

## WPLYW ZMIENNOŚCI WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV) NA SKUTECZNOŚĆ TERAPII PRZECIWWIRUSOWEJ

Kamila Carballo Cortés<sup>1\*</sup>, Marek Radkowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Zmienność wirusa zapalenia wątroby typu C. 3. Zastosowanie interferonu alfa (IFN- $\alpha$ ) i rybawiryny w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (pwzw C). 4. Czynniki wpływające na skuteczność leczenia. 4.1. Czynniki osobnicze. 4.2. Czynniki wirusowe. 5. Znaczenie kliniczne analizy regionu E2 HVR1 HCV. 6. Zmienność E2 HVR1 a prognozowanie skuteczności leczenia. 7. Podsumowanie

### The influence of hepatitis C virus (HCV) genetic variability on the outcome of antiviral therapy

**Abstract:** Hepatitis C virus is an important risk factor of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The commonly used treatment strategies, based on pegylated interferon alfa and ribavirin, do not provide a fully satisfactory clinical effect. The reasons for treatment failure are multifactorial and are attributed to both host and viral factors. Some of them are already employed in clinical practice to adjust the treatment strategy (i. e. pretreatment viral load, viral load kinetics, HCV genotype), but the knowledge in this field is still unsatisfactory. The present review summarizes the causes of therapy failure, with emphasis on the high viral genetic variability and assesses the potential of this unique viral feature to be used as a treatment prognostic marker.

1. Introduction. 2. Genetic variability of hepatitis C virus. 3. Use of interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) and ribavirin in treatment of chronic hepatitis C. 4. Factors influencing the outcome of hepatitis C treatment. 4.1. Host factors. 4.2. Viral factors. 5. Clinical relevance of E2 HVR1 HCV analysis. 6. Genetic variability of E2 HVR1 as a treatment prognostic marker. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** HCV, interferon alfa, leczenie przeciwwirusowe, *quasispecies*, rybawiryna

**Key words:** alpha interferon, antiviral treatment, HCV, *quasispecies*, ribavirin

### 1. Wstęp

Ponad 20 lat od odkrycia wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), ważnego czynnika etiologicznego marskości wątroby oraz pierwotnego raka wątroby (HCC), wiele aspektów związanych z patogenezą zakażenia oraz ograniczoną skutecznością leczenia wciąż wymaga wyjaśnienia. Aktualne schematy terapii są skuteczne średnio u ok. 50% zakażonych, ponadto istnieje prawdopodobieństwo reaktywacji zakażenia w późniejszym okresie po zakończeniu leczenia. Zasadniczym celem pracy było przedstawienie danych dotyczących zmienności HCV jako możliwej przyczyny nieskuteczności leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Uwzględniono jednak również inne czynniki prognostyczne skuteczności leczenia, przede wszystkim polimorfizm genu kodującego IL-28.

### 2. Zmienność wirusa zapalenia wątroby typu C

HCV zaliczany jest do rodziny *Flaviviridae*. Genom wirusa składa się z pojedynczej, dodatnio spolaryzowanej nici RNA o długości ok. 9 600 nukleotydów

zawierającej regiony niekodujące na końcach 5' i 3' oraz region kodujący białka strukturalne i niestrukturalne. Białka tworzące wirion (strukturalne) to białka otoczki (E1, E2) oraz białko rdzenia (C), natomiast białka niestrukturalne (NS) biorą udział w namnażaniu wirusa w organizmie gospodarza. Białko NS5b pełni funkcję RNA-zależnej polimerazy RNA – enzymu replikującego wirusowy materiał genetyczny, pozbawionego aktywności „naprawczej” 3'-5' egzonukleazy. Częstość pojawiania się mutacji w genomie HCV wynosi  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  substytucji/zasadę [64]. Biorąc pod uwagę średnią produkcję kopii wirusa w fazie przewlekłej zakażenia (ok.  $10^{12}$  kopii/doba) oraz wielkość genomu HCV (ok.  $10^4$  nukleotydów), można szacować, że liczba nowych mutacji w populacji wirusa u pacjenta wynosi ok.  $10^9$ – $10^{12}$  na dobę [24, 64]. Wysoki potencjał mutacyjny polimerazy RNA HCV jest powodem występowania wirusa w organizmie jako heterogennej genetycznie populacji [46].

Innym mechanizmem zmienności jest rekombinacja, zarówno homologiczna, jak i niehomologiczna. Dodatkowo, rekombinacja może być zależna od replikacji (rekombinacja replikacyjna) lub zachodzić niezależnie od tego procesu. Udowodniono występowanie rekombinacji

<sup>1</sup> Autor korespondencyjny: Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny; ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa; tel. (22) 57 20 709; e-mail: kamila.carballo@wum.edu.pl

HCV u pacjentów cierpiących na hemofilię, jak również u narkomanów zakażonych HCV, u których dochodzi do nadkażeń innymi genotypami [42, 60]. Średnio rekombinacja obserwowana jest u około 18% zakażonych [78].

Na podstawie analizy filogenetycznej regionu NS5 lub 5'UTR HCV podzielono na 6 głównych genotypów, mogących różnić się między sobą nawet 35% sekwencji. W każdym genotypie wyodrębniono subtypy (różnice genetyczne mogą wynosić do 25%), a subtypie – izolaty (10–15% zmienności). Poszczególne warianty wirusa określa się mianem *quasispecies* lub pseudotypów (do 5% zmienności); [64]. Pseudotypy HCV zostały odkryte w 1992 r. i wkrótce okazało się, że są swoistą cechą HCV, niezależną od rodzaju zakażenia (ostre czy przewlekłe), rodzaju tkanki (surowica, komórki PBMC czy tkanka wątrobowa), itp. [55].

Zmienność genetyczna HCV ma duże znaczenie w patogenezie zakażenia. Każda mutacja jest szansą na nabycie zdolności przetrwania wirusa w warunkach presji środowiska. W następstwie, selekcjonowane są warianty unikające odpowiedzi immunologicznej (tzw. *immune escape mutants*), warianty lekooporne lub warianty o zmodyfikowanej zjadliwości. Z drugiej strony, mutacje warunkujące lekooporność czy też unikanie odpowiedzi immunologicznej mogą równocześnie obniżyć poziom replikacji, zjadliwość lub zakaźność wirusa [19, 44].

