

ORVOSI HETILAP

A l a p í t v a 1 8 5 7 - b e n

144. évfolyam, 24. szám

2003. június 15.

560 Ft

A csontok óriássejtes tumoráról 1171

EREDETI KÖZLEMÉNYEK

Krónikus C-hepatitiszes betegekből izolált hepatitis C-vírus 1b
protein kináz kötő régiójának szerkezeti analízise és
ennek összefüggése az interferon kezelés eredményességével 1179

A SZÜLÉSZET IDŐSZERŰ KÉRDÉSEI

Az első trimeszterbeli vetélések morfológiai háttere 1185

TERÁPIÁS KÉRDÉSEK

A pitvarfibrilláció gyógyszeres kezelése 1199

FOLYÓIRATREFERÁTUMOK 1209

HÍREK 1220



A MARKUSOVSZKY LAJOS ALAPÍTVÁNY
TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATA

ORVOSI HETILAP

144. évfolyam 24. szám – 2003. június 15.



A MARKUSOVSZKY LAJOS ALAPÍTVÁNY
TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATA

Alapította • Established by
MARKUSOVSZKY LAJOS (1857)

Főszerkesztő • Editor in Chief
FEHÉR JÁNOS DR.

Főszerkesztő-helyettes • Deputy Editor
KELLER LÁSZLÓ DR.

Szerkesztőbizottság • Editorial Board

Boda Domokos dr., Brooser Gábor dr., Dobozy Attila dr., Eckhardt Sándor dr., Falus András dr.,
Forgács Iván dr., Gömör Béla dr., Hankiss János dr., Jakab Ferenc dr., Károlyi György dr., Kiss János dr.,
Kopper László dr., Lampé László dr., Nász István dr., Oláh Éva dr., Oszváth Károly dr., Paál Tamás dr.,
Papp Zoltán dr., Rák Kálmán dr., Ribári Ottó dr., Romics László dr., Schaff Zsuzsa dr., Sótónyi Péter dr. és Tulassay Zsolt dr.

Szerkesztőségi főmunkatársak • Senior editors
Rác Károly dr. és Regöly-Mérei János dr.

Szerkesztők • Editors

Betkó János dr., Blázovics Anna dr., Bodánszky Hedvig dr., Dinya Elek dr., Hagymási Krisztina dr.,
Hardy Gézné dr., Incze Ferenc dr., Lengyel Gabriella dr., Pár Alajos dr., Szállási Árpád dr.,
Tolnay Edina dr. és Vértes László dr.

Rovatgondozó munkatársak • Column care coworkers
Gulácsi László dr., Jermendy György dr. és Simon Kornél dr.

Nemzetközi Tanácsadó Testület • International Advisory Board

Elnök • President

G. CSOMÓS DR. (Hamburg)

G. Ács dr. (New York), M. Classen dr. (München), H. Falk dr. (Freiburg), P. Ferenci dr. (Wien),
P. G. Forbath dr. (Torontó), M. R. Graczynski dr. (Warsaw), M. Hahn dr. (Erlangen), L. Iffy dr. (New Jersey),
N. J. Lygidakis dr. (Athen), N. McIntyre dr. (London), K. Meyer zum Büschenfelde dr. (Mainz),
G. Nagy dr. (Sydney), L. Okolicsanyi dr. (Padova), M. Palkovits dr. (New York-Budapest),
S. Pena dr. (Amsterdam), P. Petrusz dr. (Chapel Hill), G. Ramadori dr. (Goettingen), J. Reichen dr. (Bern),
H. Thaler dr. (Wien), T. Tsuji dr. (Okayama), G. Weber dr. (Indianapolis), E. Zsigmond dr. (Chicago)

Kiadja a Medicina Könyvkiadó Rt.,
1054 Budapest, V., Zoltán utca 8.
A kiadásért felel a Medicina Könyvkiadó Rt. igazgatója
Szerkesztőség: 1054 Budapest, V., Zoltán utca 8.
Levélcím: 1245 Budapest 5., Pf.: 1012
Telefon: (361) 354 1890, (361) 354 1170 Telefax: (361) 269 0100
E-mail: orvosi.hetilap@axelero.hu
Honlap: www.medicina-kiado.hu
A laptervet készítette: Varsányi György
Tördelőszerkesztők: Fenyő Zsuzsanna és Zacsik Annamária
Nyomdai előkészítés: Trajan Könyvesműhely
Nyomás és kötés: Széchenyi Nyomda Kft., Győr, 2003
Felelős nyomdavezető: Nemere Zsolt ügyvezető

Terjeszti a Magyar Posta Rt. ÜLK és a Medicina Könyvkiadó Rt.
Előfizethető a kiadónál 1054 Budapest, Zoltán utca 8.,
telefon: (361) 331 0781, fax: (361) 312-2450, postautalványon
vagy átutalással a kiadó 10200940-21511787 számú
ABN-AMRO Banknál vezetett számlájára.
Előfizetési díj egy évre 18 000,- Ft, fél évre 10 000,- Ft,
negyedévre 6000,- Ft.
Egyes szám ára 560,- Ft.

