

Znaczenie wirusów hepatotropowych w rozwoju raka wątroby

- od patogenezy po możliwości i wyzwania diagnostyki
laboratoryjnej

Beata Kasztelewicz,
Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Instytut „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”

Wirusy hepatotropowe a nowotworzenie

Skala problemu

Research Article
Hepatic and Biliary Cancer

JOURNAL
OF HEPATOLOGY

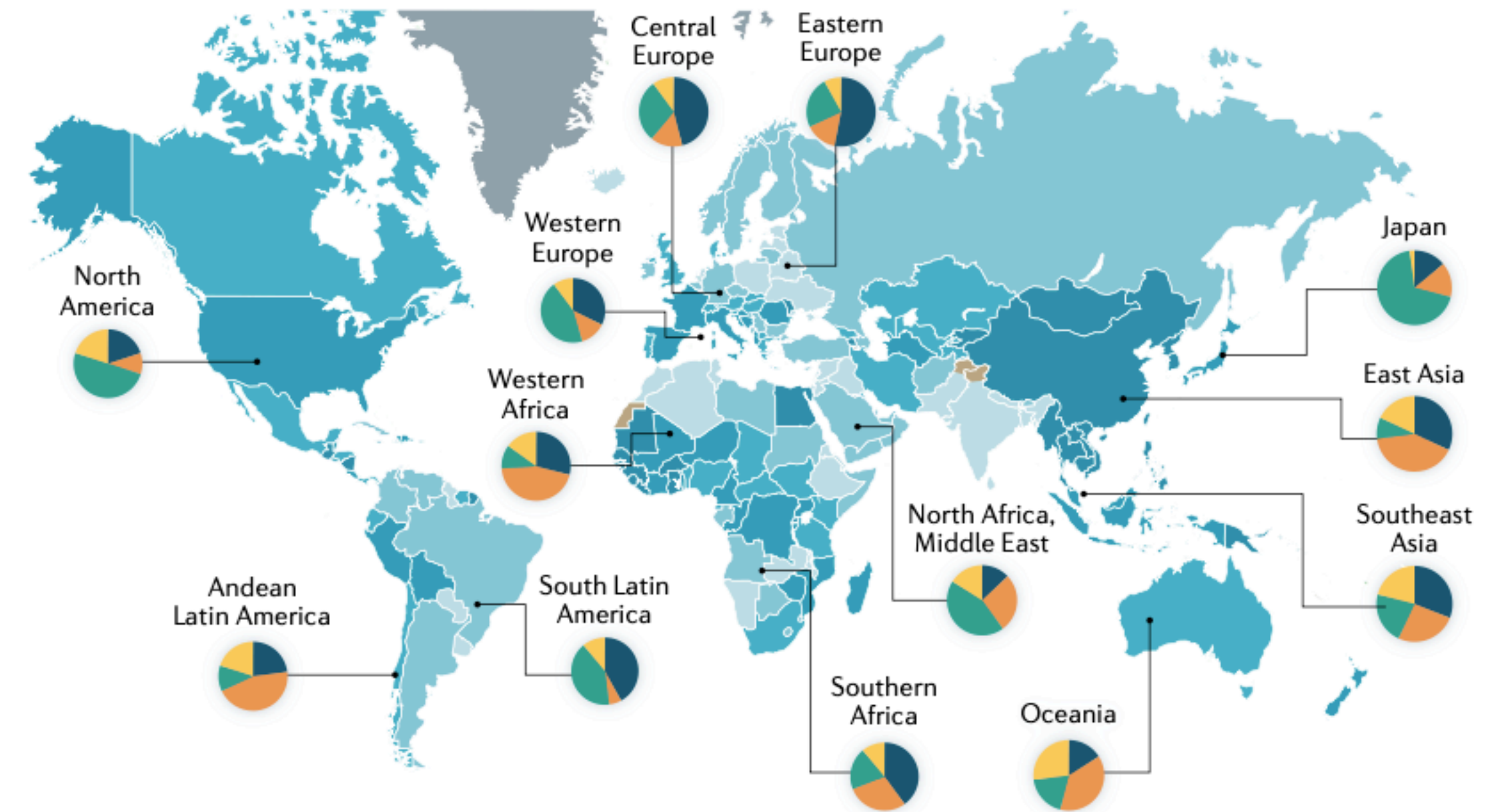
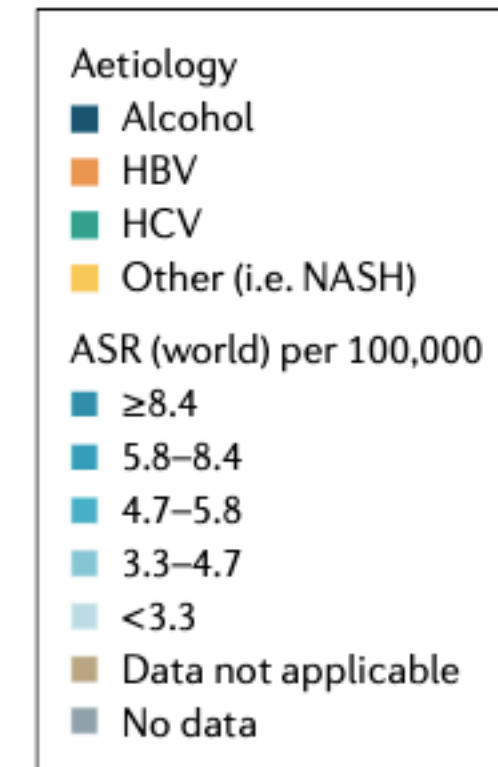
Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040

- 905 700 osób zdiagnozowano, a 830 200 osób zmarło z powodu pierwotnego raka wątroby w 2020 roku (IARC/WHO)
- rak wątroby znajdował się wśród **3 głównych przyczyn zgonów** z powodu nowotworów w 46 krajach
- liczba nowych przypadków i zgonów z powodu raka wątroby może wzrosnąć o **ponad 55%** do 2040 roku
- rak wątrobowo-komórkowy (HCC, *hepatocellular carcinoma*) - **90%** przypadków
- przewlekłe zakażenie **HBV, HCV i HDV** w istotny sposób przyczynia się do rozwoju HCC

HCC

Epidemiologia

- wskaźniki światowe HCV i HBV odpowiadają za **71 %** przypadków HCC (czynniki modyfikowalne!)
- HBV jest szczególnie istotnym czynnikiem etiologicznym w Azji Wschodniej i Afryce Subsaharyjskiej, gdzie zakażenie wirusem jest endemiczne
- HCV jest głównym czynnikiem etiologicznym HCC w krajach rozwiniętych, w tym w Europie i Ameryce Północnej



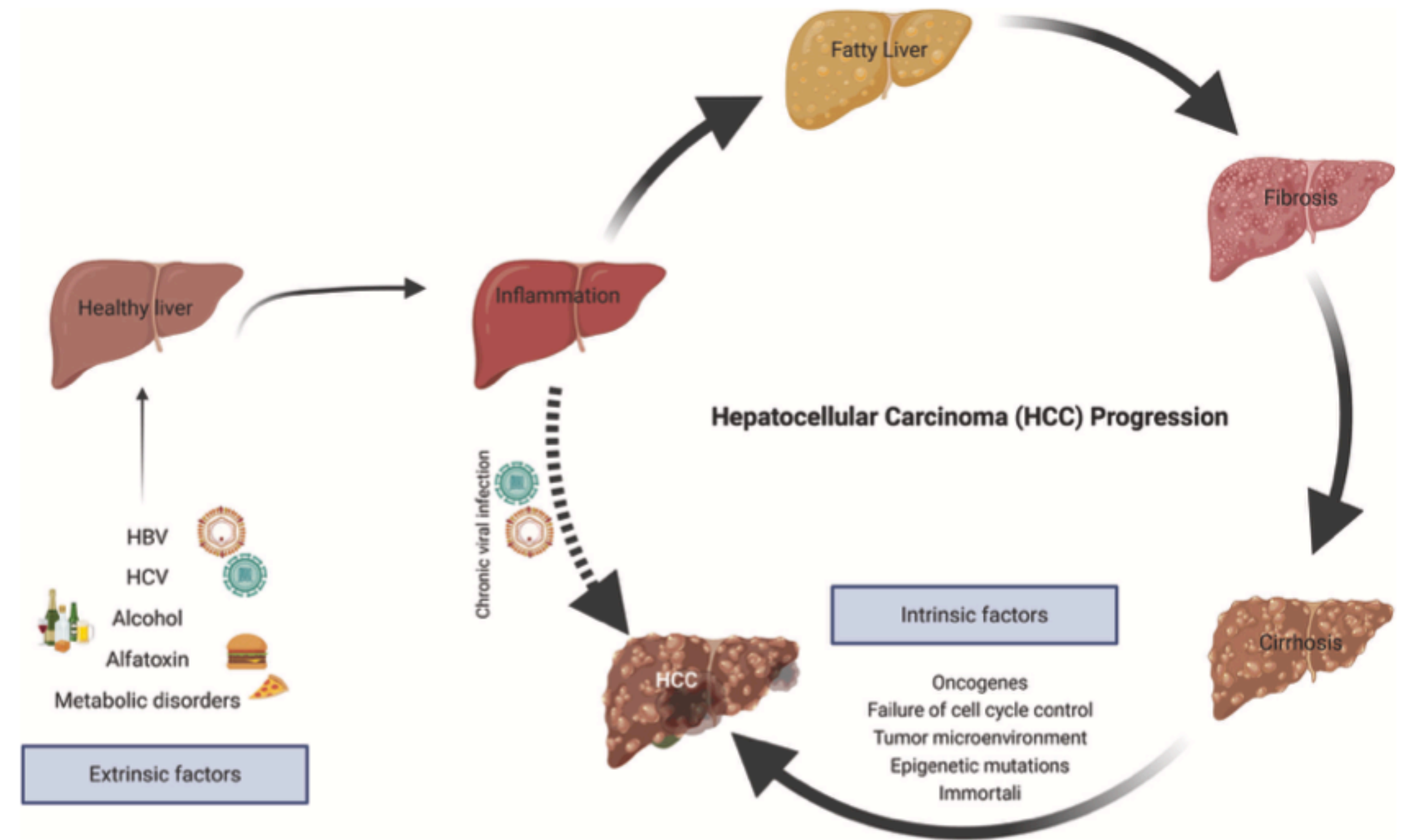
Inne czynniki HCC:

- toksyny (EtOH, aflatoksyna B1)
- zaburzenia metaboliczne (otyłość, cukrzyca, NASH)
- AIH..

HCC

Etiologia

- niezależnie od czynnika etiologicznego, rozwój raka wątrobowokomórkowego (HCC) może zachodzić w wyniku zwiększonej wymiany hepatocytów wywołanej **przewlekłym uszkodzeniem wątroby** i **procesami regeneracyjnymi**.
- ciągły stan zapalny i stres oksydacyjny sprzyjają gromadzeniu się zmian genetycznych w hepatocytach
- w rezultacie istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju HCC jest **istniejąca wcześniej marskość wątroby**



Schematic representation of multi-stage HCC development from common etiological factors.

