściej występującym haplotypem genu IL28B był haplotyp CTA - stwierdzono go w ponad 47% przypadków, najrzadziej zaś, bo zaledwie w 1,1% przypadków występował haplotyp CTG. Pozostałe haplotypy występowały odpowiednio z częstością 31,5% - TGG, 15,1% - TTG i 4,4% - TTA. Płeć nie wpływała na istotnie częstsze występowanie określonego wariantu polimorficznego genu IL28B. Takie występowanie określonych wariantów polimorficznych i haplotypów genu IL28B może być wyjaśnione przez fakt, że badana grupa obejmowała tylko osoby, które nie wyeliminowały wirusa spontanicznie i rozwinęły przewlekłe zapalenie wątroby. Zatem wyższa częstość

występowania niekorzystnego polimorfizmu IL28B związana z przetrwaniem zakażenia HCV musiała być obserwowana w badanej grupie chorych. Należy wspomnieć, że badanie zostało przeprowadzone u pacjentów leczonych jeszcze przed rozpoczęciem stosowania bezpośrednich środków przeciwwirusowych (DAA). Odrębnym pytaniem pozostaje jednak czy warianty IL28B, korelujące ze znanym znaczeniem w przewidywaniu terapii opartej o IFN, mogą wpływać także na odpowiedź podczas leczenia DAA.

Parametrem silnie prognozującym ostateczną odpowiedź wirusologiczną, również w przypadku leczenia schematami opartymi o interferon, była kinetyka spadku liczby kopii wirusowego RNA mierzona w 4 i 12 tygodniu kuracji [60]. Niemal wszyscy badani, którzy uzyskali szybką odpowiedź wirusologiczną, posiadający korzystny genotyp IL28B ostatecznie wyeliminowali HCV-RNA w 12 tygodniu leczenia (SVR). Było to podstawą właściwie spersonalizowanej terapii obejmującej połączenie parametrów osobniczych i wirusa i pozwalało określić z bardzo dużym prawdopodobieństwem szansę uzyskania SVR, czy też braku odpowiedzi na leczenie [61]. W niniejszym badaniu zaobserwowano dodatkowo zależność pomiędzy poziomem wirēmii HCV a wystąpieniem określonego polimorfizmu genu IL28B. Korzystnym wariantom rs12979860CC, rs8099917TT i rs12980275AA genu IL28B istotnie częściej towarzyszył wysoki poziom wirēmii HCV w surowicy wynoszący powyżej 400 000 IU/ml.

Genotyp wirusa HCV przez wiele lat odgrywał istotną rolę w odpowiedzi na stosowane leczenie, dobór terapii i sam przebieg choroby. Światowy rozkład genotypów HCV [62] wskazuje na przeważający udział genotypów 1a, 1b, 2a i 3a w Europie Zachodniej i USA. W Afryce północnej przeważa genotyp 4, w Europie Wschodniej dominuje genotyp 1b, w Japonii, Chinach, Tajwanie, Hongkongu i Makao genotypy 2 i 6. W Polsce występuje

głównie zakażenie genotypem 1 (podtyp a i b) oraz genotypem 3 i 4. W zakażeniach genotypem 1 stosowano Harvoni, genotypami 3 (najczęściej 3 a) i 4 wirusa HCV stosowano Sovaldi (Sofosbuvir) w połączeniu z innym lekiem. W leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu C i marskości zastosowano 3D (Viekirax + Exviera), używany głównie w genotypie 1 i 4 wirusa HCV. Od roku 2016 dopuszczono do stosowania leki pangentypowe w tym Epclusa (Sofosbuvir/Velpatasvir), Zepatier (Grazopewir/Elbaswir), Maviret (Glecaprevirum + Pibrentasvirum) czy Daclinzia + Asunaprevir (DCV + ASV), szczególnie istotne u pacjentów zakażonych genotypem 3 wirusa HCV. W badanej grupie chorych najczęściej występującym genotypem był genotyp 1b (u 75% pacjentów). Pozostałe genotypy wirusa wykrywano zdecydowanie rzadziej - genotyp 1a u 7% chorych a genotyp 3a, 2a, 4 i 6 w pojedynczych przypadkach. Występowanie mieszanych genotypów (1a+1b) stwierdzono u 3% badanych. Częstość występowania poszczególnych genotypów HCV w badanej grupie pacjentów jest porównywalna do danych wskazanych przez innych autorów [63].

Badania oceniające przebieg przewlekłych zapaleń wątroby typu C wskazują, iż istnieje szereg czynników „pozagenetycznych”, które mogą mieć bezpośredni wpływ na przebieg choroby oraz powodzenie terapii przeciwwirusowej u chorych na przewlekłe zapalenie wątroby typu C. Wśród najczęściej wskazywanych czynników czołowe miejsce zajmuje nadmierne spożycie alkoholu, którego nadużywanie przez chorych zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C zaostrza postępujące procesy włóknienia i marskości wątroby oraz może również sprzyjać powstawaniu nowotworu wątroby. Zarówno proces metabolizmu etanolu jak i rozwoju wirusa odbywa się w hepatocytach prowadząc do stresu oksydacyjnego, który z kolei sprzyja rozwojowi choroby i podatności gospodarza na zakażenie HCV [64]. Badania innych autorów potwierdziły fakt gorszej odpowiedzi na

prowadzone leczenie w terapiach z wykorzystaniem interferonu u chorych spożywających alkohol [65]. Analiza wypełnionych ankiet pozwoliła ustalić deklaratywną częstość spożycia alkoholu – blisko 3% pacjentów spożywało alkohol kilka razy w tygodniu, ponad 22% chorych raz do kilku razy w miesiącu. Blisko 44% badanych spożywało alkohol rzadziej niż raz w miesiącu, zaś tylko blisko 31% chorych deklaroowało, iż nie spożywa alkoholu wcale. W grupie pacjentów, którzy uzyskali SVR po leczeniu z zastosowaniem terapii interferonowej, blisko 33% chorych deklaroowało, iż nie spożywa alkoholu wcale lub wskazuje na spożycie rzadkie. Aż 67% badanych przyznało się do spożycia alkoholu na poziomie kilku razy w miesiącu. Zbliżone wyniki uzyskano w grupie, w której prowadzone leczenie przeciwwirusowe zakończyło się niepowodzeniem. Obserwowano nieco większą, choć nieistotną statystycznie liczbę osób, które alkohol spożywały częściej niż raz w miesiącu (73% badanych). W grupie chorych, które nie odpowiedziały na leczenie brak spożycia lub spożycie rzadkie deklaroowało zaledwie 27% badanych. Uzyskane wyniki są zbliżone do wyników podobnych badań prowadzonych we Włoszech, gdzie pośród pacjentów z SVR około 30% deklaroowało brak spożycia alkoholu lub spożycie rzadkie (69,9%) [66].