Subscription with postage and handling:
EUR 250 per vol.
INDEX: 25674 - ISSN 0030-6002



ORVOSI HETILAP

144. évfolyam 24. szám – 2003. június 15.

A MARKUSOVSKY LAJOS ALAPÍTVÁNY
TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATA

HUNGARIAN MEDICAL JOURNAL

June 15., 2003. Volume 144. No. 24.

OFFICIAL JOURNAL OF
MARKUSOVSKY LAJOS' FOUNDATION

A csontok óriássejtes tumoráról
Szendrői Miklós dr., Antal Imre dr., Kiss János dr. 1171

EREDETI KÖZLEMÉNYEK

Krónikus C-hepatitises betegekből izolált hepatitis C-vírus 1b protein kináz kötő régiójának szerkezeti analízise és ennek összefüggése az interferon kezelés eredményességével
Gervain Judit dr., Czibula Ágnes,
Simon Judit dr., Kalmár Tibor 1179

A SZÜLÉSZET IDŐSZERŰ KÉRDÉSEI

Az első trimeszterbeli vetélések morfológiai háttere
Marton Tamás dr., Hargitai Beáta dr.,
Bőze Tamás dr., Tankó András dr., Csapó Zsolt dr.,
Szende Béla dr., Papp Zoltán dr. 1185

TERÁPIÁS KÉRDÉSEK

A pitvarfibrilláció gyógyszeres kezelése
Fazekas Tamás dr., Csanádi Zoltán dr.,
Varró András dr. 1199

FOLYÓIRATREFERÁTUMOK 1209

GYÓGYSZERHÍRADÓ 1219

HÍREK 1220

PÁLYÁZATI HIRDETMÉNYEK 1223

Giant-cell tumor of the bone
Szendrői, M., Antal, I., Kiss, J. 1171

ORIGINAL ARTICLES

Structure analysis of the PKR-Binding Region of HCV 1b samples from patients with chronic hepatitis C and the correlation with IFN-sensitivity
Gervain, J., Czibula, Á., Simon, J., Kalmár, T. 1179

ACTUAL QUESTIONS OF OBSTETRICS

Fetal examination of first trimester abortions
Marton, T., Hargitai, B., Bőze, T., Tankó, A.,
Csapó, Zs., Szende, B., Papp, Z. 1185

THERAPEUTIC QUESTIONS

Drug treatment of atrial fibrillation
Fazekas, T., Csanádi, Z., Varró, A. 1199

FROM THE LITERATURE 1209

DRUG NEWS 1219

NEWS 1220

Krónikus C-hepatitises betegekből izolált hepatitis C-vírus 1b protein kináz kötő régiójának szerkezeti analízise és ennek összefüggése az interferon kezelés eredményességével

Gervain Judit dr.¹, Czibula Ágnes², Simon Judit dr.³ és Kalmár Tibor²

Fejér Megyei Szent György Kórház, Székesfehérvár, I. Belgyógyászat, Hepato-Pancreatologiai Részleg és Víruszerológiai Laboratórium (főorvos: Gervain Judit dr.)¹

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet (igazgató: Raskó István dr.)²

Centre for Outcomes, Research and Effectiveness, Sub-Department of Clinical Health Psychology, University College of London, Egyesült Királyság (igazgató: Steve Pilling)³

Bevezetés: Magyarországon a krónikus C-hepatitist 91,5%-ban a hepatitis C-vírus 1b (HCV 1b) szubtipusa okozza. Japán kutatók összefüggést találtak e vírus NS5A genomszakaszának egy része, nevezetesen az RNS-függő proteinkináz kötő régió (PKR-BR: aa 2209–2274) és az ezen belül található „interferon érzékenységet meghatározó régió” (ISDR: aa 2209–2248) szerkezete és az interferon- (IFN-) terápia eredményessége között. Több európai tanulmány ezt a megállapítást nem tudta megerősíteni. **Célkitűzések:** 1. Krónikus C-hepatitises betegekből izolált HCV 1b PKR-BR nukleotidszerkezetének elemzése alapján a vírus magyarországi prototípusának meghatározása. 2. A HCV 1b ISDR fenotípusosan expresszálandó nukleotid mutációi és az IFN-terápia hatásossága közötti összefüggés vizsgálata. **Betegek:** A szerzők retrospektíven vizsgálták 21 (nő:13; férfi: 8) HCV 1b-fertőzött, IFN-kezelt (3 tartósan reagáló, 18 nem reagáló) krónikus C-hepatitises beteg terápia előtti szérumát. **Módszerek:** Nested reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció és direkt nukleotid szekvenálás analízis. **Eredmények:** 1. A hazai HCV 1b szerkezete különbözik a nemzetközileg prototípusként elfogadott japán HCV 1b-J-től. 2. Összefüggés található az ISDR típusa és az IFN hatékonysága között. A mutáns típusú (≥ 4 aminosavcsere) ISDR prediktív értékű a tartós reagálás szempontjából ($p = 0,012$). 3. Az aminosav-szubsztitúciók helyei és típusai közül a 2218 pozícióban lévő argininnek van terápiazisztenciát előjelző értéke. **Következtetések:** Az eredmények az eredeti japán megállapítással összhangban megerősítik a kezelés előtti nukleotidszekvenálás prediktív értékét. Nemzetközi kutatási eredmények hazai adaptálásánál figyelemmel kell lenni az eltérő hazai HCV 1b quasiespeciekből esetlegesen fakadó különbözőségekre.