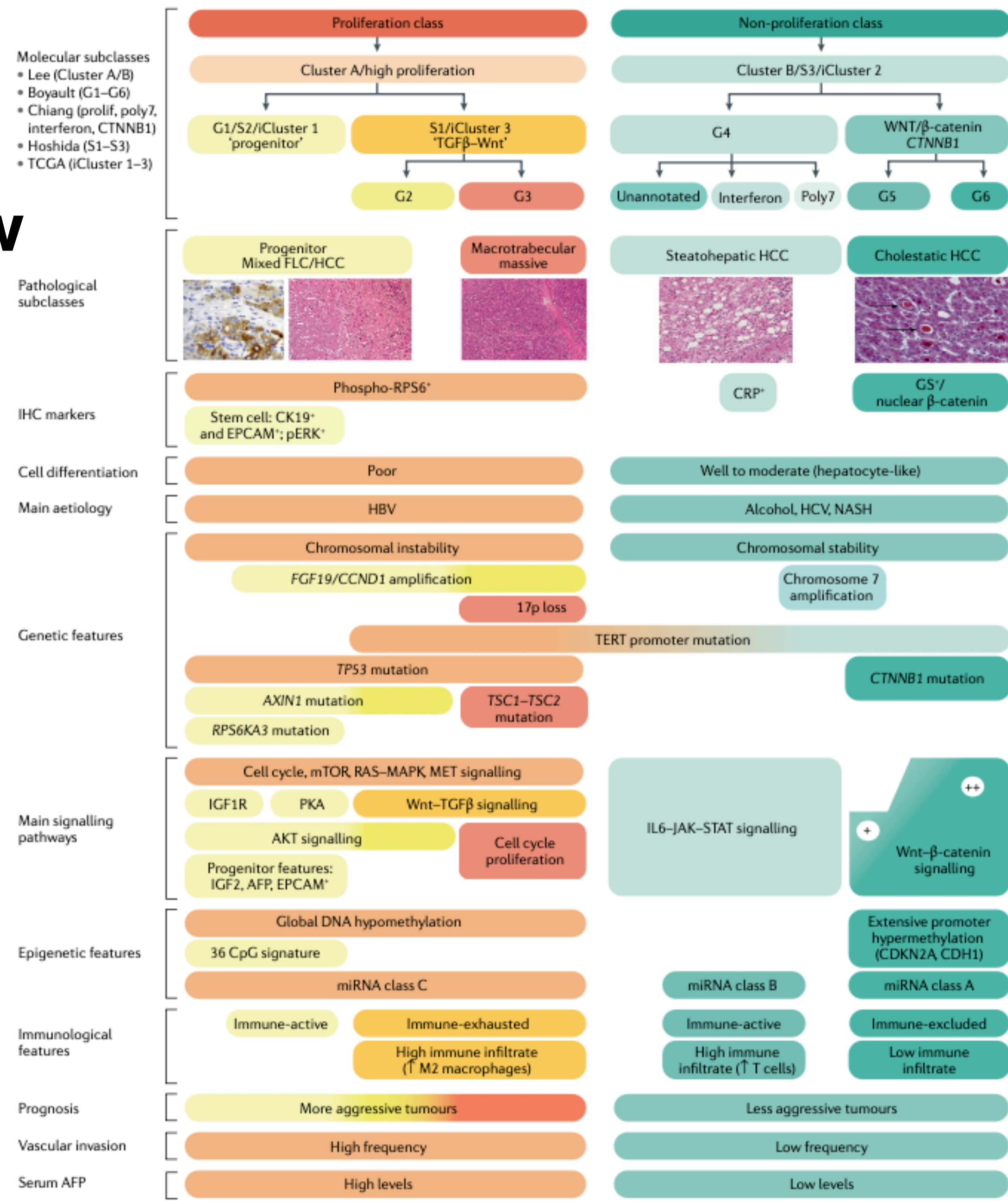
~20% HBV-related HCC - bez obecności przebudowy marskiej (bezpośrednie działanie onkogenne)

HCC

Heterogena grupa nowotworów

HCC charakteryzuje się **wysoką różnorodnością** genetyczną i molekularną badania transkryptomu w HCC doprowadziły do wyodrębnienia grup HCC różniących się pod względem genetycznym i klinicznym

- klasa proliferacyjna (HBV) - nasilenie sygnałów proliferacyjnych
- klasa nieproliferacyjna (HCV, alkohol, NASH) - cechy molekularne przypominające „normalne” hepatocyty

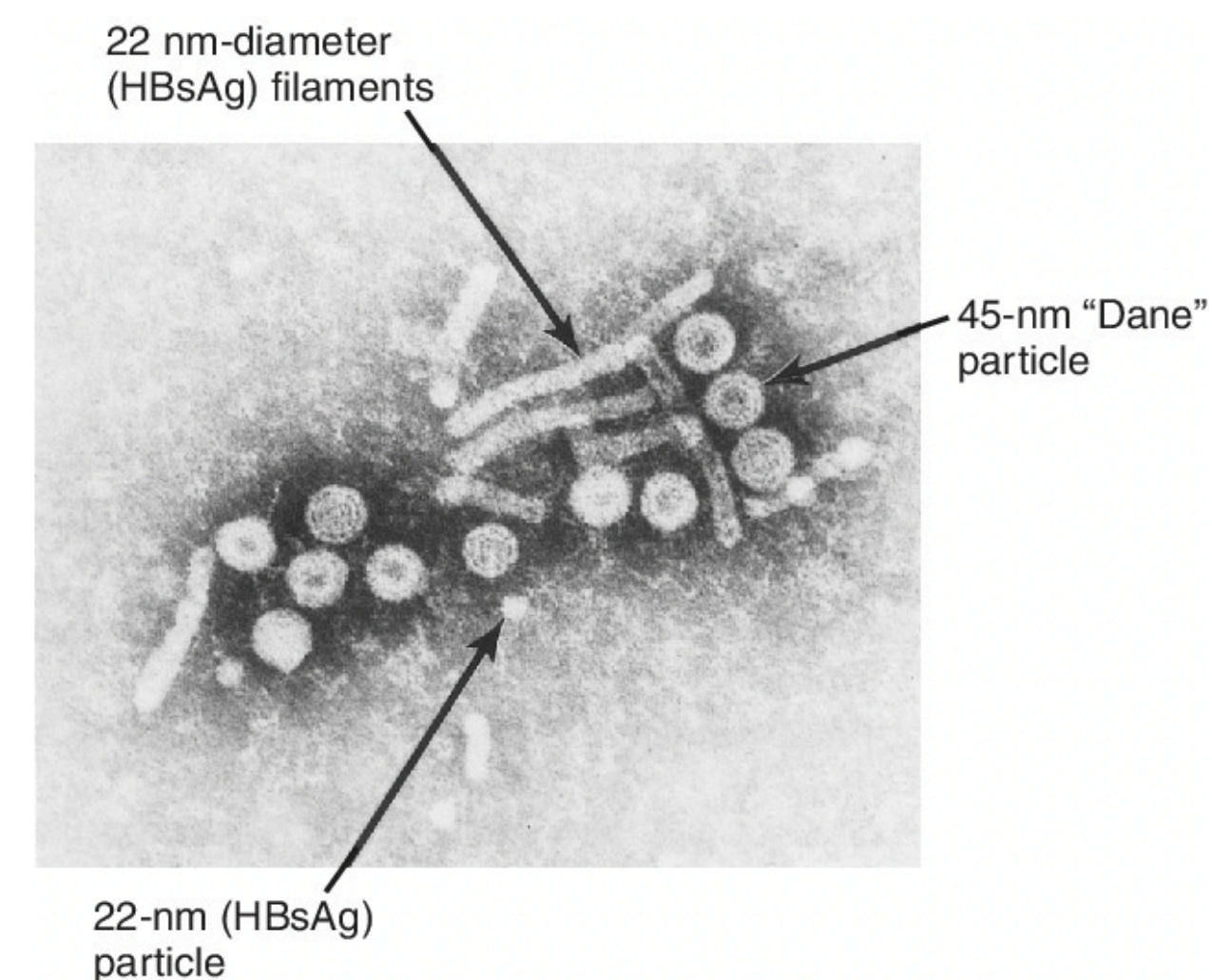
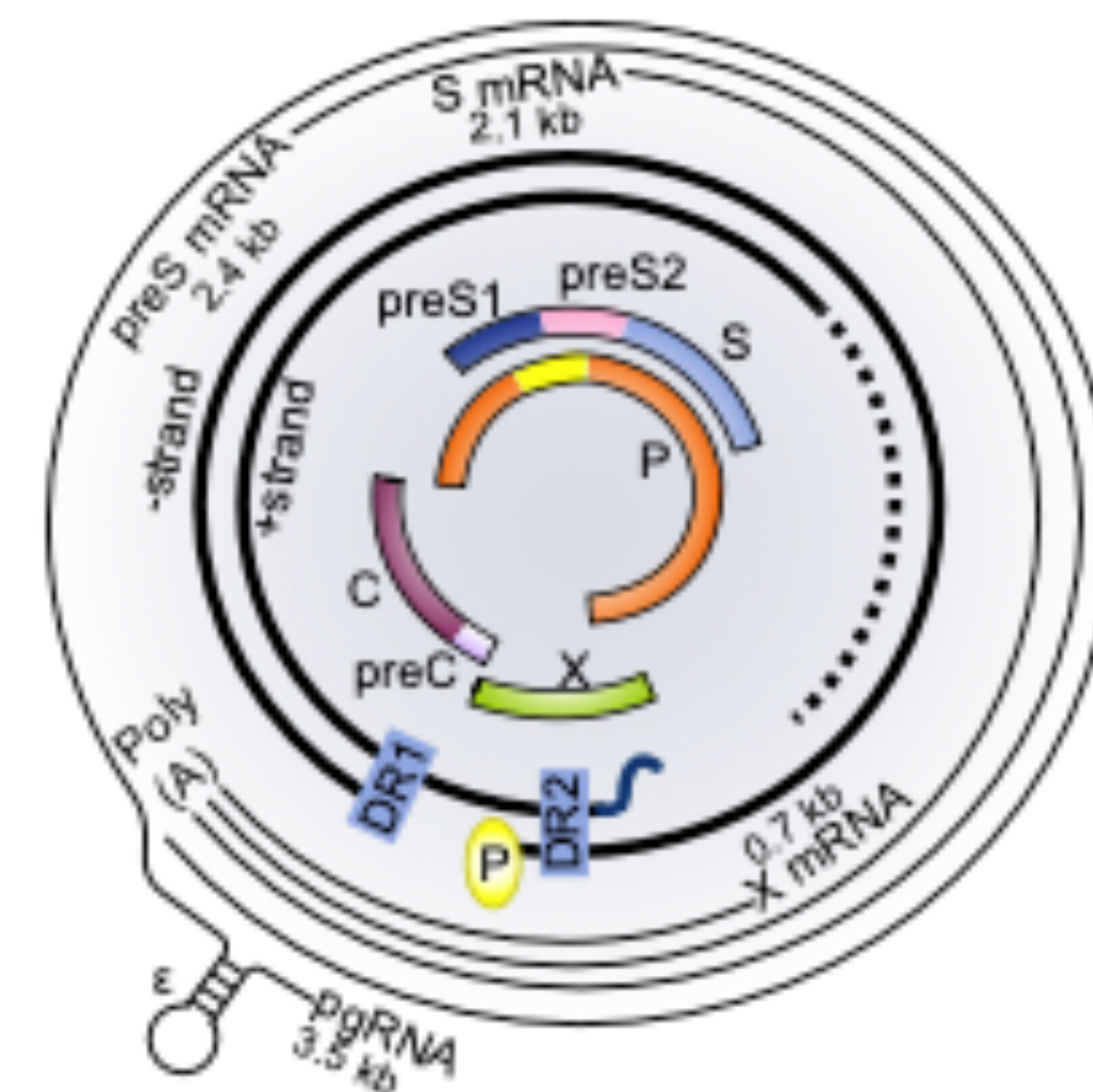
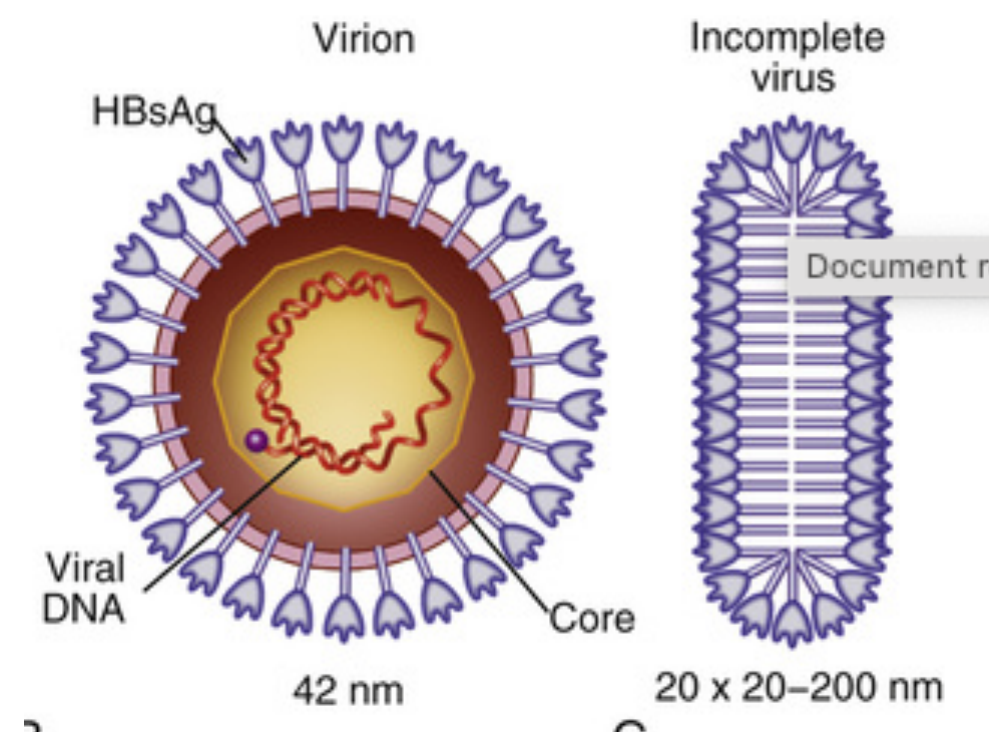