Analizowano także wpływ palenia papierosów na przebieg terapii przeciwwirusowej u pacjentów zakażonych wirusem HCV. Badania innych autorów dowiodły, iż palenie wpływa negatywnie na wyniki terapii, niezależnie od wieku, płci czy nawet ilości spożywanego alkoholu [67]. Efekt ten wynika głównie z wpływu nikotyny na metabolizm lipidów, poziom włóknienia wątroby czy też liczbę płytek krwi. Badania prowadzone przez Zimmermanna i wsp. dowiodły, iż w grupie palaczy chorujących na przewlekłe zapalenie wątroby typu C (genotyp 1 wirusa) leczonych po raz pierwszy, stosowana terapia dwulekowa była nieskuteczna bez względu na pozostałe czynniki takie jak stan wydolności wątroby, ilość

spożywanego alkoholu, czy zażywane leki. Wyniki te potwierdziły się także w niniejszym badaniu. Pośród analizowanych chorych ponad 32% odpowiedziało, że pali okazjonalnie, a blisko 22% było nałogowymi palaczami. Spośród osób deklarujących nałogowe palenie papierosów, zaledwie 2 osoby pozytywnie odpowiedziały na stosowane leczenie, a u pozostałych terapia była nieskuteczna.

Kolejnym czynnikiem, który wpływa na przebieg choroby i wynik leczenia oraz na ogólny stan wątroby jest nadwaga. Pogarsza ona znacznie wydolność wątroby, będąc czynnikiem wpływającym na poziom stłuszczenia i postępu włóknienia tego narządu. Znane są publikacje udowadniające wpływ nadwagi na brak odpowiedzi na leczenie interferonem lub peginterferonem alfa w połączeniu z rybawiryną [29]. W badanej grupie pacjentów średnia wartość BMI wynosiła 25,7, co odpowiada wynikom podobnych badań prowadzonych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C we Włoszech (średnia BMI 24,8), Hiszpanii (średnia BMI 26,2) czy Wielkiej Brytanii (średnia BMI 26,0) [66]. W niniejszych badaniach zwraca jednak uwagę istotnie niższy odsetek pacjentów, którzy uzyskali korzystny efekt stosowanego leczenia. Średnie wartości BMI w odniesieniu do uzyskania SVR po leczeniu przeciwwirusowym dla badanych pacjentów z Wielkopolski w porównaniu do wyników badań prowadzonych na świecie przedstawia tabela 12. W pracy na podstawie obliczonego wskaźnika BMI ustalono, iż blisko 60% chorych posiadało nadwagę – BMI ≥ 25 . Zaledwie 40% badanych posiadało BMI w przedziale 18,5 – 24,99. Jedynie jedna osoba charakteryzowała się niedowagą – BMI < 18,5. W analizowanej grupie pacjentów ponad 26% osób chorowało na nadciśnienie, ponad 12% pacjentów na cukrzycę, a ponad 11% chorych deklarowało podwyższony poziom cholesterolu.

Stwierdzono także, że chorzy bez otyłości (BMI \leq 25) mają istotnie większą szansę (około 3,5-krotną) na prawidłowy poziom ALT w porównaniu do chorych z otyłością (BMI $>$ 25).

Tabela 12

Wartość BMI a wystąpienie SVR u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C [Charlton i wsp., 2006].

Kraj	Autorzy	Liczba pacjentów	Średnia wartość BMI	Genotyp HCV (%)			SVR (%)
				1	2	3	
Chiny	Jian i wsp.	98	24	39	45	13	58
Włochy	Camma i wsp.	291	24,8	100	-	-	36
Hiszpania	Romero-Gomez i wsp.	159	26,2	71	23		52
Anglia	D'Souza i wsp.	59	26	63	-	37	56
USA	Sanyal i wsp.	110	30	91	3	3	brak danych
Polska	Wysocka-Leszczynska	114	25,8	100	-	-	15

Ocena wyjściowego poziomu wirerii dokonana względem dwóch wartości 400 000 IU/ml i 600 000 IU/ml wykazała dla obu badanych zakresów istotną zależność pomiędzy poziomem wirerii a obecnością określonego polimorfizmu genu IL28B. Allel rs12979860C i rs12980275A występował istotnie rzadziej u chorych z poziomem wirerii w surowicy \leq 400 000 IU/ml. Genotypom genu IL28B rs12979860CC, rs8099917TT i rs12980275AA istotnie częściej towarzyszył wysoki poziom wirerii HCV w surowicy $>$ 400 000 IU/ml.

Analiza wybranych parametrów klinicznych pacjentów poddanych terapii przeciwwirusowej, genotypu HCV oraz genotypu genu IL28B względem uzyskanej odpowiedzi na leczenie wskazała jedynie na istotny związek między odpowiedzią na leczenie a występowaniem określonych polimorfizmów genu IL28B rs12979860, rs8099917 i rs12980275. Wykazano, że u chorych z genotypem rs12979860CC szansa na uzyskanie odpowiedzi na leczenie była około 13 razy wyższa niż u nosicieli allelu T. Z kolei u chorych z genotypem rs8099917TT szansa na uzyskanie SVR była około 4 razy wyższa niż u nosicieli allelu G, a u chorych z genotypem rs12980275AA około 6 razy w stosunku do nosicieli allelu G.

