

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Β΄ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Δ.Πεκτασίδης**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Β΄ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Δ.Πεκτασίδης**








**Συμβολή στη μελέτη των μεταλλαγών της πρωτεΐνης του πυρήνα του  
ιού της ηπατίτιδας Β και της αντιγονικής εκφράσεως σε ασθενείς με  
χρόνια HBV λοίμωξη**

**Διδακτορική διατριβή**

**Ειρήνη Ν. Ράπτη**  
Ιατρός

**Αθήνα-Ιανουάριος 2013**

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,  
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ  
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ  
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ  
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ, ΗΓΗΣΑΣΘ  
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ  
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ  
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ  
 ΑΙ ΓΕΜΟΣ ΤΟ ΕΞ ΛΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ  
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,  
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ  
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ  
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ  
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ  
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ.  
 ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ  
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ  
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ, ΕΙΡΪΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ  
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ  
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ  
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.  ΑΓΝΩΣ Δ  
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ  
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ  
 ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ  
 ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,  
 ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ  
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ  
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ  
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ  
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,  
 Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β  
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ  
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ  
 ΙΑΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ  
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ  
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π  
 ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙ  
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



*Στην οικογένειά μου που στάθηκε πάντα δίπλα μου και  
στα παιδιά μου που είναι πηγή χαράς και έμπνευσης*

## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους ανθρώπους με τους οποίους είχα την τιμή να συνεργαστώ και όλους εκείνους που είχα κοντά μου, χωρίς τη βοήθεια των οποίων δε θα ήταν δυνατή η πραγματοποίησή της.

Ξεκινώντας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Ομότιμο Καθηγητή κ.Στέφανο Χατζηγιάννη, που επί σειρά ετών ήταν ο δάσκαλος και καθοδηγητής μου όχι μόνο στην εκπόνηση της συγκεκριμένης Διατριβής αλλά και σε όλη τη διάρκεια της μέχρι τώρα ιατρικής μου πορείας. Με εμπιστεύθηκε και αποτέλεσε για μένα μία συνεχή πηγή γνώσεων και εμπειρίας.

Η συμβολή του καθηγητή κ.Ιωάννη Κοσκίνα ήταν πάντα καθοριστική καθώς δε στάμάτησε ποτέ να με ενθαρρύνει για την ολοκλήρωσή της. Αποτέλεσε και αποτελεί για εμένα έναν πολύ σημαντικό φίλο, δάσκαλο και καθοδηγητή με την επιμονή, την ασίγαστή του αισιοδοξία και τη θετική του άποψη για τη ζωή εντός και εκτός Ιατρικής.

Ο Αναπληρωτής καθηγητής κ.Δημήτριος Βασιλόπουλος βοήθησε τα μάλα στην ολοκλήρωση της διατριβής μου με την τεχνογνωσία του και τη συνεχή του καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της εκπόνησής της. Οι παρεμβάσεις του

ήταν καίριες, ενώ η συνεχής παρότρυνσή του ήταν για εμένα πολύ σημαντική.

Οφείλω ευχαριστίες και στον Proff. Carlo Ferrari στο Πανεπιστήμιο της Πάρμας, στο εργαστήριο του οποίου εργάστηκα και έλαβα σημαντική τεχνογνωσία που με βοήθησε σημαντικά για την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Κατά την παραμονή μου εκεί είχα την ευκαιρία να τον γνωρίσω προσωπικά και να εκτιμήσω τις γνώσεις αλλά και τον ευγενή του χαρακτήρα. Συνεργάστηκα επίσης με αξιολογότετους συναδέλφους, τη Carolina Boni, τη Simonetta Urbani αλλά και άλλους, τους οποίους θεωρώ φίλους παντοτινούς.

Ευχαριστώ επίσης τη φίλη και συνάδελφο κ.Μαργαρίτα Νικολάου με την οποία περάσαμε αρκετές ώρες παρέα στο Εργαστήριο ανταλλάσσοντας προβληματισμούς και ανησυχίες και δουλεύοντας συχνά ταυτόχρονα και δίπλα-δίπλα, καθώς ασχολιόμασταν με συναφή θέματα.

Ευχαριστώ επίσης όλους τους ιατρούς (μέλη ΔΕΠ και ΕΣΥ) της Β΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής για τη συνεργασία τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της αλλά και για την ανοχή τους κατά την απουσία μου από την Κλινική προκειμένου να φέρω εις πέρα τα πειράματα της διατριβής μου.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς μου δηλαδή και την αδερφή μου, που με έμαθαν να είμαι πάνω από όλα και πρώτα από όλα, ένας σωστός άνθρωπος και στους οποίους οφείλω ότι έχω μέχρι τώρα κάνει. Ευχαριστώ επίσης και τα δύο μου παιδιά που με γεμίζουν χαρά, υπερηφάνεια και συνεχή διάθεση να γίνομαι καλύτερη και να παραμένω πάντα δημιουργική.