HBV hepatitis B virus

- Hepadnaviridae
- częściowo dwuniciowy DNA
- 4 geny preS/S, preC/C, P, X (aktywator transkrypcji genów wirusa i onkogenów)
- replikacja z udziałem formy pośredniej RNA

niezakaźne cząstki sferyczne i tubularne (HBsAg) : wirion
>1000 : 1

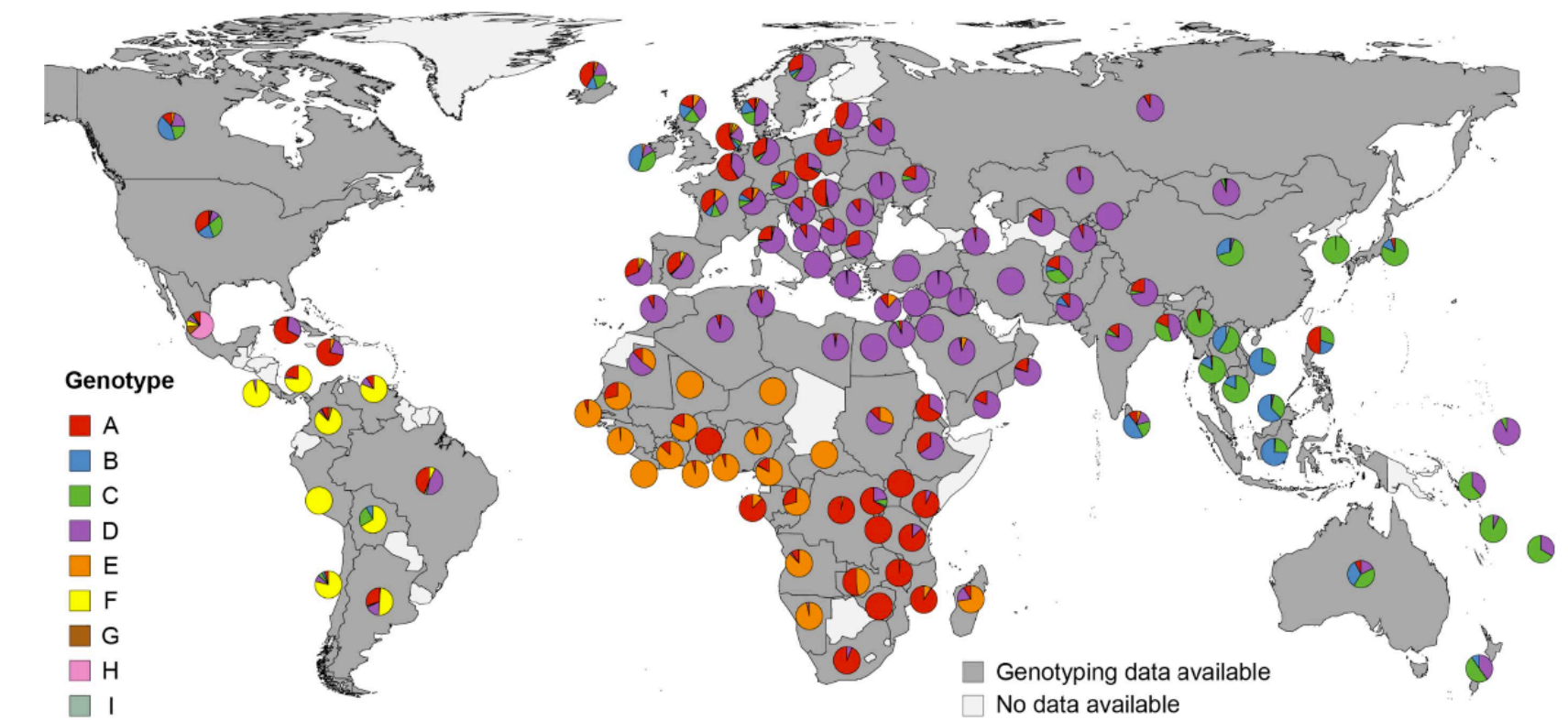
kompleks białka rdzeniowego (HBcAg-HBeAg-p22)



HBV

Zmienność wirusa

- **10 genotypów A-J, (24 podtypy)** - w EU A i D, w PL ~ 80% A
- wpływ genotypu na obraz kliniczny (serokonwersja HBe, HBs), mutacje w regionie core/pre-core, odpowiedź na leczenie, związek z HCC (**C** > B > F > D > A; D'souza 2020)
- pacjent może być zakażony więcej niż jednym genotypem (np. G i A), może dochodzić do rekombinacji, zmiany dominującego genotypu wskutek selekcji (np. w trakcie leczenia)
- częstość mutacji 2×10^4 base substitutions/site/year
- mutanty HBV - najczęściej w regionie rdzeniowym i przedrdzeniowym (**warianty-pre-core/core**) - np. G1896A, u pt z HBeAg(-) z przewłąłą wiremią i aktywnym zapaleniem wątroby; warianty promotora core (A1762T, G1764A) - redukują ekspresję HBeAg ale zwiększają poziom replikacji DNA, do selekcji tych mutantów dochodzi we wczesnej fazie (presja immunologiczna), charakteryzują się ciężkim przebiegiem zakażenia i ryzykiem HCC
- warianty z delecją w pre-S - niezależny czynnik ryzyka HCC (OR 3.7, wyższy u pacjentów z genotypem C vs B)
- mutanty wpływają na ciężkość zakażenia, poprzez wpływ na poziom replikacji HBV lub ekspresje epitopów



HBV

Przebieg wirusowego zapalenia wątroby

- HBV nie wykazuje bezpośredniej cytotoksyczności, uszkodzenia hepatocytów - efekt odpowiedzi immunologicznej (cytotoksyczność limf. T)
- CD8+ miecz obusieczny: kontrola zakażenia i uszkodzenie hepatocytów
- odpowiedź immunologiczna u części chorych jest wystarczająca do kontroli zakażenia (zakażenie ostre) - 95% dorosłych
- u 5% (dorosłych) dochodzi do postępu choroby - zakażenie przewlekłe
- przebieg zakażenia przewlekłego - wypadkowa **zmienności wirusa i skuteczności odpowiedzi immunologicznej** -fazowość zakażenia przewlekłego
- presja ze strony układu immunologicznego (odpowiedź typu komórkowego i humoralna) przyczynia się do powstawanie „quasispecies”, selekcji mutantów HBV, w tym tych pozbawionych zdolności ekspresji HBeAg, HBsAg, dochodzi do zmiany epitopów antygenów rdzeniowych lub powierzchniowych

ryzyko HCC

ryzyko HCC

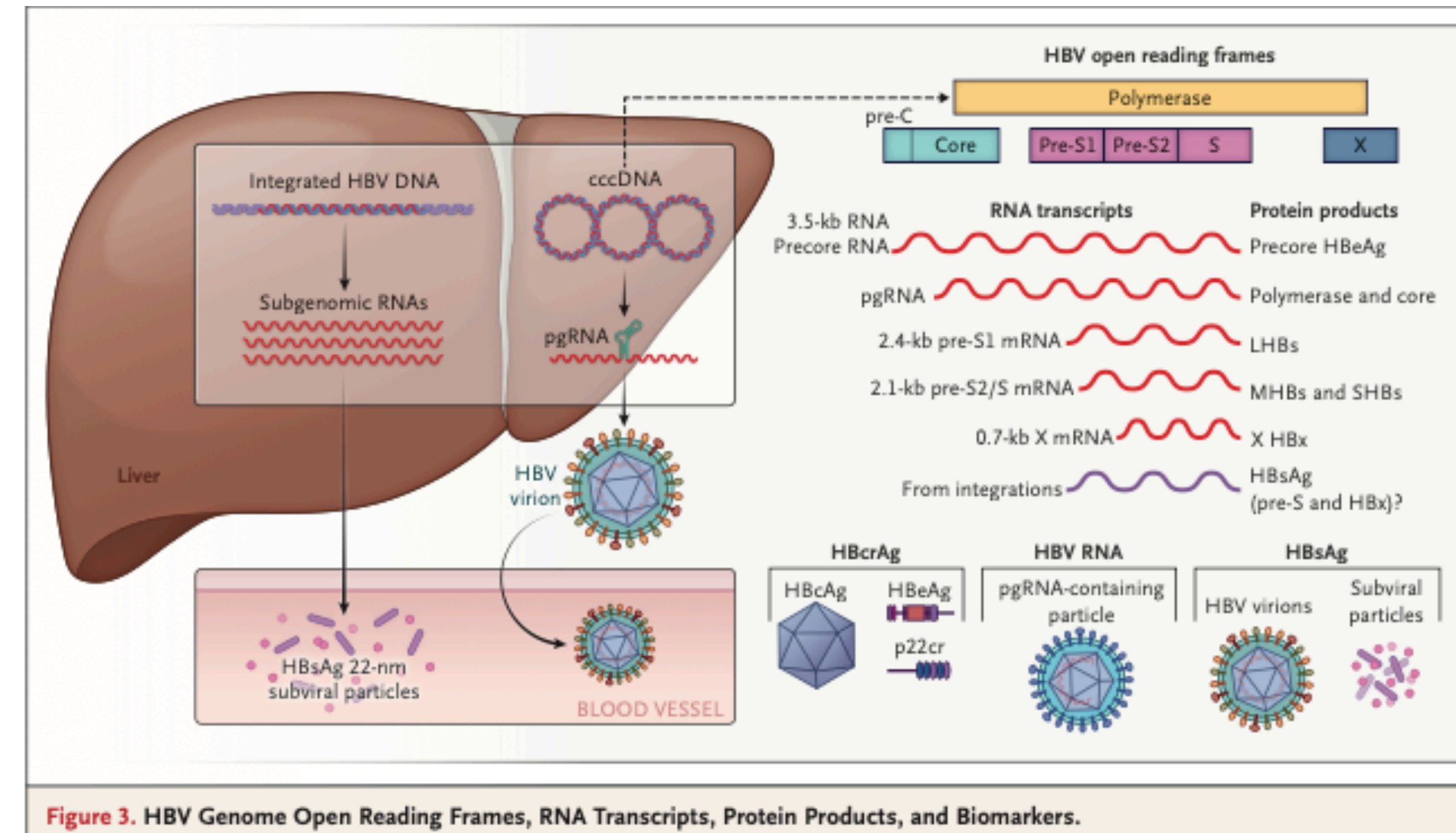
	HBeAg-positive		HBeAg-negative	
	1 Chronic infection	2 Chronic hepatitis	3 Chronic infection	4 Chronic hepatitis
HBV DNA	>10 ⁷ IU/mL	10 ⁴ -10 ⁷ IU/mL	<2,000 IU/mL*	>2,000 IU/mL
ALT	Normal	Elevated	Normal	Elevated [#]
HBeAg	+	-	+	-
HBsAg	+++	+++/**	+	**
Liver disease	None/minimal	Moderate/severe	None/minimal	Moderate/severe
Time frame (years)	≤20	20	40	60