W niniejszym badaniu nie wykazano związku pomiędzy odpowiedzią na leczenie a płcią, wiekiem czy współwystępowaniem cukrzycy lub nadciśnienia. Dodatkowo nie zaobserwowano związku pomiędzy nałogowym paleniem papierosów oraz spożywaniem alkoholu na przebieg choroby i skuteczność terapii. Przedstawione wyniki mają swoje ograniczenia. Głównym z nich jest retrospektywny charakter prowadzonych badań – analiza objęła pacjentów w większości leczonych terapią dwulekową z interferonem i rybawiryną. Niemniej jednak, co należy podkreślić, udało się przeanalizować pełne dane kliniczne pacjentów, przebieg zakażenia HCV i stosowane leczenie. W przyszłości ciekawym będzie porównanie wpływu czynników zależnych od wirusa, jak genotyp i lekooporność wywołana pojawiającymi się mutacjami warunkujących oporność na DAA oraz czynników tzw. „pozagenetycznych” u pacjentów aktualnie leczonych nowymi terapiami p/wirusowymi.

6. Wnioski

1. Dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w analizowanej grupie chorych istotnie częściej obserwowano warianty niekorzystne w odniesieniu do przebiegu choroby i odpowiedzi na zastosowane leczenie.
2. Występowanie homozygot w wariantach korzystnych dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B obserwowano zaledwie u 16% pacjentów.
3. Nie wykazano istotnie częstszego występowania określonego wariantu polimorficznego genu interleukiny 28B w grupie kobiet w porównaniu z grupą mężczyzn.
4. Spośród badanych polimorfizmów genu IL28B najczęściej występował wariant CT polimorfizmu rs12979860 (64% badanych), wariant GT polimorfizmu rs8099917 (50% badanych) oraz wariant AG polimorfizmu rs12980275 (61% badanych).
5. Warianty polimorficzne genu IL28B korzystne dla przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie w badanej grupie chorych obserwowano istotnie rzadziej - wariant CC polimorfizmu rs12979860 (16% badanych) i wariant TT polimorfizmu rs8099917 (42% badanych) oraz wariant AA polimorfizmu rs12980275 (21% badanych).
6. Częstość występowania wariantów dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B nie była zgodna z rozkładem oczekiwanym zgodnie z prawem Hardy'ego-Weinberga - niemal wszyscy badani z korzystnym wariantem polimorfizmu rs12979860 posiadali również korzystny wariant polimorfizmu rs8099917 genu IL28B.

7. Ocena poziomu wirerii przed rozpoczęciem terapii może stanowić wartość predykcyjną dla przebiegu zakażenia - korzystnym wariantom rs12979860CC, rs8099917TT i rs12980275AA genu IL28B istotnie częściej towarzyszył wysoki poziom wirerii HCV w surowicy wynoszący powyżej 400 000 IU/ml.
8. Analiza genotypu HCV pokazała, że najczęściej występującym był genotyp 1b.
9. Nie wykazano związku pomiędzy przebiegiem choroby i odpowiedzią na leczenie a płcią, wiekiem, współwystępowaniem chorób przewlekłych - cukrzycy lub nadciśnienia, otyłości czy nałogowym paleniem papierosów oraz spożywaniem alkoholu.

7. Piśmiennictwo

1. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, 2018;
http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2018/index_mp.html - data wejścia 16.05.2019.
2. WHO Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021;
<http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/> - data wejścia 28.05.2019.
3. Juszczak J. Hepatitis C: patogeneza i terapia. Termedia, 2016;10-11,63-64.
4. Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, i wsp.: Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. 1995; J Gen Virol 76:1749-1761.
5. Kowala-Piaskowska A.: Wirus zapalenia wątroby typu C — budowa i replikacja a możliwości terapeutyczne i zjawisko oporności. Postępy Biochemii 2006; 52:399-407.
6. Penin F, Brass V, Appel N i wsp.: Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. J Biol Chem 2004; 279:40835-40843.
7. Lindenbach BD, Rice CM.: Flaviviridae: the viruses and their replication W: Knipe DM, Howley PM (red) Fields Virology. 2001;991–1041.
8. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E i wsp.: Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a Fully encircled active site. Nat Struct Biol 1999;6:937-943.
9. Martell M, Esteban JI, Quer J, i wsp.: Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. J ViroI 1992;66:3225-3229.
10. Rispeter K, Lu M, Behrens SE, i wsp.: Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. Virus Genes 2000;21:179-188.
11. Thrift A, El-Serag H, Kanwal F.: Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. Nat Rev 2017;14:122–132.
12. Flisiak R, Halota W, Tomasiewicz K, i wsp.: Forecasting the disease burden of chronic hepatitis C virus in Poland. Eur J Gastroenterol Hepatol 2015;27:70-6.

13. Zakrzewska K, Stępień M, Szmulik K, i wsp.: Wirusowe zapalenie wątroby typu C w Polsce w 2016 roku. *Przeegl Epidemiol* 2018;72:157-167.
14. Baron S, Dianzani F.: The interferons: a biological system with therapeutic potential in viral infections. *Antiviral Res* 1994;24 97-110.
15. Kotenko S, Gallagher G, Baurin VV i wsp.: IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. 2003;4:69-77.
16. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG.: IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol* 2011;106:38-45.
17. Dongliang Ge, Jacques Fellay, Alexander J Thompson i wsp.: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 399-401.
18. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS i wsp.: Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010;139: 120-129.
19. Aparicio E, Parera M, Franco S i wsp.: IL28B SNP rs8099917 is strongly associated with pegylated interferon- α and ribavirin therapy treatment failure in HCV/HIV-1 coinfecting patients. *PLoS One*. 2010;29:e13771.
20. Fried M.W., D.R. Nelson i wsp.: Improved outcomes in patients with hepatitis C with difficult-to-treat characteristics: randomized study of higher doses of peginterferon alpha-2a and ribavirin. *Hepatology*, 2008,48,1033–1043.
21. Maekawa S., Enomoto N.: Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol.*, 2009;44:1009-1015.
22. Halfon P., Locarnini S.: Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J. Hepatol.*, 2011;55:192-206.
23. Badri P, Dutta S, Coakley E.: Pharmacokinetics and dose recommendations for cyclosporine and tacrolimus when coadministered with ABT-450, ombitasvir, and dasabuvir. *Am J Transplant* 2015;15:1313-22.
24. Thomas D.L.: Predicting the response to the treatment of hepatitis C virus infection. *Clin. Liv. Dis.*, 2012;1:46-48.