Kulcsszavak: HCV-fertőzés, interferon kezelés, RNS-függő proteinkináz kötő régió (PKR-BR), interferon érzékenységet meghatározó régió (ISDR)

Structure analysis of the PKR-Binding Region of HCV 1b samples from patients with chronic hepatitis C and the correlation with IFN-sensitivity. *Introduction:* 91.5% of all chronic HCV infections are of 1b-type in Hungary. Japanese researchers found a correlation between the outcome of interferon (IFN) therapy and the structure of the PKR-Binding Region (aa: 2209-2274) of the viral NS5A domain, especially a particular subsection of the PKR-BR, the Interferon Sensitivity Determining Region (ISDR: aa 2209-2248). Several international studies could not confirm these findings. *Aims:* The objectives of this study were 1. to determine the Hungarian prototype of HCV 1b based on the nucleotide sequence analysis of the PKR-BR of HCV 1b samples from patients with chronic hepatitis C; and 2. to investigate the relationship between the phenotypically expressed mutations of ISDR and the response to IFN therapy. *Patients:* Pre-treatment serum samples of 21 chronic hepatitis C patients (13 women, 8 men), infected with HCV 1b and treated with IFN- α (3 sustained responders, 18 non-responders), were analysed retrospectively. *Methods:* Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and direct nucleotide sequencing were applied. *Results:* 1. The dominant Hungarian quasiespecies of HCV 1b differs from the Japan HCV 1b-J, the internationally accepted prototype. 2. The results showed significant correlation between the type of ISDR and the interferon response. Mutant type ISDRs ($4 \geq$ amino acid substitutions) have predictive value for sustained response ($p = 0.012$). 3. The types and locations of substitutions are not characteristic, except that arginine in position 2218 has predictive value for therapy resistance. *Conclusions:* The authors' study results are in accordance with the earlier Japanese findings and confirm the predictive value of pre-treatment nucleotide sequencing in Hungary. Full adaptation of international research results to a Hungarian context should be treated with caution due to the between-countries virus prototype differences.

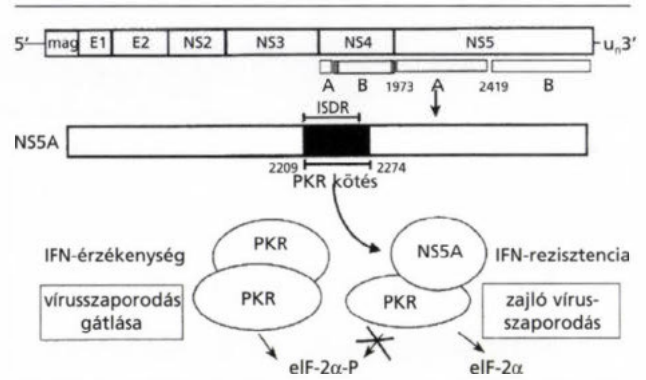
Key words: HCV infection, interferon therapy, RNA-dependent protein kinase binding region (PKR-BR), interferon sensitivity determining region (ISDR)

A krónikus C-vírushepatitis kezelésében még ma is a leghatékonyabb gyógyszer az interferon (IFN) (1). 3 fő típusa ismert: IFN- α , IFN- β és IFN- γ . Ezek celluláris proteinek, termelésüket különböző ingerek, gyakran vírusinfekciók váltják ki. Antivirális hatásukat nem közvetlenül a vírusokra fejtik ki, csupán indukálják az antivirális állapotot. Ennek eredményeként ún. effektorfehérjék termelődnek, melyek gátolni tudják a vírusok szaporodását. A vírushepatitisben alkalmazott IFN- α számos effektorprotein képződéséért felelős. Közülük több hatásmechanizmusa ma már részletesen ismert. Egyikőjük az RNS-függő proteinkináz, a PKR, mely központi szerepet játszik az IFN által indukált antivirális és antiproliferatív hatásban. E mechanizmus kulcsfontosságú lépése az RNS-függő proteinkináz aktivációja. Kettős szálú RNS jelenlétében a PKR foszforilálja a proteininiciációs faktor 2α alegységét, az eIF- 2α -t. Ennek eredményeként az mRNS translációjának és a proteinszintézisnek, ezen keresztül a vírus replikációjának gátlása jön létre. A filogenezis során a vírusok számos védekező mechanizmust építettek ki, melyekkel a különböző antivirális faktorok működését, jelen esetben a proteinkinázt blokkolhatják (4, 5, 9).