*HBV DNA levels can be between 2,000 and 20,000 IU/mL in some patients without signs of chronic hepatitis; [#]Persistently or intermittently

HBV

eliminacja zakażenia nie jest możliwa

- ~90% cccDNA (covalently closed circular DNA) struktura o dużej oporności na działanie leków p/wirusowych, odpowiada za nawroty zakażenia
- integracja fragmentu wirusowego DNA z genomem hepatocytu (~10% dsDNA) - defekt replikacji, nie powstaje pregenomowy RNA (pgRNA)
- do integracji dochodzi już na wczesnym etapie zakażenia, liczba „integracji” wzrasta w raz z czasem trwania zakażenia,
- u pt z CHB śr. 1 kopia HBV DNA/genom



HBV

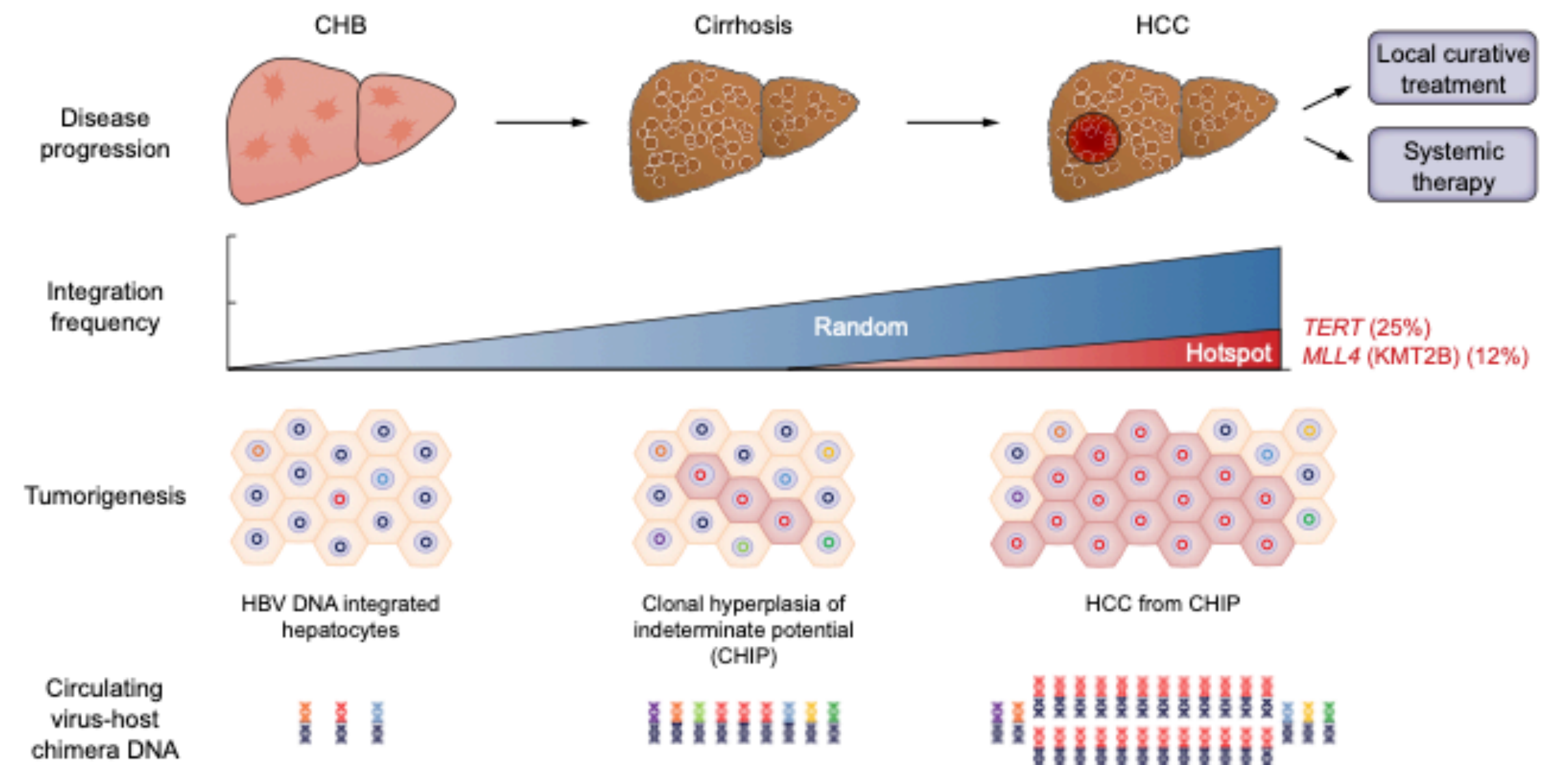
Konsekwencje integracji HBV DNA do genomu hepatocytu

- zintegrowany HBV DNA jest źródłem subgenomowych transkryptów kodujących Large HBs, Medium HBs, Small HBs i **HBx**
- sprzyja przetrwaniu HBV - nadmiarowa produkcja HBsAg -> wycieńczenie limfocytów T i B
- rola w przewlekłym zapaleniu wątroby typu D - (HDV może przetrwać w komórkach w których brakuje cccDNA HBV)

HBV

HBV DNA integracja komórki nienowotorowe vs HCC

- udział w klonalnej ekspansji i hiperplazji
- liczba hepatocytów z zintegrowanym HBV DNA
 - 0.1% zakażenie ostre
 - 5- 50% CHB lub marskości
 - **90% HCC**
- w CHB przypadkowe miejsca integracji
- W HCC hotspots:
 - promotor genu telomerazy (TERT) (25%), egzony genu metylotransferazy lizynowej KMT2B (12%),

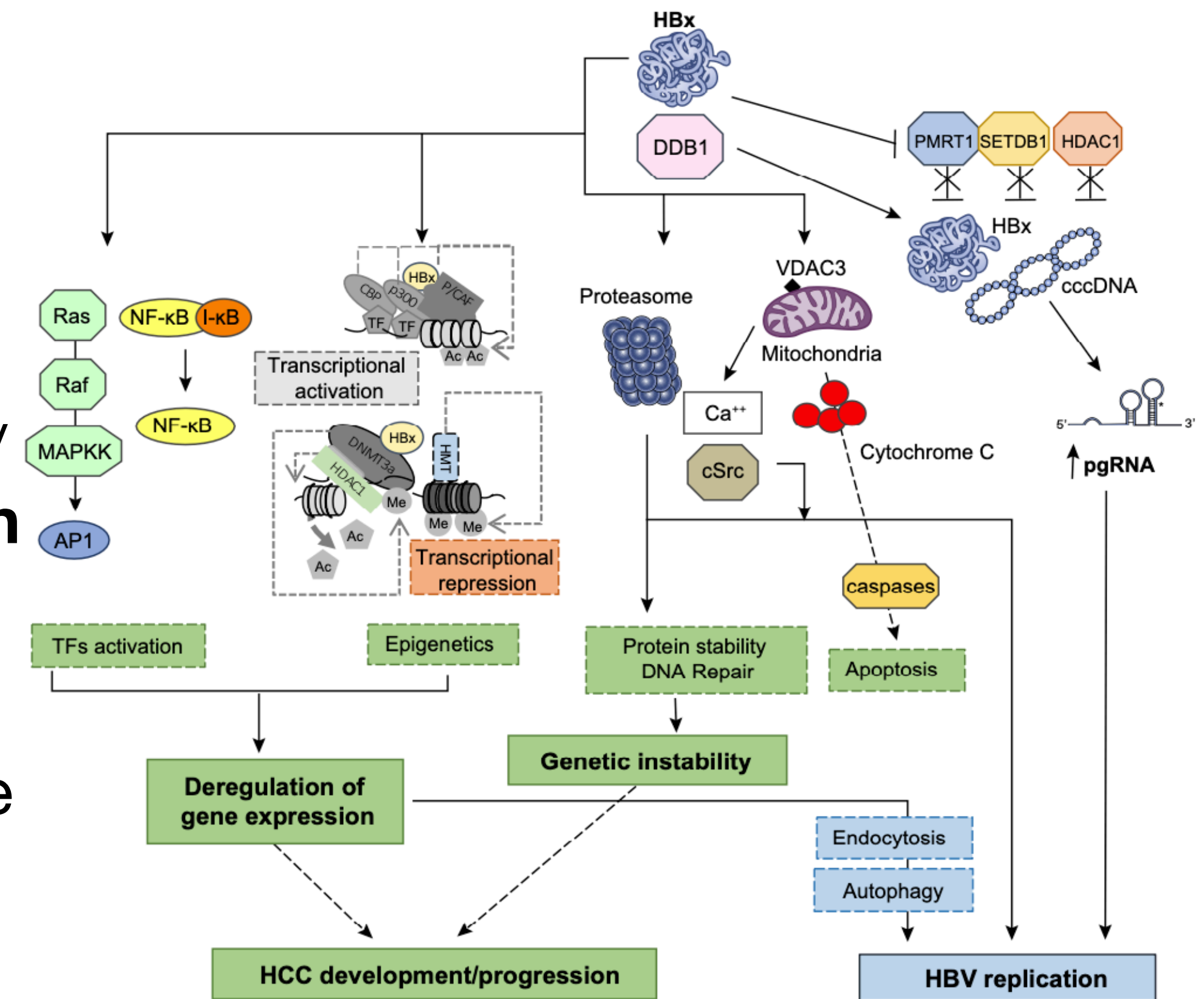


HBV i HCC

Inne mechanizmy onkogenezy

HBx

- **zakłócanie szlaków sygnalizacyjnych** komórki: aktywacja szlaków sygnalizacyjnych związanych z proliferacją i przeżyciem komórek (TGF- β , cyclin D, Ras/Raf/MAPK), **inaktywacja supresorów nowotworowych** (p53 - regulatora apoptozy, cyklu komórkowego i procesów naprawy DNA)
- zakłócanie potencjału błony mitochondriów, zwiększenie stężenia Ca²⁺, **indukcja stresu oksydacyjnego** (produkcja ROS)
- indukowanie modyfikacji epigenetycznych (metylacja DNA, acetylacja histonów i regulacja ekspresji mikroRNA)