25. Chmielewska A, Rychłowska M, Król E, i wsp.: Wirusowe zapalenie wątroby typu C – nowe metody leczenia i zapobiegania. *Postępy Hig Med Dośw*, 2015; 69:946-963.
26. Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ.: Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat*. 2006;13:34-41.
27. Thomas DL, Seeff LB.: Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005;9:383 – 398.
28. Osna AN, Ganesan M, Kharbanda KK.: Hepatitis C, Innate Immunity and Alcohol: Friends or Foes? *Biomolecules* 2015;5:76-94.
29. Charlton MR, Pockros PJ, Harrison SA.: Impact of obesity on treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006;43:1177-86.
30. Zimmermann T, Hueppe D, Mauss S, i wsp.: Effects of smoking on Pegylated Interferon Alpha 2a and First-Generation Protease Inhibitor-based Antiviral Therapy In Naïve Patients Infected with Hepatitis C Virus Genotype 1. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2016;25:15-24.
31. Wosek P, Gozdowska J, Durlik M.: Analiza zmian w schematach leczenia przewlekłego zapalenia wątroby na tle zakażenia HCV na przestrzeni lat. *Forum Nefrol* 2016;9:178–188.
32. Weiland O.: Interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol Rev* 1994;14:279-288.
33. Janczewska E.: Postępy w leczeniu zakażenia HCV. *Postępy Nauk Medycznych* 2017;5:264-268.
34. Schiffman M, Salvatore J, Hubbard S i wsp.: Treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 with peginterferon, ribavirin, and epoetin alpha. *Hepatology* 2007;46:371-379.
35. Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ i wsp.: Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;33:433-438.
36. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, i wsp.; PEGASYS International Study Group: Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355.

37. Burney T, Dusheiko G.: Overview of the PROVE studies evaluating the use of telaprevir in chronic hepatitis C genotype 1 patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:151-160.
38. Jacobson I, McHutchison J, Dusheiko D i wsp.: Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* 2011;364:2405-2416.
39. Wawrzynowicz – Syczewska M.: Doustne bezpośrednio działające leki przeciwwirusowe w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C. *Gastroenterologia Kliniczna* 2015;7:117-123.
40. Halota W, Flisiak R, Juszczak J i wsp.: Rekomendacje Polskiej Grupy Ekspertów HCV dotyczące leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C w roku 2019. *Zakażenia XXI wieku*. 2019;2:61–69.
41. Gheorghe L.: Alpha fetoprotein – a useful for follow-up of interferon-free treated cirrhotic patients with de novo hepatocellular carcinoma after SVR. *EASL HCC Summit, Geneva, 2-5 February 2017*.
42. Castano A.: Alpha fetoprotein (AFP) levels before and after sustained virological response with direct-acting antivirals (DAAs) in patients with liver cirrhosis due to hepatitis C virus (HCV). *EASL HCC Summit, Geneva, 2-5 February 2017*.
43. Parczewski M.: Oporność na bezpośrednio działające leki anty-HCV - podsumowanie bieżącego stanu wiedzy. *Forum zakażeń* 2017;8:291-298.
44. Ji Won Han, Pil Soo Sung, Kyung Hwan Kim i wsp.: Dynamic Changes in Ex Vivo T-Cell Function After Viral Clearance in Chronic HCV Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2019;220:1290–1301.
45. Smits M, Zoldan K, Ishaque N i wsp.: Follicular T helper cells shape the HCV-specific CD4⁺ T cell repertoire after virus elimination. *The Journal of Clinical Investigation*. 2020;130:998-1009.
46. Eui-Cheol Shin, Pil Soo Sung, Su-Hyung Park.: Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nature Reviews Immunology* 2016;16:509–523.
47. Ji Won Han, Pil Soo Sung, Seon-Hui Hong i wsp.: *IFNL3*-adjuvanted HCV DNA vaccine reduces regulatory T-cell frequency and increases virus-specific T-cell responses. *Journal of hepatology*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.02>. - data wejścia 13.03.2020
48. Małkowski P., czerwiec 2018. 80% osób nie wie o zakażeniu HCV. <https://newsrm.tv/80-osob-nie-wie-o-zakazeniu-hcv/> - data wejścia 17.04.2019