Ειρήνη Ν. Ράπτη

**ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

Όνομα: Ειρήνη Ράπτη

Ημερομηνία γεννήσεως: 18/1/1969

Οικογενειακή κατάσταση: Διαζευγμένη, δύο παιδιά

Διεύθυνση: Πριγκιπωνήσων 17 Μαρούσι, 15124

Τηλέφωνο: +210-6100562, +210-8654133, 6932621581

**Εκπαίδευση**

1980-1986: 3ο Λύκειο Αθηνών

1986-1992: Ιατρική Σχολή Αθήνας. Απεφοίτησα με βαθμό 9,1 «άριστα» και πρώτη στη χρονιά μου.

1992-1993: Υπηρεσία υπαίθρου στο Αγροτικό Ιατρείο Αγίας Σοφίας και στο Κέντρο Υγείας Ψαχνών Ευβοίας.

**Υποτροφίες**

1987-1992: Κληροδότημα από το Ίδρυμα Παπαδάκη μετά από εξετάσεις.

1992: Υποτροφία από τη φαρμακευτική εταιρία Glaxo για μεταπτυχιακές σπουδές.

2001: Βραβείο από την Ελληνική Εταιρεία Μελέτης του Ήπατος για την εργασία: Δυσπλαστικές και προνεοπλασματικές μεταβολές σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος οφειλομένη σε χρόνια HBV ή HCV λοίμωξη.

2003: Βραβείο από την οργανωτική επιτροπή της διημερίδας ηπατίτιδας Β και C για την εργασία: Μονοθεραπεία και θεραπεία χρόνιας ηπατίτιδας C με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη α-2α (40 KD) και ριμπαβιρίνη.

2004: Βραβείο από την οργανωτική επιτροπή της διημερίδας ηπατίτιδας Β και C για την εργασία: Μελέτη της κυτταρικής ανοσίας σε ασθενείς με HBV λοίμωξη.

**Μεταπτυχιακή εκπαίδευση**

Μάιος 1996-Μάιος 2001 : ειδικότητα Ειδικής Παθολογίας στην Πανεπιστημιακή Κλινική Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Αθηνών.

21/3/2002: Ημερομηνία απόκτησης ιατρικής ειδικότητας Παθολογίας.

Κλινική εμπειρία

Νοσήματα Εσωτερικής Παθολογίας

Νοσήματα ήπατος και χοληφόρων

Ιούλιος 2001- Ιούνιος 2002: επιστημονικός συνεργάτης στο Τμήμα Παθολογίας και Ηπατολογίας του Νοσοκομείου Ερρίκος Ντυνάν, παρά τον καθηγητή Σ. Χατζηγιάννη .

Ιούνιος 2002-31 Ιανουαρίου 2012: επιμελήτρια Γ΄ Παθολογικής Κλινικής και Ηπατολογικής Μονάδας του Νοσοκομείου Ερρίκος Ντυνάν.

Φεβρουάριος 2012-: Συνεργάτης Ηπατολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Ιατρικό Αθηνών

Εργαστηριακή εμπειρία

Δύο έτη στο Εργαστήριο των Ιογενών Ηπατιτίδων του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Αθηνών ασχολήθηκα με τη μελέτη της κυτταρικής ανοσίας ασθενών με οξεία και κεραυνοβόλο ηπατίτιδα και εξάρσεις χρονίας HBV λοιμώξεως, υπό την επίβλεψη του καθηγητού Σ. Χατζηγιάννη.

Έξι μήνες στο Εργαστήριο Ιικής Ανοσοπαθολογίας του Νοσοκομείου της Πάρμας στην Ιταλία υπό την επίβλεψη του καθηγητού C. Ferrari, ασχολήθηκα με τις αντιδράσεις κυτταρικής ανοσίας ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη.

Ερευνητική εμπειρία

Συμμετοχή σε ερευνητικά πρωτόκολλα που αφορούν: Α) Θεραπεία μη αντιρροπούμενης κίρρωσεως με νουκλεοσιδικά ανάλογα, Β) Θεραπευτική αντιμετώπιση χρονίας ηπατίτιδας Β με: α) συνδυασμό πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης και λαμβουντίνης, β) με adefovir dipiroxil σε περίπτωση ιικής αντοχής στη λαμβουντίνη αλλά και σε πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς, γ) με tenofovir fumarate σε πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς Γ) Θεραπευτική αντιμετώπιση ηπατίτιδας C με: α) πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη, β) θεραπεία επαγωγής, γ) συνδυασμό πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης και ριμπαβιρίνης, Δ) Αντιμετώπιση ηπατοκυτταρικού καρκίνου α) με ανάλογα σωματοστατίνης, β) με 5-FU.