HBV

„Stare” markery i ryzyko HCC

- HBsAg testy serologiczne nie rozróżniają HBsAg pochodzącego z wirionów i cząstek defektywnych, cccDNA HBV czy zintegrowanego HBV DNA
- **HBV DNA** - marker replikacji HBV (identyfikacja fazy zakażenia, wskazanie do leczenia, i ocena odpowiedzi na leczenie)
- HBcAg indukuje odpowiedź komórek B i T, **anty-HBc** potwierdzają ekspozycję na HBV
- **HBeAg** białko sekrecyjne, jego obecność wskazuje wysoki poziom replikacji ALE niekoniecznie koreluje z poziomem HBV DNA ! (jego ekspresja podlega regulacji na etapie transkrypcji, translacji i posttranslacyjnym)
- **ilościowe HBsAg:**
 - niski poziom HBV DNA (<2000 IU/mL) plus niski poziom HBsAg (<1000 IU/mL, ALT (N) = nieaktywny nosiciel;
 - HBeAg(-) pt z niskim HBV DNA i HBsAg >1000 IU/mL - **14-krotnie** wyższe ryzyko HCC
 - **cut-off 3 log IU/mL**- prognozowanie nawrotu HCC po resekcji guza

HBV

„Nowe” markery zakażenia HBV

- **HBV RNA**

- poziom w surowicy silnie koreluje z zawartością pgRNA oraz cccDNA w tkance wątroby
- korelacja ze stanem zapalnym w tkance wątroby i włóknieniem (Wang J, 2018)

- **HBcrAg** -antygen związany z HBc - (jednoczasowe oznaczenie 3 antygenów HBcAg, p22 i HBeAg) - odzwierciedla aktywność cccDNA (u pt HBeAg+) oraz aktywność replikacyjną (u pt HBeAg-)

- poziom HBcrAg $> 2,9 \log IU/mL$ = **5-krotnie wyższe ryzyko HCC** u pt HBeAg(-) - potrzeba monitorowania pt

HBV zakażenie przewlekłe

Fazy zakażenia, markery

REVIEW ARTICLE

Dan L. Longo, M.D., Editor

New Approaches to Chronic Hepatitis B

Geoffrey Dusheiko, M.D., Kosh Agarwal, M.D., and Mala K. Maini, M.D., Ph.D.

Table 1. Phases of Hepatitis B Virus (HBV) Infection, Nomenclature, and Biomarkers.*

Variable	Phase					
	HBeAg-Positive Chronic HBV Infection	HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B	HBeAg-Negative Chronic HBV Infection	HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B	“Gray Zone”	Occult Hepatitis B
Other phase names	Immune tolerant	Immune (re)active	Inactive carrier state	HBeAg-negative disease	Indeterminate	None
Serologic testing						
HBsAg	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative
Quantitative HBsAg (log ₁₀ IU/ml)†	3.5–4.5	3.5–4.5	2.5–3.5	2–3	2–3	Negative
HBeAg	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative
HBe antibodies	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	May be positive
HBV DNA (IU/ml)	Typically >10 ⁷	Typically >10 ⁵ to 10 ⁷	<10 ³	Typically >10 ³ to ≤10 ⁵	2 × 10 ³ (3.3 log ₁₀) to 2 × 10 ⁴ (4.3 log ₁₀)	Low, at detection limit
Alanine aminotransferase	Near ULN	Elevated	Near ULN	Elevated	Fluctuates near ULN	Near ULN
Histologic features on liver biopsy	Minimal necroinflammation or fibrosis	Moderate-to-severe necroinflammation and varying degrees of fibrosis	Minimal necroinflammation and fibrosis	Moderate-to-severe necroinflammation or fibrosis	Minimal or low necroinflammation	Usually minimal or low necroinflammation; fibrosis can be present
cccDNA (assumed copy no./cell)‡	Relatively high	Relatively high	Relatively low, or transcriptional activity	Relatively low, or transcriptional activity	Relatively low, or transcriptional activity	Data uncertain
Integrated HBV DNA§	Present	Present	Present and accounts for majority of HBsAg	Present and accounts for majority of HBsAg	Present	Present
HBcrAg level	High	High	Low or undetected	Lower than HBeAg-positive states	May be detected	Data not available
HBV RNA level	High	High	Low or undetected	Lower than HBeAg-positive states	May be detected	Data not available

* The abbreviation cccDNA denotes covalently closed circular DNA, HBcrAg HBV core-related antigen, HBeAg hepatitis B e antigen, HBsAg hepatitis B surface antigen, and ULN upper limit of the normal range.

† Quantitative HBsAg levels are derived from baseline data in clinical trials of small interfering RNA. Ranges can vary significantly in HBeAg-negative patients, depending on the HBV genotype and HBsAg expression.

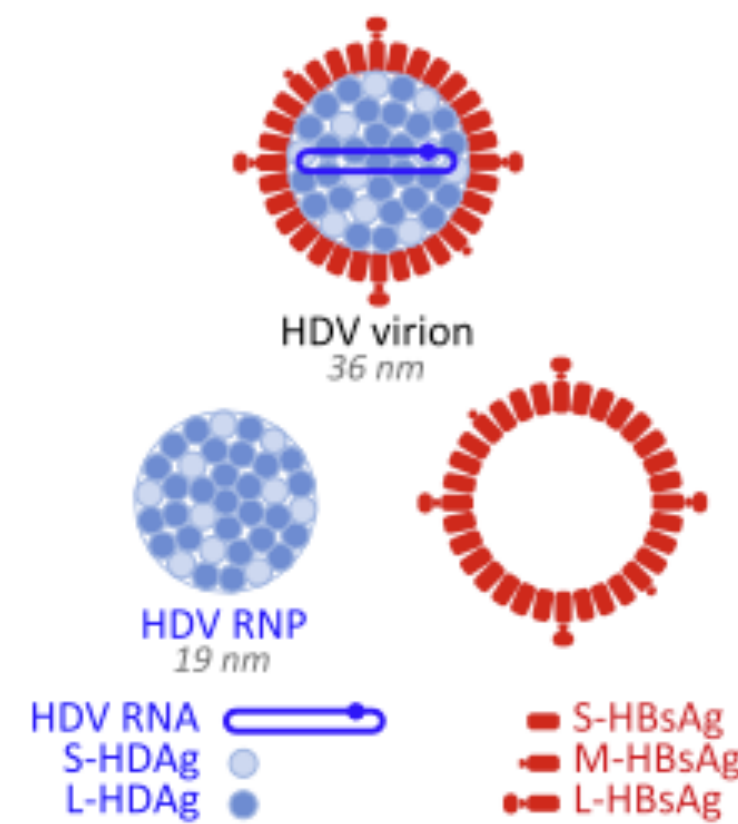
‡ The low number of infected cells in some HBeAg-negative patients, the low cccDNA copy number (1 to 10 per infected cell), and the lack of standards for quantitation allow only a qualitative assumption of cccDNA copy number.

§ The presence of integrated HBV DNA is usually assumed.

HBV inne markery HCC

- **AFP (alfa-fetoproteina)** - cut-off >20 ng/mL czułość diagnostyczna 39-89%, zależy od wielkości guza (>5 cm), swoistość niska - AFP podwyższone w wielu chorobach wątroby o innej etiologii (druga wartość decyzyjna >400 ng/mL, ale tylko u 20% pt z HCC takie wartości!!)
- powdojenie stężenia AFP w ciągu 10-80 dni - wskazuje na HCC (PPV $\sim 100\%$)
- **AFP-L3** (postać fukozylowana)- frakcja AFP cechująca się znacznym powinowactwem do lektyn, dominuje w HCC, i wykrywalna nawet w przypadku małych guzów (zasadniczo nie jest wykrywalna w zmianach niezłośliwych)
- stosunek AFP-L3/AFP total: indeks fukozylacji $>15\%$ - (sens. 70%, spec. 96% dla HCC)

HBV/HDV i HCC

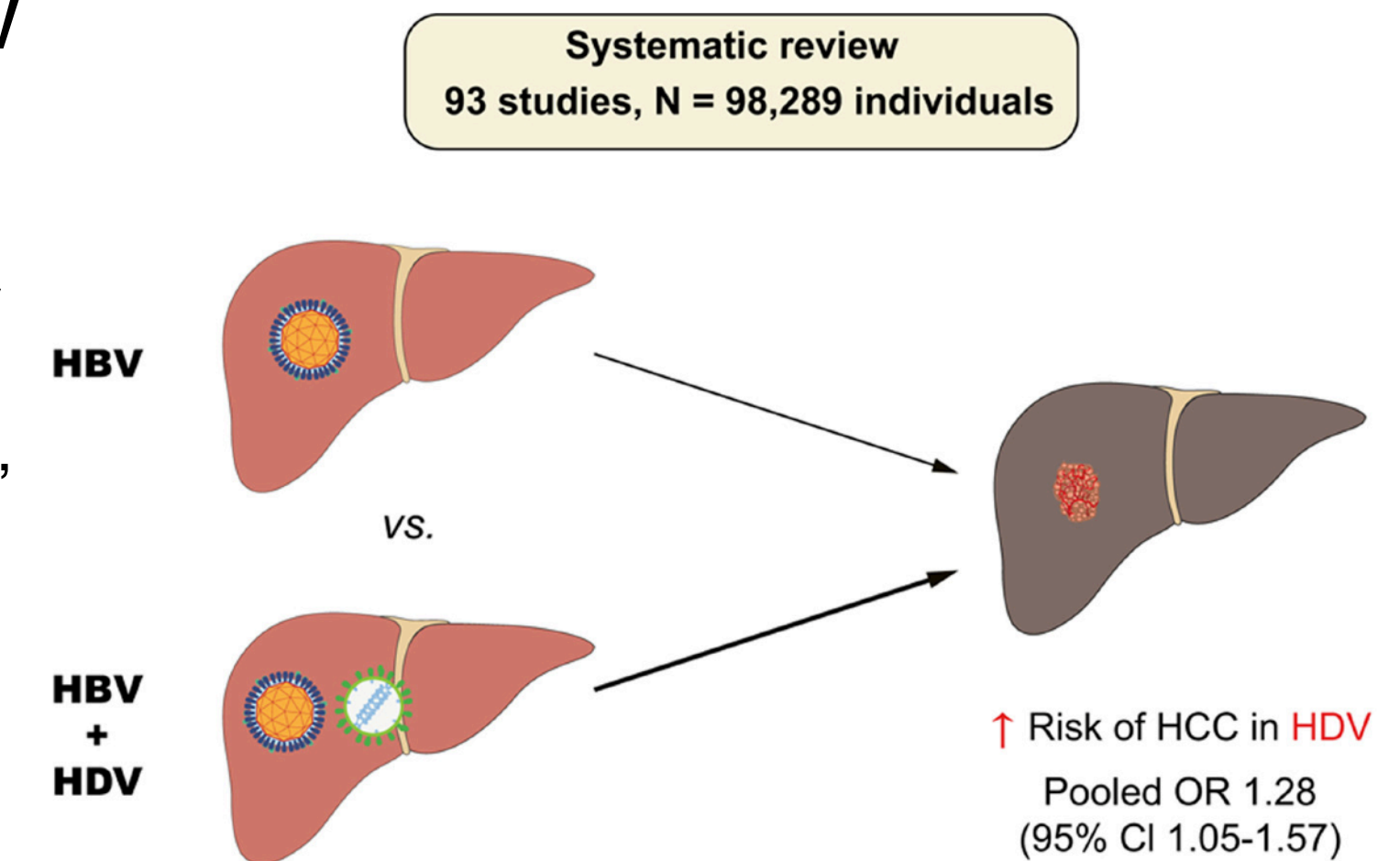


- HDV mały wirus RNA (-)
- **defektywny**, wymaga otoczki HBV do składania wirusów i transmisji, replikuje się autonomicznie
- prewalencja HDV zwykle odzwierciedla prewalencję HBV (istnieją różnice geograficzne) - **ok. 5%** WHO, Global hepatitis report, 2017
- ko-infekcja lub superinfekcja (nadkażenie) - różny przebieg choroby, powikłania i rokowanie
- u pt z CHB nasila rozwój włóknienia, marskości i **zwiększa ryzyko HCC**, w porównaniu z pacjentami zakażonymi wyłącznie HBV