49. Pyziak – Kowalska M.: Badanie częstości występowania HCV wśród pacjentów zgłaszających się do Izby Przyjęć i Poradni Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Warszawie. *Forum Zakażeń* 2017;8:175-179.
50. Wedemeyer H, Dore GJ, Ward JW.: Estimates on HCV disease burden worldwide – filling the gaps. *J Viral Hepatitis* 2015;22(Suppl 1):1-5.
51. Halota W, Flisiak R, Juszczak J, i wsp.: Rekomendacje Polskiej Grupy Ekspertów HCV dotyczące leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C w roku 2018. *Hepatologia* 2018;18:1–9.
52. Qiao K, Trieu C, Huo Z, Du Y, Hou W.: Distribution of IL28B rs12979860 and rs8099917 Genotypes in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection in Tianjin, China. *Clinical Laboratory* 2018;64:543-550.
53. Siddapuram Sivaprasad, Padaki Nagaraja Rao, Rajesh Gupta, i wsp.: The Distribution of Genotype and Allelic Frequency of IL28B Gene Polymorphism in Andhra Pradesh, India. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2012;2: 112-115.
54. L. Sticchi, A. Di Biago, E. Rappazzo i wsp.: Rs12979860 and rs8099917 single nucleotide polymorphisms of interleukin-28B gene: simultaneous genotyping in Caucasian patients infected with hepatitis C virus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 2013;54:83–86.
55. Falleti E, Bitetto D, Fabris C.: Role of interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype. *J Clin Immunol*. 2011;31:891-899.
56. Chun-HanCheng, Ching-ChungLin, Huan-LinChen.: High frequencies of a favorable IL-28B rs8099917 polymorphism and the clinical implications in patients with HCV in one multiracial area of Taiwan. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 2017;33:510-515.
57. Echeverría N, Chiodi D, López P, i wsp.: IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients. *Virology Journal*. 2018;15:40.
58. HaoZheng, ManLi, BingChi i wsp.: IL28B rs12980275 variant as a predictor of sustained virologic response to pegylated-interferon and ribavirin in chronic hepatitis C patients: A systematic review and meta-analysis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*; 2015;39,576-583.
59. Wysocka-Leszczyńska J, Kałużna E, Świątek B i wsp.: Distribution of polymorphisms rs12979860, rs8099917 and rs12980275 IL28B in patients with

chronic hepatitis C. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2017;26:1257-1261.

60. Jacobson I.M., Marcellin P., Zeuzem i wsp.: Refinement of stopping rules during treatment of hepatitis C genotype 1 infection with boceprevir and peginterferon/ribavirin. *Hepatology*,2012;56:567-575.
61. Pawlotsky J.M.: Treatment of hepatitis C: how will we use viral kinetics, response-guided therapy? *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 2013;15:309.
62. Simmonds P.: Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. *J Gen Virol* 2004, 85:3173–3188.
63. Tomaszewicz K.: Epidemiologia zakażeń HCV w Polsce. Doniesienie prasowe, <http://www.korektorzdrowia.pl/wp-content/uploads/2.-krzysztof-tomaszewicz.pdf> - data wejścia 19.03.2020.
64. Osna A. N, Ganesan M, Kharbanda K. K.: Hepatitis C, Innate Immunity and Alcohol: Friends Or Foes? *Biomolecules* 2015;5,76-94.
65. Plumlee C R, Lazaro C A, Fausto N, i wsp.: Effect of etanol on innate antiviral pathways and HCV replication in human liver cells. *Virology Journal*, 2005;2;89. doi:10.1186/1743-422X-2-89.
66. Zani C, Donato F, Chiesa M, i wsp.: Alcohol and coffee drinking and smoking habit among subjects with HCV infection. *Dig Liver Dis*.2009;41:599-604.
67. Zimmermann T., Hueppe D, Mauss S, i wsp.: Effects of smoking on Pegylated Interferon Ralpha 2a and First-Generation Protease Inhibitor-based Antiviral Therapy In Naive Patients Infected with Hepatitis C Virus Genotype 1. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2016;25:15-24.

8. Streszczenie

Rodzaj leczenia i jego skuteczność warunkowane określonym „genotypem” chorego to aktualny trend współczesnej medycyny. Zainteresowanie tym zagadnieniem dotyczy także osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C. Prowadzono badania w kierunku znalezienia czynników predykcyjnych jeszcze przed rozpoczęciem leczenia, które wskażą najwyższą możliwość eliminacji HCV. Jednym z najważniejszych odkryć była identyfikacja polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu kodującego interferon lambda 3 (*INFL3*) - interleukinę 28B (IL-28B). Badania wskazały, iż określony genotyp genu kodującego interleukinę 28B wpływa bezpośrednio na przebieg choroby i odpowiedź na leczenie u osób zakażonych wirusem HCV. Polimorfizmy IL28B to najsilniejszy, lecz nie jedyny czynnik pozwalający prognozować przebieg zakażenia i skuteczność prowadzonego leczenia. Do grupy pozostałych czynników zalicza się płeć i wiek pacjenta, współwystępowanie innych chorób, stan funkcji wątroby, nadużywanie alkoholu i nałogowe palenie tytoniu.

Stąd w pracy postawiono za cel określenie występowania wariantów trzech polimorfizmów rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu IL28B w grupie pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. Przeanalizowano związek występowania określonego wariantu polimorfizmu genu IL28B z obrazem klinicznym zakażenia, genotypem wirusa i jego kinetyką. Analizie poddano także występowanie określonych czynników metabolicznych, współistnienia chorób przewlekłych, konsumpcji alkoholu i palenia tytoniu i ich wpływu na przebieg procesu leczenia u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C.

Grupę badaną stanowiło 611 osób (332 mężczyzn i 279 kobiet) w wieku 20 – 74 lat, będących pacjentami Poradni Chorób Zakaźnych Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia w Poznaniu w latach 2014 - 2017. Kryterium doboru do grupy

badanej stanowiło potwierdzenie obecności HCV-RNA - materiału genetycznego wirusa C zapalenia wątroby w surowicy krwi pacjentów. Analizowane dane obejmowały: płeć, wiek badanych, rodzaj stosowanego leczenia, odpowiedź na leczenie, poziom aminotransferazy alaninowej - ALT, genotyp wirusa i wielkość wiremii HCV oraz rodzaj polimorfizmów genu interleukiny 28B. Za kryterium odpowiedzi na zastosowane leczenie przyjęto uzyskanie przez pacjentów trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR), co było równoznaczne z brakiem obecności HCV RNA po 24 tygodniach terapii. Dodatkowo przeprowadzono badanie ankietowe u 222 osób grupy badanej, dla których uzyskano pełne dane kliniczne - co stanowiło 36,3%. Ankieta zawierała pytania dotyczące zagadnień obejmujących występowanie u ankietowanych chorób współistniejących, nawyków związanych z paleniem papierosów czy spożyciem alkoholu oraz informacje o przyjmowanych lekach, jak również pytania dotyczące masy ciała i wzrostu. Odsetek zwrotu ankiet wyniósł 51,58% (114 ankiet).