A hepatitis C-vírus kb. 9400 nukleotidból álló genomja 3010–3030 aminosavat tartalmazó proteint kódol. Az 1973–2420 aminosavak közé eső részt nevezik „non-structural 5A” (NS5A) fehérjének, melyen belül található a PKR-t kötő terület (aa 2209–2274). Ez a szakasz meg tudja kötni a PKR-t, ezzel felfüggeszti annak működését, és ezáltal szabaddá válik az út a vírus szaporodásához és áttételesen a hepatocytá malignus transzformációjához (1. ábra).

Hazánkban a krónikus C-hepatitises betegek kezelése interferonnal 1992-ben kezdődött meg. Az első években IFN-monoterápiát, majd ennek ribavirinnel történő kombinációját alkalmaztuk. A gyógyszert az első években 6 hónapig, majd 12 hónapig adtuk, heti 9–18 millió IU dózissal. Ennek hatására betegek 13%-a és 22%-a, kombinációs terápiával 36%-a vált csupán tartósan vírusmentessé (polimeráz láncreakció módszerével a beteg a terápia befejezése után 6 hónappal is vírusmentes) (19). Ez a nemzetközi adatokkal összehasonlítva alacsonyabb terápiás hatékonyságot jelentett (23, 26). Ennek lehetséges magyarázatát a HCV hazai szubtypusmegoszlásának meghatározása adta. A magyarországi betegek vírustípus analízisével 1996-ban a HCV 1b 91%-os, újabb eredményeink alapján 91,5%-os előfordulását igazoltuk (10, 13, 18). Ismert, hogy ez a legnehezebben eliminálható vírus szubtypus, és ez magyarázza az alacsony gyógyulási arányt. Továbbra is kérdéses maradt azonban, hogy azonos vírus szubtypuson belül milyen egyéb tényezőktől függ a gyógyultak és a nem reagálók szétválása.

Rövidítések: ALT = alanin-aminotranszferáz; anti-HCV = hepatitis C-vírus ellenanyag; HAI = hisztológiai aktivitási index; HCV = hepatitis C-vírus; HCV 1b-J = hepatitis C-vírus 1b (japán) szubtypusa; IFN = interferon; ISDR = interferonérzékenységet meghatározó régió; NS5A = hepatitis C vírus genom nem strukturális 5A régiója; PCR = polimeráz láncreakció; PKR-BR = RNS-függő proteinkináz kötő régió; RT-PCR = reverz transzkripció polimeráz láncreakció



1. ábra: A hepatitis C-vírus NS5A domén RNS-függő proteinkináz kötő régió működésének elmélete (Gale, M. J. és mtsai, Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 5216.)

A HCV 1b szubtypus előfordulása a japán populációban a magyar adatokhoz hasonlóan igen magas, 73% (3). Japán tudósok évek óta intenzíven kutatják a vírus szerkezete és a terápiás válaszok közötti összefüggést (12, 16, 17). 1995-ben Enomoto N. és munkatársai összehasonlították az interferonra reagáló és az interferonra rezisztens HCV 1b szerkezetét. Az HCV 1b-J (japán típus) vírust alapul véve megállapították, hogy a PKR-BR domén egy szakaszának aminosav-változásokban expresszálódó mutációi döntően befolyásolják az interferonra adott választ. Ezt a területet „interferon sensitivity determining region”-nak (ISDR) nevezték el. E területen megjelenő aminosavcserék száma alapján ún. „wild-type” (0 szubsztitúció), „intermediar-type” (1–3 szubsztitúció) és „mutant-type” (4 vagy több szubsztitúció) víruscsoportokat alakítottak ki, és eszerint vizsgálták a terápiás eredményeket (7).

Statisztikai összefüggést mutattak ki az ISDR fenntípusai és az IFN hatékonysága között. Azóta több japán szerző megerősítette ezt, az európai és amerikai vizsgálatok azonban egy kivétellel nem jutottak hasonló eredményre (15, 20–22, 24, 25, 27). Közép-Kelet-Európában, így Magyarországon sem végeztek eddig hasonló elemzést.