Chronic hepatitis D and hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis of observational studies

Dulce Alfaiate ^{1,†} · Sophie Clément ² · Diana Gomes ¹ · Nicolas Goossens ^{3,†} · Francesco Negro ^{2,3,†} ✉

Affiliations & Notes ▾ Article Info ▾ Linked Articles (3) ▾

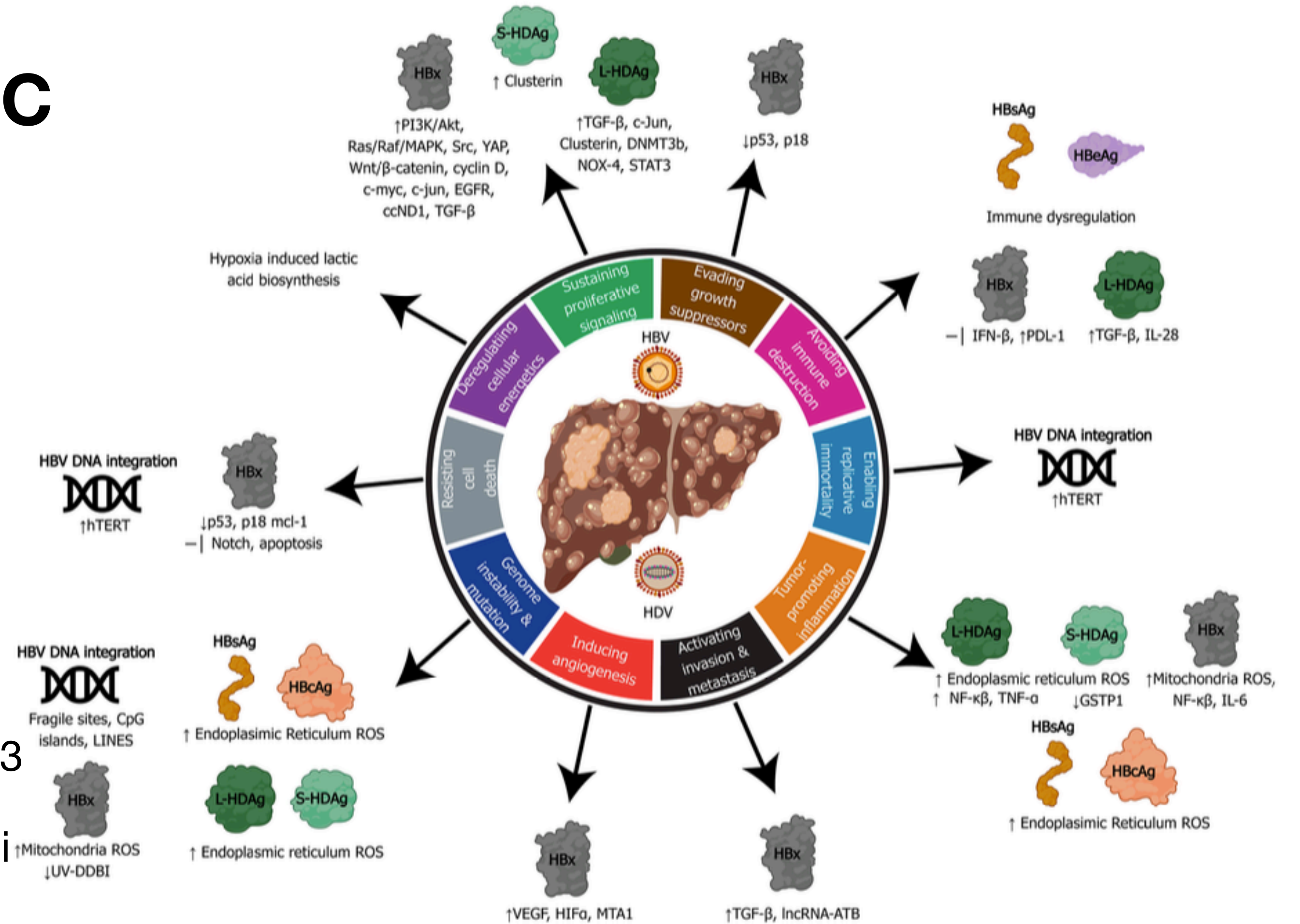


* tylko badania prospektywne pooled odds ratio **2.77**; 95% CI **1.79–4.28**;

HDV

-pośredni wpływ na rozwój HCC

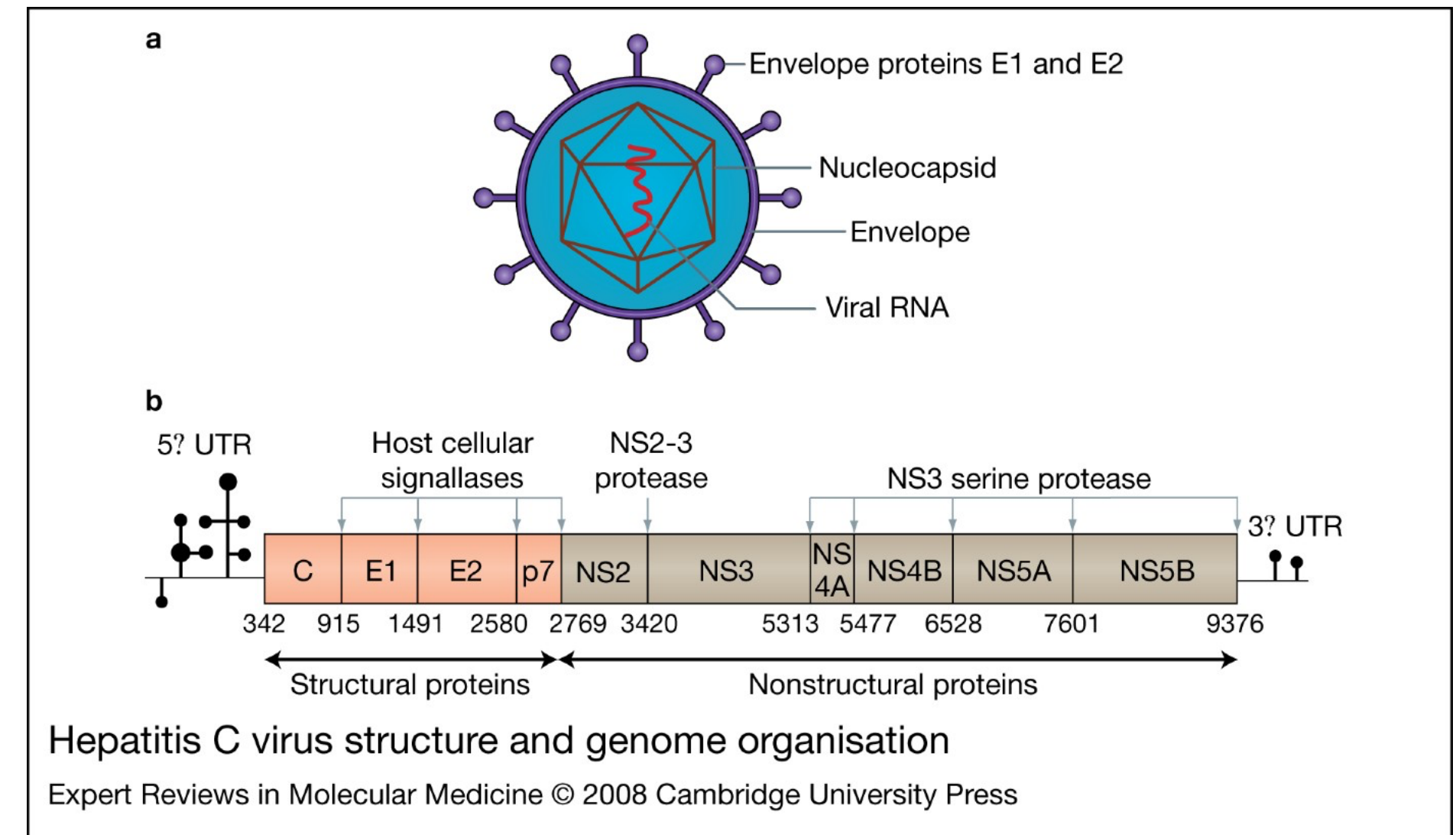
- L-HDAg interakcja ze szlakami sygnalizacyjnymi zaangażowanymi w wzrost/przeżycie komórek, apoptozę i fibrogenezę - aktywacja szlaków transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) i AP-1 promuje włóknienie oraz transformację komórek
- L-/S-HDV indukcja stresu oksydacyjnego w ER
- L-HDAg może także zwiększać **aktywność prozapalną** NF- κ B poprzez stymulację TNF- α .
- **modyfikacje epigenetyczne**, - acetylacja histonu H3 przez S- i L-HDAg, zwiększają ekspresję genu clusterin (podwyższone poziomy clusterin i acetylacji histonów) - wspomagają przeżycie komórek zakażonych HDV



HCV hepatitis C virus

Charakterystyka

- rodzina Flaviviridae, RNA (+) , ORF koduje poliproteinę, w tym białka strukturalne (core, envelope E1 i E2) oraz białka kluczowe dla funkcjonowania i namnażania wirusa (NS3 - proteaza serynowa, NS4A, NS4B, NS5A - czynnik wiążący RNA, NS5B - RdRp)
- **wysoka zmienność genetyczna** (występowanie quasispecies) - przełamywanie mechanizmów obronnych - przetrwanie zakażenia - progresji zapalenia i włóknienia w wątrobie
- **wysokie tempo repikacji** (ogranicza możliwość kontroli zakażenia)
- 80% przypadków rozwija się zakażenie przewlekłe z ryzykiem rozwoju HCC
- w skali świata 58.8 mln zakażonych HCV (w Polsce ok. 150 tys, większość nieświadoma tego faktu)
- rocznie **1-4%** pt z marskością rozwija HCC,
- w 2021 rekordowa liczba **150 000** zgonów z powodu HCC związanego z HCV (Global Burden of Diseases Study 2021)
- od 2015 dostęp do skutecznych terapii DAA (z wysokim >97% odsetkiem SVR) nadal istotny problem kliniczny, pacjenci po zakończonym leczeniu nadal mają ryzyko HCC, jego wysokość zależy od stopnia włóknienia