Rozkład płci w całej badanej grupie był zbliżony, a stosunek kobiet do mężczyzn wynosił 1:1,19. Mediana wieku chorych całej grupy wyniosła 42 lata, w tym 37 lat dla kobiet i 44 lata dla mężczyzn. Porównanie częstości zachorowań w poszczególnych przedziałach wiekowych pomiędzy kobietami i mężczyznami wykazało, że najczęściej chorowali mężczyźni młodsi (≤ 39 lat), choć różnica ta nie była istotna.

W całej grupie badanych przeanalizowano występowanie trzech polimorfizmów genu interleukiny 28B - rs12979860, rs8099917 i rs12980275. Przeważającym genotypem polimorfizmu rs12979860 IL28B u badanych osób był wariant CT (64% badanych). Analiza drugiego z badanych polimorfizmów – rs8099917 genu IL28B wykazała, iż dominującym w badanej grupie genotypem był wariant GT (50% badanych). W przypadku trzeciego z badanych polimorfizmów rs12980275, najczęściej występował wariant AG (61% badanych). Warianty polimorficzne genu IL28B korzystne dla przebiegu choroby i

odpowiedzi na leczenie w badanej grupie chorych obserwowano istotnie rzadziej - wariant CC polimorfizmu rs12979860 (16% badanych), wariant TT polimorfizmu rs8099917 (42% badanych) oraz wariant AA polimorfizmu rs12980275 (21% badanych).

Obecność co najmniej dwóch polimorfizmów genu interleukiny 28B w korzystnych wariantach (CC, TT, AA) stwierdzono u 37% pacjentów, w tym u 99 kobiet i 125 mężczyzn. Występowanie homozygot w wariantach korzystnych dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B odnotowano u 16% pacjentów, w tym u 47 kobiet i 49 mężczyzn. Stwierdzono, że dystrybucja genotypów dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B nie była zgodna z rozkładem oczekiwanym zgodnie z prawem Hardy'ego-Weinberga ($p < 0,05$). Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wykazały, iż niemal wszyscy badani pacjenci z korzystnym polimorfizmem rs12979860 mają również korzystny wariant polimorfizmu rs8099917 genu IL28B. Dla wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w analizowanej grupie chorych istotnie częściej obserwowano warianty niekorzystne w odniesieniu do przebiegu choroby i odpowiedzi na zastosowane leczenie. Nie wykazano istotnie częstszego występowania określonego wariantu polimorficznego genu interleukiny 28B w grupie kobiet w porównaniu z grupą mężczyzn. Porównując częstość występowania poszczególnych alleli dla wszystkich trzech polimorfizmów genu interleukiny 28B wykazano, że najczęściej występował allel T rs809917, najrzadziej natomiast allel G rs809917. Najczęściej występującym haplotypem genu interleukiny 28B był haplotyp CTA - stwierdzono go w 47% przypadków, najrzadziej zaś, bo zaledwie w 1% przypadków występował haplotyp CTG.

Grupę 220 pacjentów poddanych badaniu ankietowemu i leczonych przeciwwirusowo stanowiło 89 kobiet i 133 mężczyzn w wieku od 20 do 74 lat, z medianą wieku wynoszącą odpowiednio 41 lat dla kobiet i 44 lata dla mężczyzn. Średni poziom wirerii przed rozpoczęciem leczenia mieścił się w granicach $2,13 \times 10^3$ – $12,36 \times 10^6$ IU/ml

dla kobiet i $4,22 \times 10^3$ – $9,64 \times 10^6$ IU/ml dla mężczyzn. Analiza genotypu HCV w grupie 222 chorych pokazała, że najczęściej występującym genotypem był genotyp 1b (u 75% chorych). Pozostałe genotypy wirusa wykrywano zdecydowanie rzadziej: genotyp 1a u 7%, genotyp 3a u 1% osób oraz sporadycznie genotyp 2a, 4 i 6. Występowanie mieszanych genotypów 1a+1b stwierdzono u 3% osób. Spośród wszystkich 222 ankietowanych osób, 27% uzyskało odpowiedź na zakończenie terapii (48 tydzień, EOT- ang. *End of Treatment Response*). Spośród nich tylko 10% pacjentów uzyskało trwałą odpowiedź wirusologiczną (SVR- ang. *Sustained Viral Response*). Pozostałe 90% osób ankietowanych to pacjenci, którzy nie uzyskali trwałej eliminacji HCV RNA. W grupie chorych ankietowanych na podstawie obliczonego wskaźnika BMI ustalono, iż 60% osób posiadało nadwagę – BMI ≥ 25 , 40% pacjentów posiadało BMI w przedziale 18,5 – 24,99, a jedna osoba charakteryzowała się niedowagą – BMI $\leq 18,5$. W analizowanej grupie 26% osób chorowało na nadciśnienie, 12% pacjentów na cukrzycę, a 11% chorych deklarowało podwyższony poziom cholesterolu. Z całej grupy ankietowanych 32% odpowiedziało, że pali okazjonalnie, a 22% osób było nałogowymi palaczami. Blisko 3% spożywało alkohol kilka razy w tygodniu, po 11% pacjentów raz lub kilka razy w miesiącu, 44% osób rzadziej niż raz w miesiącu, zaś 31% chorych deklarowało, iż nie spożywa alkoholu wcale. W grupie chorych ankietowych zaobserwowano dodatkowo zależność pomiędzy poziomem wirerii HCV a wystąpieniem określonego polimorfizmu genu IL28B. Allel rs12979860C i rs12980275A występował istotnie rzadziej u chorych z poziomem wirerii w surowicy $\leq 400\,000$ IU/ml. Korzystnym wariantom rs12979860CC, rs8099917TT i rs12980275AA genu IL28B istotnie częściej towarzyszył wysoki poziom wirerii HCV w surowicy wynoszący powyżej 400 000 IU/ml. Analiza wybranych parametrów klinicznych pacjentów ankietowych poddanych terapii przeciwwirusowej, genotypu HCV oraz genotypu genu IL28B względem uzyskanej odpowiedzi na leczenie wskazała jedynie na istotny związek między odpowiedzią na