Tanulmány jelent meg a Japánban és a világ többi részén előforduló HCV 1b nukleotidszerkezetének, „quasispecies”-einek különbözőségéről. Meghatározták a nemzetközi GenBank-ban nyilvántartott és a Japánban izolált vírusok szerkezetét. Ennek alapján az 1b szubtypusnak 3 csoportját különítették el: „J” (japán), „NJ” (nem japán) és a „W” (worldwide). Ez adta az alapját annak a tézisnek, hogy ez a különbözőség lehet az oka a japán kutatók által a „J” szubtypusra megállapított szerkezeti és terápiás összefüggés és a nemzetközi eredmények közötti eltérésnek (14).

Jelen munkánkban az általunk kezelt 21 eltérő terápiás választ adó krónikus HCV 1b pozitív betegből izolált vírus NS5A régiójának szerkezeti analízisét végeztük el. A vizsgált genomszakasz azt a kb. 200 aminosavat (aa 2130–2330) kódolja, mely az RNS-függő proteinkináz kötő régiót (aa 2209–2274) is magában foglalja. A PKR-BR két rövidebb szakaszból épül fel, ezek a már említett interferonér-

1. táblázat: Betegeink elemzett adatai

Vizsgált paraméterek	Tartós választ adó betegek	Nem válaszoló betegek
Életkor (év)	34 (24–45)	41 (30–64)
HAI grading score	4 (1–7)	5 (1–8)
HAI staging score	0 (0–0)	2 (0–4)
ALT (IU/ml)	151 (92–530)	94.5 (39–167)
HCV PCR (IU/ml)	403 000 (263 000–902 000)	351 500 (44 000–1 779 000)
IFN összdózis (MU)	468–780	432–936
Ribavirin összdózis (mg)	403 200–436 800	210 000–436 800

(A mediánértékek, zárójelben a tartományok szerepelnek.)

zékenységet meghatározó régió (ISDR aa 2209–2248) és a II. régió. A kapott eredményt összehasonlítottuk a HCV 1b-J megfelelő szakaszának szerkezetével. Egyrészt arra kerestünk választ, hogy a magyarországi betegekből izolált vírusok szerkezete azonos-e a Japánban előforduló vírussal. Másrészt, hogy van-e összefüggés az ISDR aminosav-szubsztitúcióinak száma és az elérő terápiás eredmények között? Lenne-e gyakorlati értéke a nukleotidszekvenca terápia előtti meghatározásnak a klinikumban?

Betegek

A vizsgálatban 21 HCV 1b fertőzött beteg (nő: 13; férfi: 8) szérumát retrospektív módon analizáltuk. Betegeink elemzett adatait az 1. táblázat tartalmazza. Életkoruk 24–64 év között változott (átlag 43,8 év). A krónikus C-hepatitis diagnózisának kritériumai a következők voltak: a szérum alanin-aminotranszferáz (ALT) minimum 6 hónapon át a normálérték felső határának kétszerese legyen; anti-HCV pozitívitás; szérum HCV-RNS kimutathatósága PCR alapú vizsgálattal több, mint 6 hónapon át; májbiopsziával bizonyított hisztológiai aktivitás.

Terápiás protokoll: 11 beteg (nő: 7; férfi: 4) kezelése IFN- α 2a vagy IFN- α 2b monoterápiával (teljes dózis 432–936 millió IU), 10 beteg (nő: 6; férfi: 4) kezelése IFN- α 2a vagy IFN- α 2b (teljes dózis 468–780 millió IU) + ribavirin (teljes dózis: 210 600–438 000 mg) kombinációs terápiával történt 48–52 hétig. Minden beteget követtünk a terápia előtt minimum 6 hónapig és a terápia után legalább 1 évig. A tanulmány protokollja az 1975. évi helsinki megállapodás alapján készült, és a tájékoztatott betegek írásos beleegyezésüket adták.

Analitikai módszerek: A terápiás eredmény alapján a beteget tartósan gyógyultnak (sustained responder) értékeltük, ha az IFN-terápia utánkövetési szakaszában is normális ALT-szintje és negatív HCV-RNS (PCR) eredménye volt. Ellenkező esetben „non responder”-ként definiáltuk.

A virológiai faktorok IFN-érzékenységet előjelző értékének szempontjából analizáltuk az ISDR típusát és a PKR-BR-en belül az aminosav-szubsztitúciók pozícióját és fajtáját. Az ISDR-ben lévő, HCV 1b-J szerkezetéhez viszonyított aminosavcserek száma szerint a betegek kezelés előtti mintáit három csoportba osztottuk. „Vad típusú”-nak (wild-type) definiáltuk, ha nem volt aminosav-változás, intermedier típusúnak (intermediate-type), ha 1–3 helyettesítés volt, és mutáns típusúnak, ha 4 vagy több aminosav-különbséget találtunk. Vizsgáltuk az összefüggést az IFN-terápiával elért eredmény és a különböző paraméterek között is: módosított hisztológiai aktivitási

index (HAI), necroinflammációs grading és a staging score-ok (Ishak és mtsai, 1995), bazális ALT-érték és vírus-titer (11).