HCV i HCC

Patogeneza

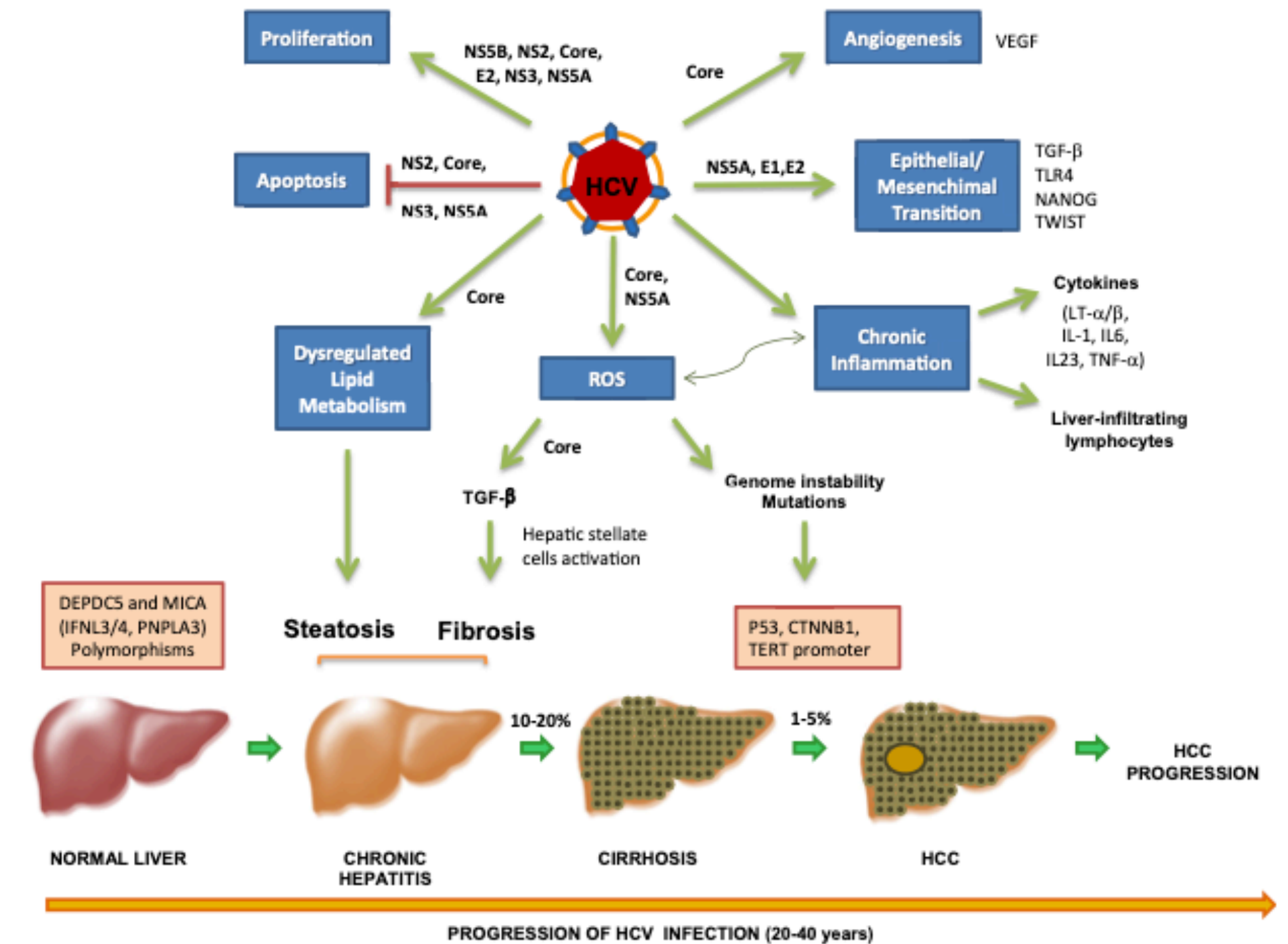
- w przeciwieństwie do HBV, HCV nie posiada aktywności odwrotnej transkryptazy, zatem nie integruje się z genomem gospodarza
- HCC o etiologii HCV dotyczy niemal wyłącznie pt z marskością

HCC rozwija się w wyniku wieloetapowego procesu - na który składają się:

- **zaburzenia szlaków molekularnych**, które są bezpośrednio wywoływane przez czynniki wirusowe lub mediowane immunologicznie w wyniku przewlekłego stanu zapalnego
- **zaburzeń metabolizmu** - HCV interferuje z metabolizmem kwasów tłuszczowych - wywołuje stłuszczenie hepatocytów, negatywnie wpływa na gospodarkę węglowodanową - insulinooporność będąca efektem działania NS3 i NS5A - środowisko anty-apoptyczne, proliferacyjne i promujące wzrost guza
- **immunosupresji** - białka HCV mają właściwość blokowania wytwarzania interferonu, upośledzania funkcji komórek prezentujących antygen
- **włóknienie i marskość** - (obok przewlekłego zapalenia) HCV bezpośrednio przyczynia się do fibrogenezy poprzez aktywację szlaków transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), β -katenin (również poprzez generowanie ROS)
- **zmiany epigenetyczne** - białko rdzeniowe wirusa aktywuje metyltransferazy DNA, pośrednio poprzez ncRNA (egzosomy)- wpływa również na niezakażone komórki

854

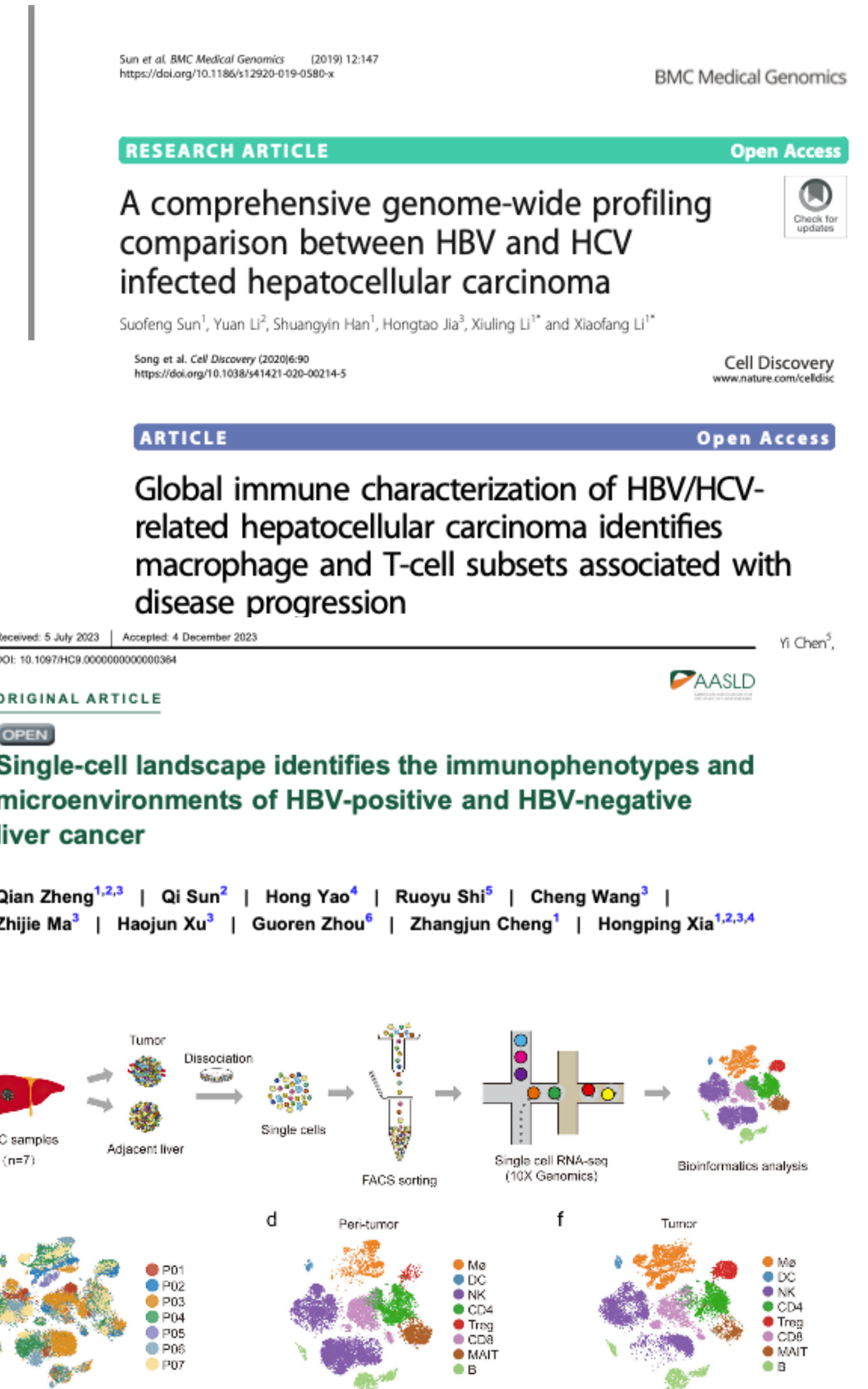
T. Vescovo et al. / Clinical Microbiology and Infection 22 (2016) 853–861



HCV i HCC

Perspektywy

- 10 lat po wprowadzeniu DAA HCV nadal pozostaje istotnym problemem w onkologii - nawet po SVR pt nadal mają ryzyko HCC (uzależnione od stopnia włóknienia) - wczesne leczenie może być korzystne
- pt po leczeniu powinni być monitorowani, istnieje potrzeba opracowania markerów, które umożliwiłyby optymalizację algorytmów badań przesiewowych
- w badaniach nad mechanizmami patogenezy HCC i poszukiwaniem nowych celów terapeutycznych/ nowych biomarkerów powszechnie stosowane są metody wysokoprzepustowe (transkryptomika - analiza miRNA i lncRNA, które regulują progresję HCC, metabolomicznych) - wiele z nich wykazało na potencjał prognostyczny
- zastosowanie dobrze zdefiniowanych markerów wykrywanych we krwi wraz z systemami scoringowymi mogą być preferowane w praktyce klinicznej



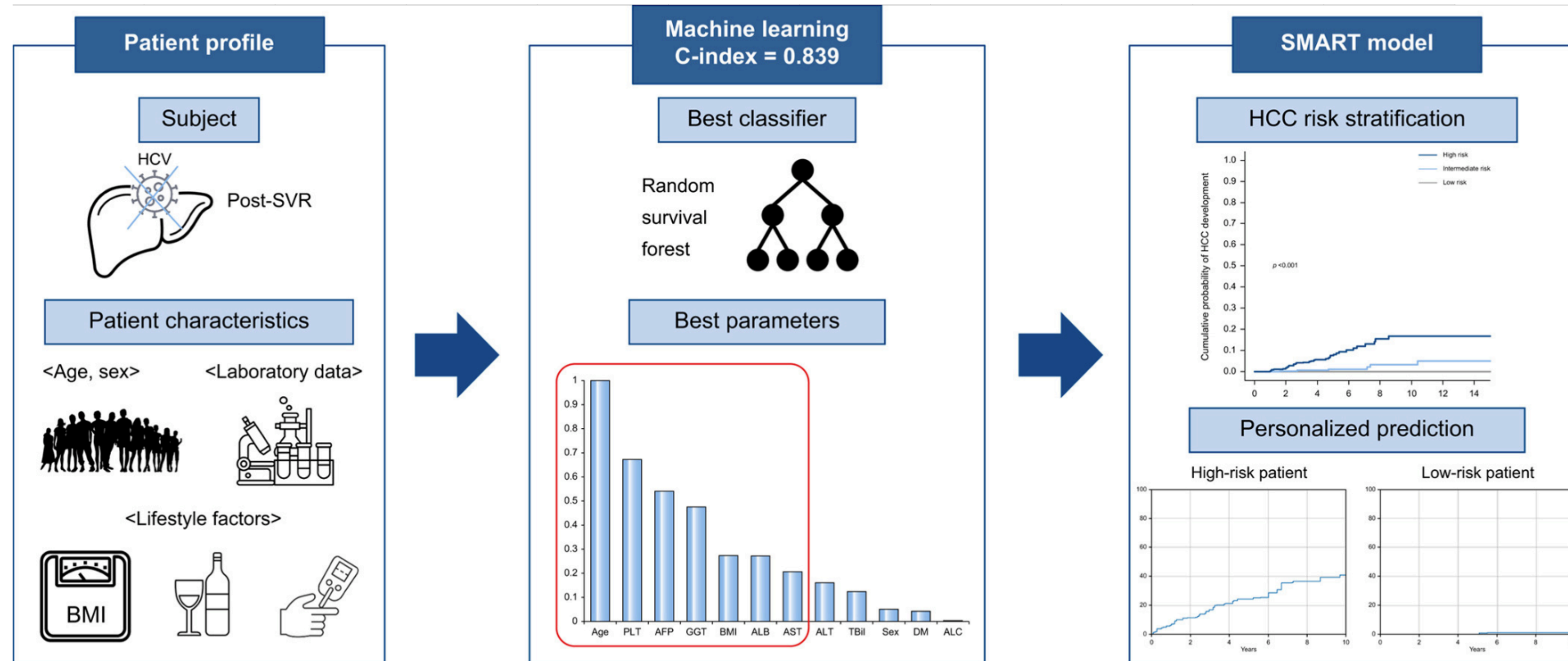
HCC

Zastosowanie ML w predykcji HCC

Research Article

Machine learning for individualized prediction of hepatocellular carcinoma development after the eradication of hepatitis C virus with antivirals