### 3. Zastosowanie interferonu alfa (IFN- $\alpha$ ) i rybawiryny w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (pwzw C)

#### 3.1. Interferon alfa w leczeniu pwzw C

Interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) jest cytokiną immunomodulującą, wydzielaną przez komórki w odpowiedzi na zakażenia wirusowe. Produkcja IFN- $\alpha$  jest zależna od obecności w środowisku produktów charakterystycznych dla cząstek wirusów, takich jak np. dwuniciowy oraz jednociowy RNA, które łączą się z receptorami (głównie z grupy TLR – Toll-like receptor). W następstwie dochodzi do aktywacji transkrypcji genów dla IFN- $\alpha$ , jego syntezy i sekrecji. Wydzielony IFN łączy się z receptorami powierzchniowymi (Typ I receptora dla IFN- $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$  oraz IFN $\omega$ ) komórki zakażonej oraz sąsiadujących komórek, prowadząc do ekspresji wielu genów efektorowych (ISG, interferon-stimulated genes), których produkty mają działanie przeciwwirusowe [23]. Działanie przeciwwirusowe IFN- $\alpha$  polega m.in. na: aktywacji 2'-5' syntetazy oligoadenylowej (2'-5'OAS), białek Mx oraz RNA-zależnej kinazy białkowej R (PKR, protein kinase R) powodujących zahamowanie replikacji patogenu, oraz immunomodulacji (ekspresji cząsteczek MHC kl. I na powierzchni komórek, aktywacji makrofagów, komórek NK oraz

cytotoksycznych limfocytów T) służącej wzmocnieniu odpowiedzi przeciwwirusowej [68].

#### 3.2. Rybawiryna w leczeniu pwzw C

Rybawiryna jest syntetycznym analogiem guanozyny stosowanym początkowo w leczeniu zakażeń syncytialnym wirusem oddechowym (RSV) u dzieci. Wkrótce po odkryciu HCV związek ten został wykorzystany w monoterapii do leczenia pwzw C, jednak bez znaczącego wpływu na poziom wirerii [18]. Rybawiryna hamuje działanie polimeraz wirusowych w warunkach *in vitro*, jednakże mechanizmy dotyczące jej działania *in vivo* są nadal słabo poznane. Sugeruje się, że związek ten może działać jak mutagen, zwiększając poziom wprowadzania mutacji przez RNA-zależną polimerazę RNA, co skutkuje wytworzeniem defektywnych wariantów wirusa, o obniżonych zdolnościach zakaźnych oraz replikacyjnych [15].

Terapia skojarzona IFN- $\alpha$  oraz rybawiryną znacznie zwiększyła skuteczność leczenia pwzw C (średnio 35–40%) w porównaniu do IFN- $\alpha$  w monoterapii (16–20%), jak również zmniejszyła ryzyko nawrotu replikacji wirusa po leczeniu [10, 67]. Zastosowanie pegylowanego interferonu alfa (PEG-IFN- $\alpha$ ), posiadającego lepsze parametry farmakokinetyczne [31] skojarzonego z rybawiryną pozwala osiągnąć efekt terapeutyczny u ok. 54–56% pacjentów [26, 53].

Parametrem wyznaczającym skuteczność terapii przewlekłego zapalenia wątroby typu C jest trwała odpowiedź wirusologiczna SVR (sustained virological response), definiowana jako brak obecności HCV RNA we krwi pacjenta 6 miesięcy po zakończeniu leczenia przy użyciu testu molekularnego o czułości < 100 kopii wirusa/ml. Osiągnięcie SVR oznacza eliminację zakażenia oraz rokuje poprawę obrazu histologicznego wątroby [57]. Pacjenci nie odpowiadający na leczenie w pierwszej próbie mają mniejszą szansę na osiągnięcie SVR po kolejnym cyklu leczenia [76]. Problem osób „nieodpowiadających” jest obecnie jednym z ważniejszych wyzwań terapii pwzw C.

Ze względu na fakt, że SVR jest stosunkowo późnym parametrem skuteczności wdrożonej terapii, opracowano markery, które pozwoliłyby na wcześniejsze rokowanie co do wyniku leczenia. Udowodniono, że poziom wirerii w pierwszych tygodniach leczenia jest dobrym prognostykiem SVR. RVR (rapid virological response) jest określany brakiem materiału genetycznego wirusa we krwi pacjenta w 4 tygodniu od rozpoczęcia leczenia. RVR jest silnym prognostykiem SVR, o ile leczenie nie zostanie przedwcześnie przerwane [27, 52]. EVR (early virological response) jest definiowany jako brak wirerii bądź spadek wirerii o wartość co najmniej 2 log<sub>10</sub> w 12 tygodniu leczenia. Wykazano, że u pacjentów zakażonych genotypem 1 leczonych PEG-IFN- $\alpha$

oraz rybawiryną nie spełniających kryteriów EVR, trwała odpowiedź przeciwwirusowa nie zostanie osiągnięta u 98% tej grupy [16]. Podjęcie decyzji o przerwaniu leczenia w 12 tygodniu pozwala na oszczędności oraz uniknięcie obciążającego skutkami ubocznymi nieskutecznego leczenia.

#### 4. Czynniki wpływające na skuteczność leczenia

Za brak skuteczności leczenia odpowiedzialne są m.in. czynniki osobnicze oraz czynniki wirusowe.

##### 4.1. Czynniki osobnicze

Zaawansowany wiek, płeć męska, rasa mają wpływ na skuteczność leczenia pzw C. I tak, wykazano że przedstawiciele rasy kaukaskiej lub azjatyckiej lepiej odpowiadają na leczenie, aniżeli osoby pochodzenia afrykańskiego lub latynoskiego [50]. Nadmierna masa ciała może obniżyć efekt leczenia poprzez zmniejszenie stężenia leku w organizmie oraz jego dostępności dla receptorów [43]. Gorszy efekt leczenia uzyskano również u chorych nadużywających alkoholu, osób insulinoopornych, narkomanów oraz niestosujących się do zalecanego schematu leczenia [17, 77]. Również zaawansowane postaci choroby wątroby, takie jak znaczne zwłóknienie lub marskość oraz tzw. pozawątrobowe manifestacje zakażenia, takie jak krieglobulinemia mieszana lub błoniasto-rozplamowe zapalenie kłębuszków nerkowych wiążą się z niższą skutecznością leczenia [6, 49].