Módszerek

Az anti-HCV ellenanyag vizsgálata II. vagy III. generációs enzimmuno-assay (ABBOTT) teszttel történt.

A HCV-RNS mennyiségi vizsgálatát a betegek kezelés előtti szérumából reverz transzkripció polimeráz láncreakció módszerével (RT-PCR), Amplicor HCV Monitor 2.0 (Roche) teszttel végeztük.

A HCV genotipizálás Amplicor HCV (Roche) és Inno-Lipa HCV 2.0 (Innogenetics) PCR és reverz hibridizációs módszerekkel történt.

A HCV PKR-BR nukleotidszekvenciájának vizsgálatát nested RT-PCR termék szekvenálásával, Enomoto N. és mtsai által használt primerekkel végeztük (N. Engl. J. Med., 1996, 334, 77–81).

RNS-extractio: A vizsgálathoz az Amplicor HCV 2.0 teszt megfelelő részét használtuk, de csak 50 μ l HCV Dil-tadtunk minden mintához.

cDNS-szintézis: A szérumpreparátumok reverz transzkripciója 20 μ l reakciókeverékben történt, mely RNS-oldatot, Moloney murine leukaemia vírus reverz transzkriptázt (GIBCO-BRL), RN-áz-inhibitor, random hexamert, dNTP-t, Tris-puffert, KCl-t és MgCl₂-t tartalmazott. A keverékek inkubációja után az NS5A domain amplifikációját nested PCR-technikával végeztük. A primerek szekvenciái az alábbiak voltak:

5' outer forward: 5'TGGATGGAGTGC GGTTGCACAG GTA3' (6703–6727),

3' outer reverse: 5'TCTTTCTCCGTGGAGGTGGTATTG G3' (7296–7320),

5' inner forward: 5'CAGGTACGCTCCGGCGTGCA3' (6722–6741),

3' inner reverse: 5'GGGGCCTTGGTAGGTGGCAA3' (7275–7294).

PCR I.: cDNS-oldat, outer primerek, dNTP, Taq polimeráz, Taq™ és puffer keverékével 40 amplifikációs ciklust végeztünk.

PCR II.: A második körben a fenti összetevők a cDNS helyett az első körből származó oldatot és az inner primereket tartalmazták. Ebben a körben az amplifikációs ciklusok száma 35 volt.

Mindkét amplifikációs ciklus PTC-1™ Programmable Thermo Controller-ben történt.

A PCR terméket 1,5%-os agaróz gél elektroforézissel analizáltuk és GenElute™ agaróz oszlopon tisztítottuk. A tisztított minta mindkét szálát szekvenáltuk Dyerterminater Cycle Sequence kit-tel (Perkin Elmer) 373 DNS-szek-

venátorral. A szekvenanciaanalízist BioEdit programmal végeztük. A PKR-BR nukleotidszekvenencia alapján kapott aminosav-összetételét a HCV1b-J prototípus szerkezetéhez hasonlítottuk.

Genetikai kapcsolatrendszer vizsgálata: Az analizált aminosav-szekvenciák kapcsolatrendszerét Network 2.0 program felhasználásával vizsgáltuk (2).

Statistikai analízis: A minőségi változókat Chi-Square teszttel, a mennyiségi változókat Mann-Whitney U-teszttel analizáltuk SPSS v.10 szoftver felhasználásával. A szignifikanciaszintet 5%-nak választottuk. (A 0,05-nél kisebb p-értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.)

Eredmények

A vizsgált 21 betegünk közül 3 beteg lett tartósan gyógyult (sustained responder), 18 beteg a terápia felfüggesztése után vírus pozitív maradt (non-responder). A monoterápiával kezelt csoportban 1 tartósan reagáló és 10 nem reagáló beteg volt, a kombinációs terápiás csoportban 2 tartósan reagáló és 8 nem reagáló volt. A nemzetközi normáknak megfelelően non-respondernek definiáltuk azokat a betegeket is (6/21), akiknél a kezelés végén normális ALT- és negatív HCV-RNS-értéket találtunk, de az utánkövetési időszakban újra víruspozitívvá váltak („transient responder”). Az életkor és a nemi megoszlás hason-

ló volt a tartósan reagáló és a nem reagáló csoportban. Betegeink PKR-BR aminosavszekvenencia eredményei a 2. ábrán láthatóak.

Vírusszekvenencia eredményeink a nemzetközi NCBI GenBank-ban AF 522299-AF 522320 sorszámmal nyilvántartásba kerültek, és az NCBI honlapján: www.ncbi.nlm.nih.gov alatt megtekinthetőek.