leczenie, a występowaniem określonych polimorfizmów genu IL28B rs12979860, rs8099917 i rs12980275. Wykazano, że u chorych z genotypem rs12979860CC szansa na uzyskanie odpowiedzi na leczenie była około 13 razy wyższa niż u nosicieli allelu T. Z kolei u chorych z genotypem rs8099917TT szansa na uzyskanie SVR była około 4 razy wyższa niż u nosicieli allelu G, a u chorych z genotypem rs12980275AA około 6 razy w stosunku do nosicieli allelu G. W niniejszym badaniu nie wykazano związku pomiędzy odpowiedzią na leczenie a płcią, wiekiem czy współwystępowaniem chorób przewlekłych cukrzycy lub nadciśnienia i otyłości. Dodatkowo nie zaobserwowano związku pomiędzy nałogowym paleniem papierosów oraz spożywaniem alkoholu na przebieg choroby i skuteczność terapii.

9. Abstract

Treatment type and its efficiency determined by the specific patient ‘genotype’ is a current trend of the modern medical science. The interest in this issue also concerns persons with hepatitis type C virus. Tests have been conducted aiming at finding the predictors before commencing the treatment, which would indicate the greatest possibility of eliminating HCV. One of the most important discoveries was identifying polymorphisms of a single nucleotide of the gene encoding interferon lambda 3 (*INFL3*)-interleukin 28B (IL-28B). Research demonstrated that the given genotype of the interleukin 28B encoding gene has a direct impact on the course of the disease and response in persons with HCV. IL28B polymorphisms constitute the strongest, yet not the only factor enabling the prognosis of the course of infection and efficacy of the conducted therapy. The group of other factors include sex and age of the patient, coincidence of other diseases, liver function status, alcohol overuse and heavy tobacco smoking.

The purpose of the study was to determine the occurrence of variants of three rs12979860, rs8099917 and rs12980275 polymorphisms of the IL28B gene in the group of patients with chronic type C hepatitis. The relationship between the occurrence of the given IL28B gene polymorphism variant with the clinical picture of the infection, virus genotype and its kinetics. The analysis included occurrence of selected metabolic factors, coincidence of chronic diseases, alcohol consumption and tobacco smoking and their impact on the course of the treatment process in patients with chronic type C hepatitis.

The study group comprised of 611 persons (332 men and 279 women) aged 20–74, patients of the J. Struś Clinic of Infectious Diseases of the Multidisciplinary City Hospital in Poznań in the period 2014–2017. The selection criterion for the study group consisted in confirming the presence of HCV-RNA, genetic material for the hepatitis C virus, in the blood

serum of the patients. The analyzed data included: sex, age of the patients, type of treatment used, response to treatment, level of alanine aminotransferase-ALT, viral genotype and the HCV viremia level and type of the interleukin 28B gene polymorphisms. The criterion of response to the administered therapy was assumed as patients obtaining sustained viral response (SVR), which was equivalent to the absence of HCV RNA after 24 weeks of therapy. In addition, an interview survey was conducted among 222 persons of the study group, for whom complete clinical data were obtained-which constituted 36.3%. The survey contained questions concerning issues on the occurrence of coincident diseases, habits associated with cigarette smoking or alcohol consumption as well as information on the drugs taken, as well as information on body weight and height. Return percentage for the questionnaires was 51.58% (114 questionnaires).

The sex distribution in the whole study group was similar, and the women to men ratio was 1:1.19. The age median for the whole group was 42, including 37 years for women and 44 years for men. Comparison of the incidence in individual age groups between women and men demonstrated that the highest incidence was found for younger men (≤ 39 years), yet the difference was insignificant.

The presence of three interleukin 28B gene polymorphisms-rs12979860, rs8099917 and rs12980275 were analyzed in the entire subject group. The predominant genotype of polymorphism rs12979860 IL28B in the examined people was the CT variant (64% of the examined). Analysis of the second of the investigated polymorphisms-rs8099917 IL28B revealed that the GT genotype was predominant in the examined group (50% of the examined). In the case of the third of the tested polymorphisms-rs12980275, the AG variant was most common (61% of the examined individuals). The polymorphic variants of the IL28B gene favorable for the course of the disease and response to treatment in the examined group of patients were observed significantly less frequently-CC variant of the rs12979860

polymorphism (16% of the examined), TT variant of the rs8099917 polymorphism (42% of the examined) and AA of the rs12980275 polymorphism (21% of the examined individuals).

Presence of at least two polymorphisms of the interleukin 28B gene in favorable variants (CC, TT, AA) were found in 37% patients, including 99 women and 125 men. The presence of homozygotes in the favorable variants for all three tested interleukin 28B gene polymorphisms were recorded for 16% of patients, including 47 women and 49 men. It was determined that distribution for all three investigated interleukin 28B gene polymorphisms was not compliant with the distribution expected in line with the Hardy-Weinberg principle ($p < 0.05$). Results obtained in the present study demonstrated that almost all patients with favorable rs12979860 polymorphism also possess positive variant of the rs8099917 IL28B polymorphism. For all three interleukin 28B gene polymorphisms in the analyzed group of patients, unfavorable variants with regards to the course of the disease and response to the administered treatment were observed significantly more frequently. No significantly more frequent occurrence of the polymorphic interleukin 28B gene could be discerned for the female group as compared with the male group. A comparison of the incidence rate of individual alleles for all three interleukin 28B gene polymorphisms demonstrated that the T allele rs809917 was most common, whereas G allele rs809917 was the least common. The most common interleukin 28B gene haplotype was CTA-it was found in 47% of cases, whereas the least common haplotype, found in only 1% of cases was CTG.