Sekwencjonowanie ludzkiego genomu, wraz z badaniem jego funkcji, stworzyły nowe możliwości dla określania czynników skuteczności leczenia. Badania mające na celu identyfikację wariantów genetycznych, wiążących się z czynnikami ryzyka dla wielu chorób (GWAS, genome-wide association study) zyskują coraz większą popularność. Polegają one na poszukiwaniu alleli w genomie, które wykazują jednonukleotydowy polimorfizm (single nucleotide polymorphism, SNP) a efekt fenotypowy tego polimorfizmu statystycznie różni się w grupie kontrolnej i grupie badanej. Podjęto próby wykorzystania tego narzędzia w określeniu czynników osobniczych związanych ze skutecznością leczenia zakażeń HCV.

Wyniki tych badań dowiodły, że czynniki nawet w obrębie tej samej populacji mogą wystąpić polimorfizmy w genach efektorowych dla IFN (np. *ADAR*, *CASP5*, *ISCBP1*, *IFI44*, *PIK3CG* oraz *TAP2*), powodujące znaczne różnice w poziomie odpowiedzi na IFN [47]. Również poziom ekspresji ISG (interferon-stimulated genes) ma znaczenie w odpowiedzi na leczenie pzw C. Osoby zakażone przewlekłe wykazują wysoki poziom ISG w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej [38]. Podobnie, pacjenci zidentyfikowani jako nieodpowiadający na leczenie PEG-IFN oraz rybawiryną wykazywali

wyższy poziom ekspresji ISG w wątrobie przed jego rozpoczęciem, niż odpowiadający na leczenie. Wykazano również, że SVR może być prognozowany na podstawie stopnia ekspresji genu czynnika transkrypcyjnego STAT6 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej wyizolowanych przed leczeniem lub nawet 24 godziny od jego rozpoczęcia [88]. Dane te wskazują, że osoby niewrażliwe na leczenie mogą wykazywać zaburzoną odpowiedź na endogenne oraz podawany w trakcie leczenia IFN- $\alpha$  [13].

W genie kodującym IFN także dowiedziono istnienia polimorfizmów, których występowanie badano w kontekście odpowiedzi na leczenie. Wykazano, że mutacja punktowa 764C>G, występująca w pobliżu genu kodującego IFN- $\gamma$  była istotnie związana z SVR. Analiza dowiodła, że substytucja ta determinuje wyższą siłę wiązania czynnika transkrypcyjnego HSF1 do genu kodującego IFN- $\gamma$  [37].

Interferony  $\lambda$ -1, 2 oraz 3 (znane również jako IL-29, IL-28A oraz IL-28B) są stosunkowo niedawno odkrytą grupą cytokin o działaniu przeciwwirusowym i cechach podobnych do interferonów typu I (m.in. IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ ), aczkolwiek o niższej aktywności *in vitro* [79]. Udowodniono znaczenie interferonów  $\lambda$  w kontroli zakażeń wirusowych, włączając zakażenia HIV, HBV oraz HCV [36, 54]. Wstępne badania kliniczne potwierdziły ich skuteczność w eliminacji zakażenia HCV przy niskiej toksyczności leku [62].

W 2009 roku, kilka niezależnych grup badawczych doniosło o występowaniu jednonukleotydowych polimorfizmów w pobliżu genu kodującego IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) w chromosomie 19, które korelowały z efektem leczenia PEG-IFN- $\alpha$  oraz rybawiryną [30, 81, 82, 85]. Pacjenci włączeni do badania byli przedstawicielami różnych grup etnicznych (Europejczycy, Afro-Amerykanie, Australijczycy oraz Japończycy), zakażeni genotypem 1. Co najmniej 3 *loci* determinujące efekt leczenia zostały zidentyfikowane. Były to pozycje rs12979860, rs8099917 oraz rs12980275, których genotypy C/C, T/T oraz A/A odpowiednio, były związane z dużym prawdopodobieństwem eliminacji wirusa w trakcie leczenia [81, 82, 85]. Występowanie określonych rodzajów polimorfizmów w tych pozycjach u różnych populacji etnicznych może tłumaczyć obserwowaną u nich różną efektywność leczenia. Choć wszystkie zidentyfikowane warianty genetyczne w tych badaniach znajdują się w pobliżu lub obrębie genu *IL-28B*, żaden z nich nie był bezpośrednio związany z jego funkcją [5].

Po odkryciu znaczenia polimorfizmu genu *IL-28B* w odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe dla genotypu 1, pojawiły się badania dotyczące innych genotypów, w szczególności 2 oraz 3 [40, 59, 75]. Badano w nich znaczenie polimorfizmów pozycji rs12979860, rs8099917 oraz rs12980275 w osiąganiu SVR. Wykazano, że genotyp C/C w pozycji rs12979860 wiąże się z wysokim

prawdopodobieństwem uzyskania SVR (84,7%) u pacjentów zakażonych genotypem 2 lub 3 leczonych PEG-IFN- $\alpha$  i rybawiryną, podczas gdy dla polimorfizmów pozycji rs8099917 oraz rs12980275 nie wykazano żadnej korelacji [75]. Inne badanie wykazało związek między polimorfizmem rs8099917 a SVR u zakażonych genotypem 2b (ale nie 2a) leczonych PEG IFN oraz rybawiryną [40].

Powyższe dane wskazują, że zmienność genetyczna genu *IL-28B* jest jak dotychczas najsilniejszym zidentyfikowanym czynnikiem determinującym kontrolę zakażenia HCV [71]. Prawdopodobnym jest, że zostanie on wykorzystany w praktyce klinicznej w celu indywidualizacji leczenia. Na przykład, osoby zakażone genotypem 1 niosące allel ryzyka nieskutecznego leczenia będą miały bardzo małą szansę na uzyskanie odpowiedzi wirusologicznej po terapii standardowej, stąd powinny w pierwszej kolejności mieć dostęp do nowych strategii leczenia.

## 4.2. Czynniki wirusowe

Ważną rolę w kształtowaniu się odpowiedzi na leczenie przypisuje się czynnikom wirusowym. I tak, genotyp HCV jest silnym niezależnym czynnikiem prognostycznym skuteczności leczenia, zarówno prowadzonego w monoterapii, jak i w skojarzeniu z rybawiryną. Wykazano, że zakażenie genotypem 1 lub 4 wiąże się z gorszą skutecznością terapii, aniżeli zakażenie genotypem 2 i 3 [51, 56]. Dlatego też genotyp HCV jest głównym parametrem brany pod uwagę przy ustalaniu czasu trwania leczenia. Standardowo, w przypadku zakażenia genotypem 1 lub 4 leczenie trwa 48 tygodni. W przypadku zakażenia genotypem 2 lub 3–24 tygodnie.