Az összes vizsgált mintát véve az aminosavszubsztitúciók száma 0–7 között váltakozott az ISD régióban, és 3–6 között volt a II. régióban. Az ISDR aminosav-változásainak medián értéke a tartósan reagálóknál 3, a nem reagálóknál 0,5 volt. Bár ez a különbség jelentős, de statisztikailag nem szignifikáns.

Az IFN-rezisztens betegeknél a 2218. aminosavpozícióban az összes eset közel egyharmadában (6/21) hisztidin helyett arginint találtunk. A szubsztitúciónak ezt a típusát egy esetben sem észleltük az IFN-ra reagálóknál. Ez a jelenség megerősíti *Frangoul és munkatársai* korábbi eredményeit, akik összefüggést találtak a non-responder státusz és az arginin jelenléte között a 2218-as pozícióban (8). A PKR-BR II. régiójának domináns szubsztitúciós helyei a 2259. (20/21), 2262. (21/21) és a 2266. (14/21) aminosavak voltak, más pozíciókban lévő aminosav változások aránya nem haladta meg az 50%-ot. A 2259. helyen az esetek 95%-ában leucin helyettesítette az izoleucint (20/21), egy betegnél pedig valin. A 2262-es pozícióban lévő valin helyett minden betegünkönél glutaminsavat (21/21) találtunk, a 2266 pozíció-

aa	2209	2248	2274	
	↓	↓	↓	
	HCV-1b (HCV-J)			
	<u>PSLKATCTTHHDS PDADLI EANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFDPIRAVEDEREISVPAEI</u>			
SR				Mutációk száma
1	-----	-----	-----	↓
2	-----	-----	-----	0+4
3	L---P-----	-----	-----	7+5
				3+4
NR (TR+NR)				
4	-----	-----	-----	0+3
5	-----	-----	-----	1+3
6	-----	-----	-----	0+4
7	-----	-----	-----	1+3
8	-----	-----	-----	0+6
9	-----	-----	-----	1+5
10	-----	-----	-----	1+4
11	-----	-----	-----	0+3
12	-----	-----	-----	1+4
13	-----	-----	-----	1+4
14	-----	-----	-----	0+4
15	-----	-----	-----	2+4
16	-----	-----	-----	0+4
17	-----	-----	-----	0+5
18	-----	-----	-----	0+3
19	-----	-----	-----	0+3
20	-----	-----	-----	1+4
21	-----	-----	-----	1+3

2. ábra: Krónikus C-hepatitiszes betegeink IFN-terápia előtti mintáinak HCV1b PKR-BR aminosav-szekvenencia eredményei

ziciókban arra enged következtetni, hogy ezek nem véletlenszerű mutációk, hanem a HCV 1b prototípusa különbözik a HCV 1b-J-től hazánkban. Az analízis minták alapján a PKR-BR leggyakoribb aminosav-szekvenciája Magyarországon a következő:

PSLKATCTTHHDSFDPLRAEEDEGEISVPAEI.

Ennek ismeretében a nemzetközi kutatási eredmények hazai adaptálásánál figyelemmel kell lenni az eltérő magyar HCV 1b „quasispecies”-ből esetlegesen fakadó különbségekre.

A „sustained responder” betegek alacsony száma korlátozza a tanulmány statisztikai erejét, mely magyarázatot ad az ISDR aminosav-szubsztitúciók teljes számában talált nem szignifikáns különbségekre. A kis elemszám azonban természetes következménye annak, hogy hazánkban kevés a tartósan reagáló, krónikus HCV 1b-fertőzésből véglegesen meggyógyult beteg. A vizsgált betegek számát esetünkben tovább csökkentette az alkalmassági szelektálás.

Elővigyázatossággal kell kezelni azoknak a betegeknek a besorolását is, akik kezdetben reagáltak az IFN-ra (normális ALT-szint és negatív HCV-RNS PCR), de pozitívvá váltak az utánkövetési periódusban (6/21). Vitatható az a nemzetközileg alkalmazott, Enomoto és munkatársai által bevezetett besorolás, mely szerint ezen a tranziens responder betegeket a non-responder csoportba soroljuk. Különböző tudományos elméletek vannak az átmeneti reagálás mechanizmusára, de egyiket sem sikerült még hitelesen bizonyítani. A betegek pontosabb csoportosítása érdekében a tranziens responder betegek kezelés utáni szérummintáit a későbbiekben tovább kellene vizsgálni.

Köszönetnyilvánítás: G. J. köszönetet mond Dr. Raskó István professzor úrnak a MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézet igazgatójának szakmai tanácsaiért és az Intézetében végzett munkája támogatásáért.

Kiemelt köszönet illeti asszisztensnőit, Papp Istvánnét és Szabóné Bartha Katalint, valamint a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézet asszisztensnőjét, Radóné Dudás Máriát technikai segítségükért.