The group of 220 patients subject to the interview survey and treated against virus comprised of 89 women and 133 men aged 20 to 74, with age median of 41 years for women and 44 years for men, respectively. The mean viremia level prior to the treatment ranged between 2.13×10^3 – 12.36×10^6 IU/ml for women and 4.22×10^3 – 9.64×10^6 IU/ml for men. The HCV genotype analysis within the group of 222 patients demonstrated that 1b was the most common genotype (found in 75% patients). The remaining viral genotypes were detected

considerably less frequently: 1a genotype in 7%, 3a in 1% of the patients and genotypes 2a, 4 and 6-sporadically. Occurrence of mixed genotypes 1a+1b was determined in 3% of patients. Among all the 222 surveyed individuals, 27% obtained End of Treatment Response (48 week, EOT). Of them, only 10% patients obtained Sustained Viral Response (SVR). The remaining 90% surveyed patients are those who did not obtain sustained HCV RNA elimination. It was established based on the calculated BMI that 60% of the surveyed patients had overweight—BMI ≥ 25 , 40% had BMI in the range 18.5–24.99, and one person was characterized by underweight—BMI ≤ 18.5 . In the analyzed group, 26% patients had hypertension, 12% diabetes, and 11% declared elevated cholesterol levels. Of the whole surveyed group 32% patients stated occasional smoking, while 22% were heavy smokers. Close to 3% consumed alcohol several times a week 11% once or several times per month, 44% less than once a month, and 31% of the patients stated no alcohol consumption at all. In addition, in the group of surveyed patients, a relationship between HCV viremia and the occurrence of the given IL28B gene polymorphism was observed. The rs12979860C and rs12980275A alleles were significantly less common in patients with the $\leq 400,000$ IU/ml serum viremia level. Favorable rs12979860CC, rs8099917TT and rs12980275AA variants of the IL28B gene were significantly more commonly accompanied by a high level of HCV viremia in the serum, at above 400,000 IU/ml. Analysis of the selected clinical parameters in the surveyed patients subject to antiviral therapy, HCV genotype and IL28B genotype with regards to the obtained response to treatment only demonstrated a significant relationship between treatment response and occurrence of specific IL28B gene polymorphisms rs12979860, rs8099917 and rs12980275. We demonstrated that in patients with the rs12979860CC genotype the likelihood for obtaining treatment response was approximately 13 times higher than for T allele carriers. In turn, in patients with rs8099917TT genotype, the likelihood for SVR was about 4 times higher than for G allele

carriers, whereas in patients with rs12980275AA genotype it was approximately 6-fold higher than for G allele carriers. The present study did not reveal a relationship between treatment response and sex, age or coincidence of chronic diseases, diabetes, hypertension or obesity. Furthermore, no relationship was observed between heavy cigarette smoking and alcohol consumption on the course of the disease and efficiency of therapy.

10. Spis rycin

- I. Rycina 1. Organizacja genomu HCV i białka kodowane przez genom wirusa
- II. Rycina 2. Częstość występowania poszczególnych genotypów HCV w zależności od regionu świata
- III. Rycina 3. Lokalizacja genów kodujących IL28A, IL28B i IL29 na chromosomie 19
- IV. Rycina 4. Badanie ankietowe pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C
- V. Rycina 5. Rozkład płci w badanej grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C
- VI. Rycina 6. Rozkład wieku w badanej grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C w zależności od płci
- VII. Rycina 7. Udział procentowy występowania poszczególnych wariantów badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wirusowym typu C
- VIII. Rycina 8. Rozkład polimorfizmów genu interleukiny 28B w zależności od płci pacjentów w grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C
- IX. Rycina 9. Częstość występowania alleli badanych polimorfizmów genu interleukiny 28B w grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem typu C. Gwiazdkami zaznaczono korzystne, pod względem przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie, warianty polimorficzne genu interleukiny 28B

- X. Rycina 10. Rozkład procentowy analizowanych haplotypów genu interleukiny 28B w badanej grupie chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C
- XI. Rycina 11. Występowanie poszczególnych genotypów wirusa HCV w grupie 222 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C poddanych badaniu ankietowemu
- XII. Rycina 12. Wyniki leczenia w grupie 222 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby poddanych badaniu ankietowemu

11. Spis tabel

- I. Tabela 1. Rodzaje odpowiedzi na leczenie skierowane przeciwko wirusowi HCV
- II. Tabela 2. Sekwencje starterów dla wybranych polimorfizmów genu interleukiny 28 B oraz wielkość uzyskanych produktów amplifikacji
- III. Tabela 3. Warunki reakcji PCR zastosowane przy amplifikacji wybranych fragmentów polimorficznych genu interleukiny 28 B
- IV. Tabela 4. Występowanie polimorfizmów rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B w badanej grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wirusowym typu C
- V. Tabela 5. Dane 222 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C poddanych badaniu ankietowemu
- VI. Tabela 6. Szczegółowa charakterystyka danych 114 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby, którzy zwrócili ankietę
- VII. Tabela 7. Wiremia i genotyp HCV, genotyp IL28B oraz odpowiedź na stosowane leczenie w grupie 114 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby, którzy zwrócili ankietę
- VIII. Tabela 8. Analiza wybranych parametrów klinicznych w odniesieniu do wyjściowej wielkości wiremii HCV w surowicy pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, którzy zwrócili ankietę
- IX. Tabela 9. Analiza wybranych parametrów klinicznych w odniesieniu do wyjściowej wielkości wiremii HCV w surowicy pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, którzy zwrócili ankietę

- X. Tabela 10. Analiza wybranych parametrów klinicznych w odniesieniu do uzyskania SVR w grupie pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, którzy zwrócili ankietę
- XI. Tabela 11. Analiza wybranych parametrów klinicznych w odniesieniu do poziomu ALT w surowicy pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, którzy zwrócili ankietę
- XII. Tabela 12. Wpływ wartości BMI na uzyskany SVR u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C

mgr inż. Joanna Wysocka-Leszczynska

„Polimorfizm rs12979860, rs8099917 i rs12980275 genu interleukiny 28B u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C – związek z obrazem klinicznym zakażenia”