Udowodniono, że niektóre regiony genomu HCV mogą determinować wrażliwość wirusa na IFN. Region HVR1 HCV (hypervariable region 1) jest zlokalizowany na końcu 5' genu kodującego białko otoczki E2. Białko E2 zawiera antygeny dla przeciwciał neutralizujących, jak również dla cytotoksycznych limfocytów T (CTL); [12, 32, 39]. Wysoka zmienność genetyczna HVR1 wpływa na dużą zmienność antygenową wirusa, co sprzyja unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza a tym samym przetrwaniu wirusa oraz niewrażliwości na leczenie [19]. U dużego odsetka pacjentów, którzy nie osiągnęli SVR, zastosowanie leków oraz ich odstawienie powodowało zmiany jakościowe w kompozycji *quasispecies* w obrębie HVR1 [69, 80].

Region PePHD (PKR/eIF2 $\alpha$  phosphorylation homology domain) jest również zlokalizowany w obrębie białka E2. Zawiera sekwencję homologiczną do sekwencji omylenia fosforylacji czynnika translacyjnego eIF-2 $\alpha$  PKR [45]. Wykazano, że przyłączanie PePHD do PKR hamuje jej aktywność fosforylacyjną *in vitro*, a w efekcie powoduje niewrażliwość na IFN- $\alpha$ . Zjawisko to dotyczy

jednak tylko subtypów 1a i 1b wirusa, prawdopodobnie z powodu największej homologii sekwencji aminokwasowej PePHD u tych subtypów do sekwencji domeny wiążącej eIF-2 $\alpha$  białka PKR. Uważa się, że zdolność hamowania aktywności PKR przez genotyp 1 HCV przyczynia się do jego wysokiej lekooporności [84]. Mimo znaczenia PePHD w unikaniu odpowiedzi przeciwwirusowej, związek między zmiennością sekwencji kodującej PePHD a opornością na leczenie w przypadku badanych genotypów (1, 2 i 3) HCV pozostaje niejasny [29, 33].

W pobliżu karboksylowego końca białka NS5a znajduje się region złożony z 40 aminokwasów uznawany za region determinujący wrażliwość HCV na IFN- $\alpha$  (ISDR, interferon sensitivity determining region). W badaniu grupy japońskiej mutacje w obrębie ISDR korelowały z wynikiem leczenia dla genotypu 1b. Wykrycie co najmniej 4 mutacji w obrębie ISDR w porównaniu z sekwencją referencyjną HCV wiązało się ze skutecznym leczeniem [20, 65]. Analogiczną zależność wykryto dla genotypów 2a, ale nie 2b i 3a [8, 63]. Molekularną rolę NS5a odkrył Gale i wsp. Białko to pełni funkcję inhibitora PKR inaktywując enzym *in vitro* a tym samym hamując działanie IFN- $\alpha$ . Co więcej, hamowanie aktywności PKR można znieść poprzez wprowadzenie mutacji w obrębie ISDR [28]. Są również badania dowodzące, że NS5a może indukować syntezę prozapalnej IL-8, działającej antagonistycznie do IFN- $\alpha$  [70]. U pacjentów zakażonych przewlekłe wykazano wyższe stężenie tej chemokiny w surowicy, niż u zdrowych kontroli [70]. Podobnie, wyższy poziom IL-8 w surowicy był notowany u pacjentów nieodpowiadających na leczenie zakażonych genotypem 1, niż u pacjentów wyleczonych [58].

Najnowsze badania wskazują, że białko NS5a może inaktywować 2'-5' OAS. W efekcie, 2'-5' OAS nie może pośredniczyć w trawieniu wirusowego RNA przez RNazę L, co wpływa na kontynuację translacji białek (również wirusowych) w komórce. Różnice w częstości występowania dwunukleotydów UU oraz UA (rozpoznawanych przez RNazę L jako miejsca cięcia) między genotypami 1 a 2 i 3 HCV mogą tłumaczyć ich różną wrażliwość na IFN- $\alpha$  [34].

Niedawno, w obrębie genu *NS5a* zidentyfikowano region V3 (variable region 3), wykazujący znaczną zmienność mutacyjną [11]. Poziom zmienności tego regionu u subtypów 1a/1b miał wpływ na skuteczność leczenia IFN- $\alpha$  (szczepy odporne przed leczeniem wykazywały niską a wrażliwe – wysoką zmienność); [87].

NS3/4a jest wirusowym białkiem niestrukturalnym posiadającym aktywność proteazy. Foy i wsp. wykazali, że NS3/4a interferuje ze szlakiem aktywacji syntezy IFN *in vitro* blokując IRF-3, kluczowy czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję IFN. Aktywność IRF-3 była przywrócona poprzez dodatek inhibitora proteazy serynowej wskazując, że wirusowa proteaza trawi

aktywne domeny IRF-3 [25]. Analiza sekwencji IRF-3 dla subtypu 1a w kontekście skuteczności leczenia nie wykazała korelacji [74].

Przedstawione obserwacje mogą wskazywać na znaczenie polimorfizmu regionów HVR1 E2 oraz NS5a we wrażliwości na IFN- $\alpha$  a zatem skuteczności leczenia. Poziom zmienności innych badanych regionów wirusowych (5'UTR, HVR2, gen kodujący białko rdzenia C) nie był związany ze skutecznością leczenia [4, 35].

Choć udowodniono, że liczne czynniki (osobnicze i wirusowe) są odpowiedzialne za skuteczność leczenia u chorych zakażonych genotypem 1, ich wpływ najczęściej nie był oceniany u chorych zakażonych innymi genotypami. Niewiele wiadomo na temat mechanizmów odpowiadających za wysoką lekowrażliwość genotypów 2 i 3, głównie ze względu na ich szybką eliminację w trakcie leczenia. Niemniej jednak, wykazano istnienie lekoopornych wariantów genotypu 2a [3].

Uważa się, że populacja HCV przed leczeniem zawiera lekooporne warianty genetyczne, które następnie ulegają selekcji w warunkach presji narzuconej przez leczenie. Przemawiają za tym następujące obserwacje:

- 1) w pierwszych godzinach od zastosowania leków dokonuje się gwałtowny spadek poziomu replikacji HCV [89].
- 2) terapia interferonem jest w dużej mierze terapią immunomodulującą potęgującą odpowiedź przeciwwirusową, która wywiera presję selekcyjną na niektóre regiony genomu wirusa, białka oraz epitopy. Oznacza to, że wirus prawdopodobnie unika odpowiedzi immunologicznej stymulowanej przez interferon.
- 3) u leczonych, u których nie zanotowano trwałej odpowiedzi wirusologicznej, genom wirusa zawierał liczne mutacje, szczególnie w regionach determinujących wrażliwość na leczenie [66].