IRODALOM: 1. Alberti, A., Benvegnú, L., Boccatto, S. és mtsai: Management of HCV related liver disease. Prevention and Intervention in Liver Disease. Szerk.: Shouval, D. A Joint Postgraduate Course of the European and International Associations for the Study of the Liver. Madrid, Spain, 2002, 140-150. old. – 2. Brandt, H. J., Forster, P., Rohl, A.: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 1999, 16, 37-48. – 3. Brechot, C.: Hepatitis C Virus. *Molecular Biology and Genetic Variability*. *Digest Dis. Sci.*, 1996, 41 (Suppl.), 6S-21S. – 4. Brechot, C.: The direct interplay between HCV NS5A protein and infection transduction signal: from clinical to basic science. *J. Hepatol.*, 1999, 30, 1152-1154. – 5. Dianzani, F.: The Interferon system: definition and types. *The Interferon System*. Helth Sciences Press, English Edition., 1993, 7-40. old. – 6. Enomoto, N., Takada, A., Nakao, T. és mtsai: There are two major types of hepatitis C virus in Ja-

pan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 170, 1021-1025. 7. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y. és mtsai: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N. Engl. J. Med.*, 1996, 334, 77-81. – 8. Frangeul, L., Cresta, P., Perrin, M. és mtsai: Mutations in NS5A region of hepatitis C virus genome correlate with presence of NS5A antibodies and response to interferon therapy for most common European hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 1998, 28, 1674-1679. – 9. Gale, M. J., Korth, M. J., Tang, N. M. és mtsai: Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, 1997, 230, 217-227. – 10. Gervain J., Simon G. jr., Papp I. és mtsai: A magyarországi krónikus „C” vírushepatitises betegek vírus-típus- és szub-típus-meghatározása. *Orv. Hetil.*, 2001, 142, 1315-1319. – 11. Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L. és mtsai: Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.*, 1995, 22, 696-699. – 12. Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y. és mtsai: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 9524-9528. – 13. McOmish, F., Yap, P. L., Dow, B. C. és mtsai: Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, 32, 884-892. – 14. Nakano, I., Fukuda, Y., Katano, Y. és mtsai: Why is the interferon sensitivity-determining region (ISDR) system useful in Japan? *J. Hepatol.*, 1999, 30, 1014-1022. – 15. Noursbaum, J. B., Polyak, S. J., Ray, S. C. és mtsai: Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J. Virol.*, 2000, 74, 9028-9038. – 16. Okamoto, H., Kurai, K., Okada, S. I. és mtsai: Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*, 1992, 188, 331-341. – 17. Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y. és mtsai: Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J. Gen. Virol.*, 1991, 72, 2697-2704. – 18. Pár, A., Gervain, J., Gógl, A.: Hepatitis C virus infection: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1998, 33, 104-114. – 19. Pár, A., Telegdy, L., Dalmi, L. és mtsai: Therapy for chronic hepatitis C. *J. Physiology-Paris*, 2001, 95, 399-405. – 20. Rispeter, K., Lu, M., Zibert, A. és mtsai: The „interferon sensitivity determining region” of hepatitis C virus is a stable sequence element. *J. Hepatol.*, 1998, 29, 352-361. – 21. Sarrazin, C., Berg, T., Lee, J. H. és mtsai: Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J. Hepatol.*, 1999, 30, 1004-1013. – 22. Squadrito, G., Orlando, M. E., Cacciola, I. és mtsai: Long-term response to interferon alpha is unrelated to „interferon sensitivity determining region” variability in patients with chronic hepatitis C virus-1b infection. *J. Hepatol.*, 1999, 30, 1023-1027. – 23. Trépo, C., Pradat, P.: Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J. Hepatol.*, 1999, 31 (Suppl. 1), 80-83. – 24. Zeuzem, S., Lee, J. H., Roth, W. K.: Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology*, 1997, 25, 740-744. – 25. Watanabe, H., Enomoto, N., Nagayama, K. és mtsai: Number and position of mutations in the interferon (IFN) sensitivity-determining region of the gene for nonstructural protein 5A correlate with IFN efficacy in hepatitis C virus genotype 1b infection. *J. Infect. Diseases*, 2001, 183, 1195-1203. – 26. Weiland, O.: Treatment of naive patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, 1999, 31 (Suppl. 1), 168-173. – 27. Withere, G. W., Beineke, P.: Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J. Med. Virol.*, 2001, 63, 8-16.

(Gervain Judit dr., Székesfehérvár, Seregélyesi u. 3–5. 8000 e-mail: jgervain@mail.fmkorhaz.hu)

„Szeresd azokat, akik keresik az igazságot, de ne higgy azoknak, akik azt hirdetik, hogy megtalálták!”

Bródy