Tatsuya Minami^{1†}, Masaya Sato^{1†}, Hidenori Toyoda², Satoshi Yasuda², Tomoharu Yamada¹, Takuma Nakatsuka¹, Kenichiro Enooku¹, Hayato Nakagawa¹, Hidetaka Fujinaga¹, Masashi Izumiya¹, Yasuo Tanaka¹, Motoyuki Otsuka¹, Takamasa Ohki³, Masahiro Arai⁴, Yoshinari Asaoka⁵, Atsushi Tanaka⁵, Kiyomi Yasuda⁶, Hideaki Miura⁷, Itsuro Ogata⁸, Toshiro Kamoshida⁹, Ryosuke Tateishi¹✉



HCC w poszukiwaniu biomarkerów

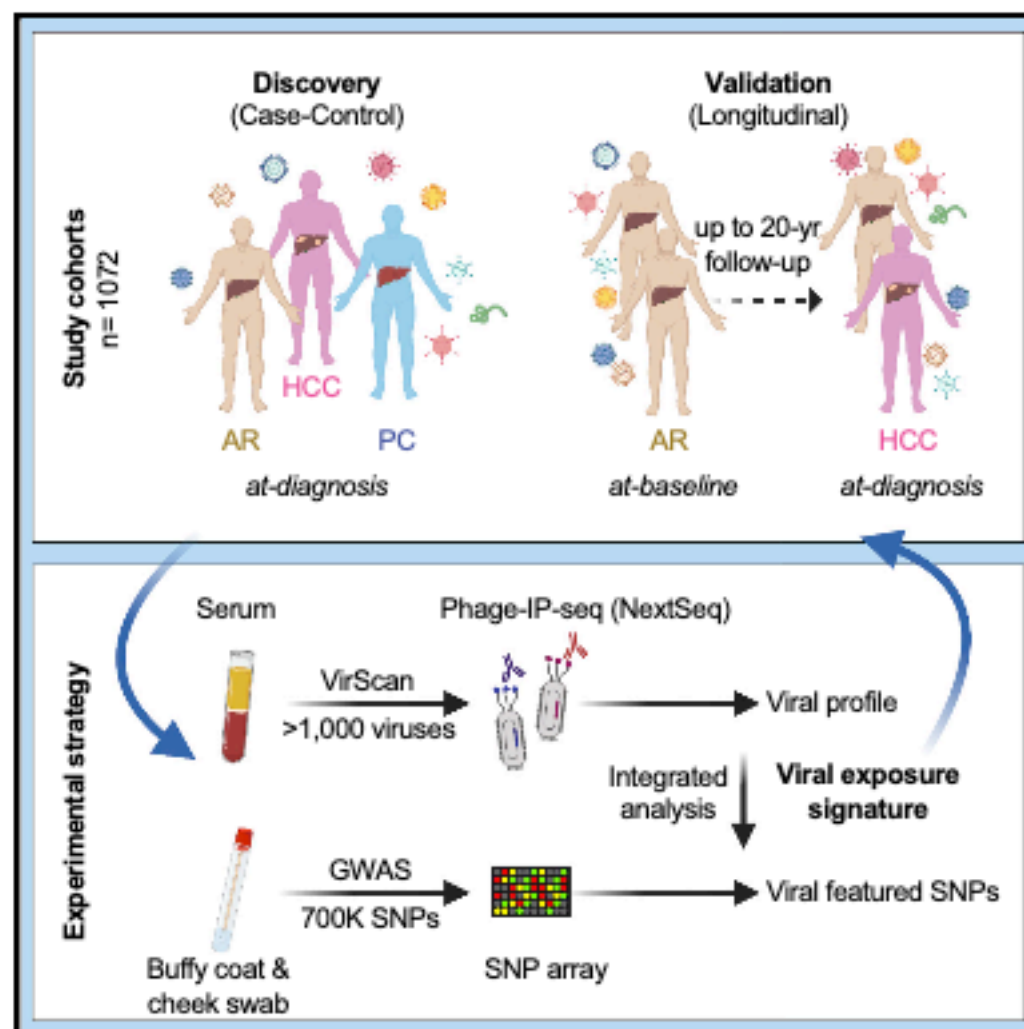
VIRScan

Cell

Article

A Viral Exposure Signature Defines Early Onset of Hepatocellular Carcinoma

Graphical Abstract



Authors

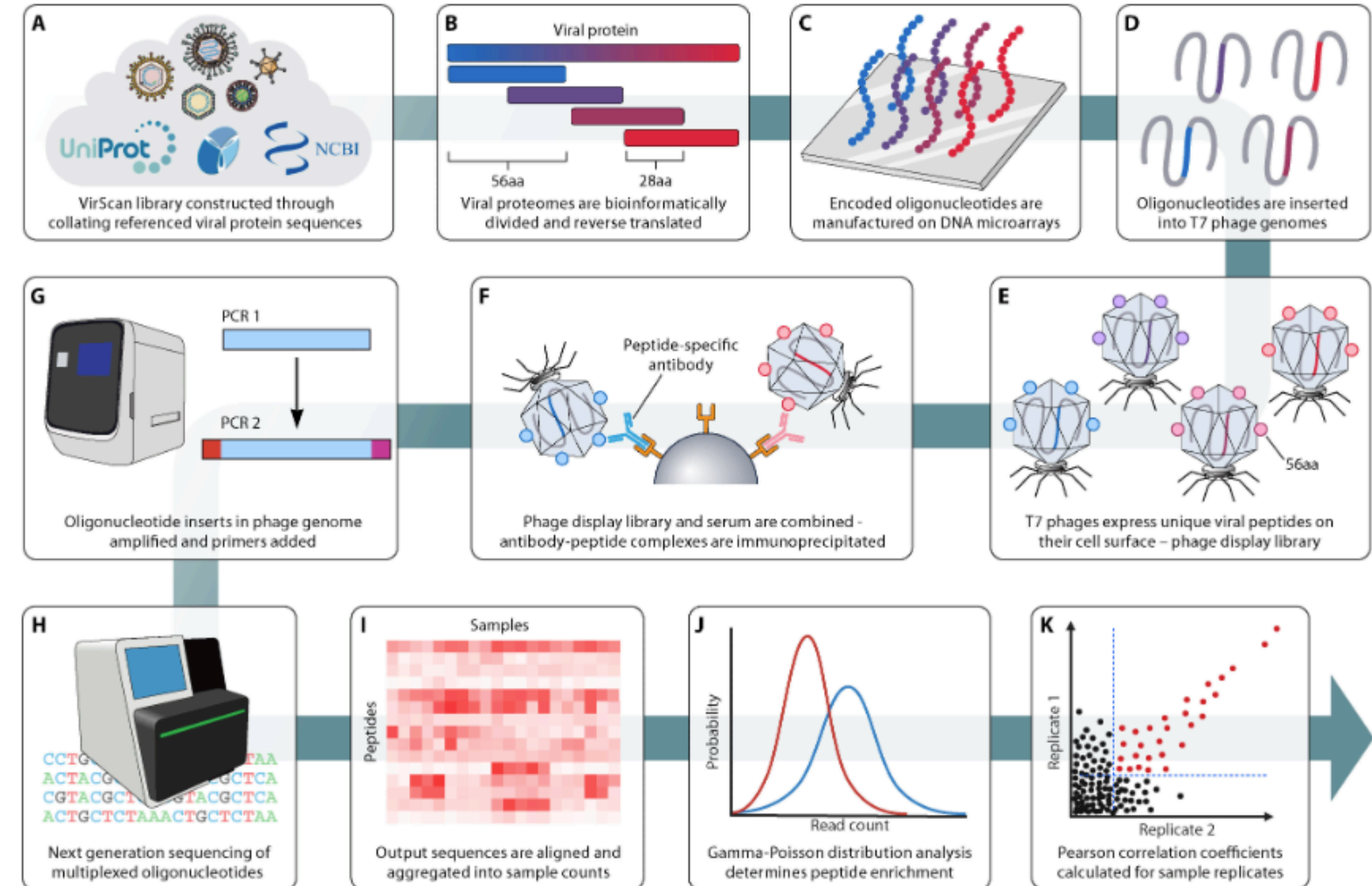
Jinping Liu, Wei Tang,
Anuradha Budhu, ..., Zhanwei Wang,
Herbert Yu, Xin Wei Wang

Correspondence

xw3u@nih.gov

In Brief

Lui et al. demonstrate how viral infection history, obtained using human blood samples and VirScan analysis of antiviral antibodies, can be used to detect hepatocellular carcinoma in at-risk patients prior to clinical cancer diagnoses.



Hepatitis - perspektywy



- HCC nadal wiąże się z złym rokowaniem i jest jednym z nielicznych nowotworów, których śmiertelność wzrasta
- wprowadzone w wielu krajach pod koniec ubiegłego wieku obowiązkowe szczepienia przeciw WZWB zmniejszają liczbę nowych zachorowań, ale utrzymująca się wysoka częstość HCC związana z zakażeniem HBV jest wynikiem globalnego szczytu zachorowań, który rejestrowano w początkach drugiej połowy ubiegłego wieku - rak obecnie rozpoznawany u tych pt jest ostatnim etapem wiele lat trwającej sekwencji zdarzeń
- wczesne rozpoznanie HCC jest kluczowe dla poprawy długoterminowego przeżycia, ponieważ choroba w początkowym stadium może być podatna na terapie
- zapobieganie zakażeniom HBV przez szczepienia oraz skuteczne leczenie HCV stanowią kluczowe strategie w ograniczaniu częstości występowania HCC.
- jednak wczesna diagnostyka, skuteczne programy przesiewowe i kompleksowe leczenie nadal są **wyzwaniem**, szczególnie w regionach o ograniczonych zasobach medycznych

Luki w diagnostyce i leczeniu

- we wszystkich regionach jedynie **13%** osób z przewlekłym zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) zostało zdiagnozowanych, a około **3%** (7 milionów) otrzymało terapię przeciwwirusową pod koniec 2022 roku.
- przypadku zapalenia wątroby typu C (HCV) zdiagnozowano **36%** przypadków, a **20%** (12,5 miliona) pacjentów poddano leczeniu mającemu na celu wyleczenie.

Są to wyniki **znacznie poniżej globalnych celów WHO**, które zakładają leczenie 80% osób żyjących z przewlekłym HBV i HCV do 2030 roku

Dziękuję za uwagę