## 5. Znaczenie kliniczne analizy regionu E2 HVR1 HCV

Ze względu na negatywny wynik leczenia u ok. 50% pacjentów, podjęto próby określenia bardzo wczesnych czynników prognostycznych efektywności leczenia przeciwwirusowego, pozwalających wytypować osoby z największym ryzykiem nieskutecznej terapii. Mogą to być czynniki o charakterze osobniczym (np. wrażliwość na IFN- $\alpha$ ) lub wirusowym (np. genotyp, poziom wirerii, zjawisko *quasispecies*).

Identyfikacja wczesnego markera z wysokim prawdopodobieństwem przewidującego SVR miałoby dużą wartość kliniczną. Dysponowanie takim narzędziem umożliwiłoby uniknięcie skutków ubocznych oraz kosztów leczenia u pacjentów, którzy na nie nie odpowiedzą oraz dodatkowo motywowałoby pacjentów z pozytywną prognozą do ukończenia leczenia.

Postępy w biologii molekularnej umożliwiły dokładną analizę *quasispecies*. Wśród potencjalnych markerów prognostycznych dużą uwagę zwraca się na zmienność genetyczną regionu HVR1 E2. Uważa się, że analiza molekularna tego regionu może mieć zastosowanie prognostyczne, ponieważ:

- 1) region ten jest wysoko zmienny, w dużej mierze z powodu tolerancji na substytucje; jego analiza pozwala na wykrycie licznych wariantów genetycznych;
- 2) region ten koduje epitopy dla przeciwciał neutralizujących oraz dla komórek cytotoksycznych, podlegając silnej presji selekcyjnej układu immunologicznego [14, 32];
- 3) uważa się, że w czasie zakażenia stymulowana jest silna, lecz nieskuteczna odpowiedź humoralna skierowana przeciwko epitopom kodowanym przez E2, co skutkuje brakiem kontroli wirusa [72].

Jak dotąd, analizę zmienności HVR1 wykorzystano w celu rokowania przebiegu zakażenia HCV. Wykazano, że ewolucja genetyczna tego regionu w fazie ostrej zakażenia prowadzi zwykle do rozwoju zakażenia przewlekłego [41, 83]. Zjawisko to jest związane z pojawianiem się nowych wariantów wirusa niewrażliwych na działanie przeciwciał neutralizujących oraz cytotoksycznych limfocytów T [21]. Zgodnie z tą hipotezą, stabilność genetyczna *quasispecies* w regionie HVR1 zdaje się być warunkiem eliminacji wirusa w fazie ostrej [72]. Zaobserwowano również, że duże zróżnicowanie składu *quasispecies* było obecne u pacjentów zakażonych przewlekłe lecz bezobjawowo, wykazujących normalne wartości aktywności ALAT oraz znikome uszkodzenie wątroby [9].

## 6. Zmienność E2 HVR1 a prognozowanie skuteczności leczenia

Nieskuteczne leczenie związane jest z pojawianiem się zmian w populacji *quasispecies* [69, 80]. Zmiany te mogą mieć charakter ewolucji genetycznej (pojawianie się zupełnie nowych wariantów), bądź różnic w złożoności (liczba wariantów genetycznych określonego regionu). Wydaje się, że zmiany o charakterze ewolucji są konsekwencją niemożności eliminacji wirusa przez układ immunologiczny.

Szczególne znaczenie dla skuteczności leczenia mają zmiany mutacyjne występujące w genach wirusa, których produkty białkowe determinują wrażliwość na IFN lub uczestniczą w unikaniu odpowiedzi immunologicznej [23]. Wykazano, że zmiany o charakterze ewolucji w obrębie sekwencji HVR1 dotyczą ok. 70% pacjentów leczonych IFN- $\alpha$ , zakażonych genotypami 1a, 1b, 2a, 2c, 3a oraz 4a [66]. Podobny efekt wywiera terapia skojarzona IFN- $\alpha$  oraz rybawiryną [7]. Brak zmian genetycznych

w obrębie regionu HVR1 wykazuje populacja wirusa u co czwartego pacjenta, co oznacza, że warianty obecne u tych chorych przed leczeniem przechodzą selekcję pozytywną w czasie leczenia [66]. Pacjenci wykazujący niską złożoność genetyczną regionu HVR1 HCV przed rozpoczęciem terapii IFN- $\alpha$  zwykle należą do grupy odpowiadających na leczenie [66]. Na tej podstawie można wnioskować, że złożoność populacji HCV w regionie HVR1 E2 jest niezależnym prognostykiem skuteczności leczenia [66].

Wykazano, że wśród pacjentów leczonych IFN- $\alpha$  lub PEG-IFN- $\alpha$  oraz rybawiryną, złożoność populacji wirusa przed leczeniem była niższa u osiągających wczesną (12 tygodni od rozpoczęcia leczenia), ale nie trwałą odpowiedź wirusologiczną [1, 2]. W pracy Torres-Puente i wsp., gdzie analizie poddanych zostało 67 pacjentów stwierdzono, że u osób nieodpowiadających na leczenie różnorodność genetyczna regionu HVR1 E2 była wyższa, niż u pacjentów odpowiadających. Co ciekawe, różnorodność składu aminokwasowego tego regionu nie była jednak znamienne wyższa w grupie pacjentów nieodpowiadających [86]. Analogiczną zależność między wysoką złożonością początkowego składu *quasispecies* przed leczeniem a negatywnym wynikiem terapii zaobserwowano u pacjentów po wcześniejszym nieudanym kursie leczenia oraz wykazujących zaawansowane zwłóknienie wątroby [61].

W grupie pacjentów zakażonych różnymi genotypami HCV, leczonych IFN- $\alpha$ , wysoka złożoność regionu HVR1 nie korelowała z osiągnięciem trwałej odpowiedzi wirusologicznej wskazując, że czynniki osobnicze a nie wirusowe mają znaczenie dla wyniku leczenia [22]. Inne badania nie wykazały żadnej korelacji między złożonością populacji HCV a wynikiem leczenia [48, 73].

Nowsze analizy, przeprowadzone na dużej grupie pacjentów, potwierdziły korelację między niską złożonością populacji przed i we wczesnej fazie terapii a pozytywnym skutkiem leczenia [52]. Niższa złożoność *quasispecies* może świadczyć o skutecznej kontroli wirusa przez układ immunologiczny przed i w trakcie leczenia.

Jak można zauważyć, dostępne w literaturze badania podają niejednokrotnie sprzeczne wyniki analiz zmienności wariantów molekularnych HCV w kontekście efektu leczenia. Rozbieżności te można wytłumaczyć:

1. różną liczbą pacjentów badanych w poszczególnych próbach (często poniżej 10) oraz odmiennościami etnicznymi grup badanych;
2. różnicami genotypów HCV w badanych grupach;
3. zastosowaniem różnych technik badawczych i metod oceny *quasispecies*;
4. artefaktami będącymi skutkiem zastosowania polimeraz o niskiej wierności kopiowania materiału genetycznego oraz zbyt wysokiej liczby cykli amplifikacji, która zwiększa ryzyko powielania „fałszywych” mutacji;

5. w przypadku analizy dokonanej za pomocą klonowania oraz sekwencjonowania, wiarygodne wyniki można otrzymać tylko wówczas, gdy przeanalizowana jest duża liczba klonów pochodzących z populacji wirusa (co najmniej 10, optymalnie powyżej 20), co da odzwierciedlenie jej rzeczywistego składu [46].

## 7. Podsumowanie

Wysoka zmienność genetyczna HCV stwarza warunki unikania odpowiedzi immunologicznej a w następstwie sprzyja rozwojowi przewlekłego zakażenia. Jest także odpowiedzialna za występowanie zjawiska lekooporności, które jest przyczyną nieskutecznego leczenia u znacznego odsetka pacjentów. Jak dotąd, trudności w zdefiniowaniu markerów molekularnych nieskutecznej terapii uniemożliwiają opracowanie testów diagnostycznych, które pozwoliłyby na stwierdzenie lekooporności (tak jak ma to miejsce w przypadku oznaczeń na lekooporność HIV). Aktualny stan wiedzy o czynnikach wirusowych wpływających na skuteczność leczenia (genotyp, wiremia przed leczeniem), pozwalających na dobór odpowiedniego schematu terapeutycznego, jest niewystarczający. Dlatego badania wyjaśniające związek między złożonością populacji *quasispecies* a efektem leczenia jako potencjalnego parametru skuteczności terapii są intensywnie prowadzone.

## Piśmiennictwo

1. Abbate I., M.R. Capobianchi i wsp.: Heterogeneity of HVR-1 *quasispecies* is predictive of early but not sustained virological response in genotype 1b-infected patients undergoing combined treatment with PEG- or STD-IFN plus RBV. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **17**, 162–165 (2003) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
2. Abbate I., M.R. Capobianchi i wsp.: HVR-1 *quasispecies* modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated or standard-interferon and ribavirin. *J. Hepatol.* **40**, 831–836 (2004) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
3. Akuta N., H. Kumada i wsp.: Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 2a high viral load and virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology*, **52**, 301–309 (2009) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
4. Araujo F.M., Sonoda I.V., Rodrigues N.B., Teixeira R., Redondo R.A., Oliveira G. C.: Genetic variability in the 5' UTR and NS5A regions of hepatitis C virus RNA isolated from non-responding and responding patients with chronic HCV genotype 1 infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **103**, 611–614 (2008)
5. Asselah T., Bieche I., Sabbagh A., Bedossa P., Moreau R., Valla D., Vidaud M., Marcellin P.: Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut*, **58**, 846–858 (2009)
6. Asselah T., Estrabaud E., Bieche I., Lapalus M., De Muynck S., Vidaud M., Saadoun D., Soumelis V., Marcellin P.: Hepatitis C:

- viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int.* **9**, 1259–1269 (2010)
7. Aurora R., Donlin M.J., Cannon N.A., Tavis J.E.: Genome-wide hepatitis C virus amino acid covariance networks can predict response to antiviral therapy in humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 225–236 (2009)
  8. Bagaglio S., Bruno R., Lodrini S., De Mitri M. S., Andreone P., Loggi E., Galli L., Lazzarin A., Morsica G.: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus (HCV) in clinical strains of HIV positive and HIV negative patients chronically infected with HCV genotype 3a. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **17**, 153–161 (2003)
  9. Brambilla S., E.M. Silini i wsp.: Dynamics of hypervariable region 1 variation in hepatitis C virus infection and correlation with clinical and virological features of liver disease. *Hepatology*, **27**, 1678–1686 (1998) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
  10. Brillanti S., Garson J., Foli M., Whitby K., Deaville R., Masci C., Miglioli M., Barbara L.: A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **107**, 812–817 (1994)
  11. Castelain S., Khorsi H., Roussel J., Francois C., Jaillon O., Capron D., Penin F., Wychowski C., Meurs E., Duverlie G.: Variability of the nonstructural 5A protein of hepatitis C virus type 3a isolates and relation to interferon sensitivity. *J. Infect. Dis.* **185**, 573–583 (2002)
  12. Chambers T.J., Fan X., Droll D.A., Hembrador E., Slater T., Nickells M.W., Dustin L.B., Di Bisceglie A.M.: Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **79**, 3071–3083 (2005)
  13. Chen L., Borozan I., Feld J., Sun J., Tannis L.L., Coltescu C., Heathcote J., Edwards A. M., McGilvray I. D.: Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*, **128**, 1437–1444 (2005)
  14. Cristina J., del Pilar Moreno M., Moratorio G.: Hepatitis C virus genetic variability in patients undergoing antiviral therapy. *Virus Res.* **127**, 185–194 (2007)
  15. Crotty S., Maag D., Arnold J.J., Zhong W., Lau J.Y., Hong Z., Andino R., Cameron C.E.: The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* **6**, 1375–1379 (2000)
  16. Davis G.L.: Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology*, **36**, 145–151 (2002)
  17. Degos F.: Hepatitis C and alcohol. *J. Hepatol.* **31**, 113–118 (2002)
  18. Di Bisceglie A.M., Conjeevaram H.S., Fried M.W., Sallie R., Park Y., Yurdaydin C., Swain M., Kleiner D.E., Mahaney K., Hoofnagle J.H.: Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **123**, 897–903 (1995)
  19. Domingo E., Gomez J.: Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res.* **127**, 131–150 (2007)
  20. Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurosaki M., Murakami T., Yamamoto C., Izumi N., Marumo F., Sato C.: Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J. Clin. Invest.* **96**, 224–230 (1995)
  21. Farci P., H.J. Alter i wsp.: The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*, **288**, 339–344 (2000) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
  22. Farci P., R.H. Purcell i wsp.: Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3081–3086 (2002) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
  23. Feld J.J., Hoofnagle J.H.: Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, **436**, 967–972 (2005)
  24. Figlerowicz M., Alejska M., Kurzyńska-Kokorniak A., Figlerowicz M.: Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med. Res. Rev.* **23**, 488–518 (2003)
  25. Foy E., Li K., Wang C., Sumpter R., Jr., Ikeda M., Lemon S.M., Gale M. Jr.: Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, **300**, 1145–1148 (2003)
  26. Fried M.W., J. Yu i wsp.: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–982 (2002) (praca stanowi dzieło 14 autorów)
  27. 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*, **48**, 1033–1043 (2008) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
  28. Gale M.J. Jr, Korth M.J., Tang N.M., Tan S.L., Hopkins D.A., Dever T.E., Polyak S.J., Gretch D.R., Katze M.G.: Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, **230**, 217–227 (1997)
  29. Gaudy C., Lambele M., Moreau A., Veillon P., Lunel F., Goudeau A.: Mutations within the hepatitis C virus genotype 1b E2-PePHD domain do not correlate with treatment outcome. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 750–754 (2005)
  30. Ge D., D.B. Goldstein i wsp.: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, **461**, 399–401 (2009) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
  31. Glue P., Fang J.W., Rouzier-Panis R., Raffanel C., Sabo R., Gupta S.K., Salfi M., Jacobs S.: Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**, 556–567 (2000)
  32. Guglietta S, P. Del Porto i wsp.: Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection. *Eur. J. Immunol.* **35**, 2627–2637 (2005) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
  33. Gupta R., Subramani M., Khaja M.N., Madhavi C., Roy S., Habibullah C.M., Das S.: Analysis of mutations within the 5' untranslated region, interferon sensitivity region, and PePHD region as a function of response to interferon therapy in hepatitis C virus-infected patients in India. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 709–715 (2006)
  34. Han J.Q., Barton D.J.: Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA*, **8**, 512–525 (2002)
  35. Hofmann W.P., Sarrazin C., Kronenberger B., Schonberger B., Bruch K., Zeuzem S.: Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J. Infect. Dis.* **187**, 982–987 (2003)
  36. Hou W., Wang X., Ye L., Zhou L., Yang Z. Q., Riedel E., Ho W.Z.: Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J. Virol.* **83**, 3834–3842 (2009)
  37. Huang Y., Liang T.J. i wsp.: A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 985–990 (2007) (praca stanowi dzieło 15 autorów)
  38. Ji X., Cheung R., Cooper S., Li Q., Greenberg H. B., He X. S.: Interferon alfa regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*, **37**, 610–621 (2003)

39. Kato N., Sekiya H., Ootsuyama Y., Nakazawa T., Hijikata M., Ohkoshi S., Shimotohno K.: Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J. Virol.* **67**, 3923–3930 (1993)
40. Kawaoka T., K. Chayama i wsp.: Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2010.07.032 (2010) (wersja elektroniczna czasopisma) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
41. Koizumi K., Enomoto N., Kurosaki M., Murakami T., Izumi N., Marumo F., Sato C.: Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology*, **22**, 30–35 (1995)
42. Kurbanov F., Tanaka Y., Avazova D., Khan A., Sugouchi F., Kan N., Kurbanova-Khudayberganova D., Khikmatullaeva A., Musabaev E., Mizokami M.: Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1\_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. *Hepatol. Res.* **38**, 457–464 (2008)
43. Lam N.P., Pitrak D., Speralakis R., Lau A.H., Wiley T.E., Layden T.J.: Effect of obesity on pharmacokinetics and biological effect of interferon-alpha in hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.* **42**, 178–185 (1997)
44. Lauring A.S., Andino R.: Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* **6**, 1001005 (2010) (wersja elektroniczna czasopisma)
45. Le Guillou-Guillemette H., Vallet S., Gaudy-Graffin C., Payan C., Pivert A., Goudeau A., Lunel-Fabiani F.: Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.* **13**, 2416–2426 (2007)
46. Lee C.M., Hung C.H., Lu S.N., Changchien C.S.: Hepatitis C virus genotypes: clinical relevance and therapeutic implications. *Chang Gung Med. J.* **31**, 16–25 (2008)
47. Lin E., Hwang Y., Wang S.C., Gu Z.J., Chen E.Y.: An artificial neural network approach to the drug efficacy of interferon treatments. *Pharmacogenomics*, **7**, 1017–1024 (2006)
48. López-Labrador F.X., Ampurdanès S., Giménez-Barcons M., Guilera M., Costa J., Jiménez de Anta M.T., Sánchez-Tapias J.M., Rodés J., Sáiz J.C.: Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology*, **29**, 897–903 (1999)
49. Lunel F., Cacoub P.: Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **31**, 210–216 (1999)
50. McHutchison J.G., Poynard T., Pianko S., Gordon S.C., Reid A.E., Dienstag J., Morgan T., Yao R., Albrecht J.: The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. The International Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology*, **119**, 1317–1323 (2000)
51. Mahaney K., Tedeschi V., Maertens G., Di Bisceglie A.M., Vergalla J., Hoofnagle J.H., Saille R.: Genotypic analysis of hepatitis C virus in American patients. *Hepatology*, **20**, 1405–1411 (1994)
52. Mangia A., Andriulli A.: Tailoring the length of antiviral treatment for hepatitis C. *Gut*, **59**, 1–5 (2010)
53. Manns M.P., McHutchison J.G., Gordon S.C., Rustgi V.K., Shiffman M., Reindollar R., Goodman Z.D., Koury K., Ling M., Albrecht J.K.: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, **358**, 958–965 (2001)
54. Marcello T., Grakoui A., Barba-Spaeth G., Machlin E.S., Kotenko S.V., MacDonald M.R., Rice C.M.: Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*, **131**, 1887–1898 (2006)
55. Martell M., Esteban J.I., Quer J., Genescà J., Weiner A., Esteban R., Guardia J., Gómez J.: Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* **66**, 3225–3229 (1992)
56. Martinot-Peignoux M., P. Marcellin i wsp.: Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **29**, 214–223 (1998) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
57. Maylin S., P. Marcellin i wsp.: Sustained virological response is associated with clearance of hepatitis C virus RNA and a decrease in hepatitis C virus antibody. *Liver Int.* **29**, 511–517 (2009) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
58. Mihm U., Herrmann E., Sarrazin U., von Wagner M., Kronenberger B., Zeuzem S., Sarrazin C.: Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **40**, 845–852 (2004)
59. Montes-Cano M.A., Garcia-Lozano J.R., Abad-Molina C., Romero-Gomez M., Barroso N., Aguilar-Reina J., Nunez-Roldan A., Gonzalez-Escribano M.F.: Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*, **52**, 33–37 (2010)
60. Moreno P., Alvarez M., López L., Moratorio G., Casane D., Castells M., Castro S., Cristina J., Colina R.: Evidence of recombination in hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virol. J.* **6**, 203 (2009) (wersja elektroniczna czasopisma)
61. Morishima C., Lindsay K.L.: Hepatitis C virus-specific immune responses and quasi-species variability at baseline are associated with nonresponse to antiviral therapy during advanced hepatitis C. *J. Infect. Dis.* **193**, 931–940 (2006)
62. Muir, A. J., Lawitz, E. i wsp.: Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology*, **52**, 822–832 (2010) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
63. Murakami T., Enomoto N., Kurosaki M., Izumi N., Marumo F., Sato C.: Mutations in nonstructural protein 5A gene and response to interferon in hepatitis C virus genotype 2 infection. *Hepatology*, **30**, 1045–1053 (1999)
64. Myrnel H., Ulvestad E., Åsjø B.: The hepatitis C virus enigma. *APMIS*, **117**, 427–439 (2009)
65. Pawlotsky J.M., Germanidis G., Neumann A.U., Pellerin M., Frainais P.O., Dhumeaux D.: Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* **72**, 2795–2805 (1998)
66. Pawlotsky J.M., Germanidis G., Frainais P.O., Bouvier M., Soulier A., Pellerin M., Dhumeaux D.: Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J. Virol.* **73**, 6490–6499 (1999)
67. Pawlotsky J.M., Dahari H., Neumann A.U., Hezode C., Germanidis G., Lonjon I., Castera L., Dhumeaux D.: Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **126**, 703–714 (2004)
68. Peters M.: Action of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology*, **23**, 909–916 (1996)
69. Polyak S.J., D.R. Gretch i wsp.: Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J. Virol.* **72**, 4288–4296 (1998) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
70. Polyak S.J., Khabar K.S., Paschal D.M., Ezelle H.J., Duverlie G., Barber G.N., Levy D.E., Mukaida N., Gretch D.R.: Hepatitis C



- virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* **75**, 6095–6106 (2001)
71. Rauch A., P.Y. Bochud i wsp.: Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*, **138**, 1338–1345 (2010) (praca stanowi dzieło 26 autorów)
  72. Ray S.C., Wang Y.M., Laeyendecker O., Ticehurst J.R., Villano S.A., Thomas D.L.: Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J. Virol.* **73**, 2938–2946 (1999)
  73. Sandres K., Dubois M., Pasquier C., Payen J.L., Alric L., Duffaut M., Vinel J.P., Pascal J.P., Puel J., Izopet J.: Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J. Virol.* **74**, 661–668 (2000)
  74. Sarrazin C., Mihm U., Herrmann E., Welsch C., Albrecht M., Sarrazin U., Traver S., Lengauer T., Zeuzem S.: Clinical significance of in vitro replication-enhancing mutations of the hepatitis C virus (HCV) replicon in patients with chronic HCV infection. *J. Infect. Dis.* **192**, 1710–1719 (2005)
  75. Sarrazin C., Susser S., Doehring A., Lange C.M., Müller T., Schleckner C., Herrmann E., Löttsch J., Berg T.: Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2010.07.041 (2010) (wersja elektroniczna czasopisma)
  76. Schalm S.W., Brouwer J.T., Bekkering F.C., van Rossum T.G.: New treatment strategies in non-responder patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **31**, 184–188 (1999)
  77. Schiff E.R.: The alcoholic patient with hepatitis C virus infection. *Am. J. Med.* **107**, 95–99 (1999)
  78. Sentandreu V., Jiménez-Hernández N., Torres-Puente M., Bracho M.A., Valero A., Gosalbes M.J., Ortega E., Moya A., González-Candelas F.: Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PLoS One*, **3**, 3239 (2008) (wersja elektroniczna czasopisma)
  79. Sheppard P., K.M. Klucher i wsp.: IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* **1**, 63–68 (2003) (praca stanowi dzieło 26 autorów)
  80. Shindo M., Hamada K., Koya S., Arai K., Sokawa Y., Okuno T.: The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology*, **24**, 1018–1023 (1996)
  81. Suppiah V., J. George i wsp.: IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* **41**, 1100–1104 (2009) (praca stanowi dzieło 19 autorów)
  82. Tanaka Y., M. Mizokami i wsp.: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* **41**, 1105–1109 (2009) (praca stanowi dzieło 29 autorów)
  83. Tanoguchi S., Okamoto H., Sakamoto M., Kojami M., Truda F., Tanaka T., Munekata E., Mochmore E.E., Peterson D.A., Mishiro S.: A structurally flexible and antigenetically variable N-terminal domain of hepatitis C virus E2/NS1 protein: Implication for an escape from antibody. *Virology*, **195**, 297–301 (1993)
  84. Taylor D.R., Shi S.T., Romano P.R., Barber G.N., Lai M.M.: Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, **285**, 107–110 (1999)
  85. Thomas D.L., M. Carrington i wsp.: Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, **461**, 798–801 (2009) (praca stanowi dzieło 19 autorów)
  86. Torres-Puente M., F. González-Candelas i wsp.: Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J. Viral. Hepat.* **15**, 188–199 (2008) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
  87. Veillon P., Payan C., Le Guillou-Guillemette H., Gaudy C., Lunel F.: Quasispecies evolution in NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b during interferon or combined interferon-ribavirin therapy. *World J. Gastroenterol.* **13**, 1195–1203 (2007)
  88. Younossi Z.M., S.Y. Chang i wsp.: Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin. *Hepatology*, **49**, 763–774 (2009) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
  89. Zeuzem S., Schmidt J.M., Lee J.H., Ruster B., Roth W.K.: Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover *in vivo*. *Hepatology*, **23**, 366–371 (1996)
- Praca została sfinansowana z grantu MNiSW nr NN 401337433 oraz Projektu Młodego Badacza nr 1M24/WB1/10.