Βασική έρευνα αιτιοπαθογένειας των ηπατικών νόσων και ιδίως της ιογενούς ηπατίτιδας.

Εκπαιδευτική εμπειρία

Εκπαίδευση τεταρτοετών και εκτοετών φοιτητών της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, τριτοετών φοιτητών Οδοντιατρικής Σχολής Αθηνών.



Συμμετοχή ως εκπαιδεύτρια στο πρόγραμμα συνεχιζόμενης επαγγελματικής κατάρτισης: «ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΟΛΥΤΡΑΥΜΑΤΙΑ» και μεταπτυχιακή εκπαίδευση νοσηλευτών.

#### Μέλος Ιατρικών Εταιριών

Ελληνική Εταιρία Μελέτης του Ήπατος  
European Association for the Study of the Liver (EASL)

#### Γλώσσες

Πτυχίο Πανεπιστημίου Cambridge Αγγλίας  
Πτυχίο Πανεπιστημίου Michigan Η.Π.Α.  
Δίπλωμα Mittelstufe Γερμανικής γλώσσας  
Ικανοποιητική γνώση Ιταλικής γλώσσας  
Γνώση βασικού επιπέδου Γαλλικής γλώσσας

#### Δημοσιεύσεις

Hadziyannis SJ, Sevastianos V, Rapti I, Vassilopoulos D, Hadziyannis E.  
Sustained responses and loss of HBsAg in HBeAg-negative patients with chronic hepatitis B who stop long-term treatment with adefovir.  
Gastroenterology 2012;143:629-636

Irene Rapti, Hadziyannis Stephanos.

Treatment of special populations with chronic HBV infection.  
Expert Review of Gastroenterology and Hepatology 2011; 5: 323-339.

X International Symposium on Viral Hepatitis, Barcelona  
Spain 21-22/5/2010

Συνσυγγραφή για το syllabus του Συνεδρίου

Irene Rapti, Stephanos Hadziyannis: “Hepatitis B and Special Populations”

Rapti I, Dimou Evangelini, Hadziyannis Stephanos

Adefovir dipivoxil add-on treatment to lamivudine resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B patients. Virological response and development of resistance after combination treatment of at least 5-year duration.  
Hepatology 2009;50 (S4)

Dimou E, Kostamena A, Laras A, Rapti I, Hadziyannis S.

Development of precore and basic core promoter HBV mutations in chronic hepatitis B genotypes D and A. A prospective study in a Caucasian population.

Hepatology 2009;50 (S4)

Vassilopoulos D, Rapti I, Nikolaou M, Hadziyannis E, Hadziyannis SJ  
Cellular immune responses in hepatitis B virus e antigen negative chronic hepatitis B.

J Viral Hepat 2008;15:817-26

Koskinas J, Deutsch M, Kountouras D, Kostopanagiotou G, Arkadopoulos N, Smyrniotis V, Rapti I, Manesis E, Archimandritis A.

Aetiology and outcome of acute hepatic failure in Greece: experience of two academic hospital centres.

Liver Int. 2008 Jul;28(6):821-827. Epub 2008 May 19.

Ε. Ράπτη, Ε. Δήμου, Π. Μητσούλα, Σ.Ι. Χατζηγιάννης

Θεραπεία με αδεφοβίρη της ΗΒεΑg-αρνητικής χρόνιας ηπατίτιδας Β ανθεκτικής στη λαμβουντίνη: προσθήκη vs αντικατάσταση.

Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ηπατίτιδα Β και C 2007, Αθήνα 2008

I. Rapti, E. Dimou, P. Mitsoula, and S. Hadziyannis

Adding-on versus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B.

Hepatology 2007; 45: 307-313

I. Rapti, E. Dimou, P. Mitsoula, and S. Hadziyannis

Combination of adefovir dipivoxil with lamivudine vs. adefovir alone in lamivudine-resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B patients.

Hepatology 2006; 44 (S1).

S. Hadziyannis, V. Sevastianos, I. Rapti, N. Tassopoulos

Sustained biochemical and virological remission after discontinuation of 4 to 5 years of adefovir dipivoxil (ADV) treatment in HBeAg-negative chronic hepatitis B.

Hepatology 2006; 44(S1)

Ε.Ράπτη

Επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις στην HBV λοίμωξη.

Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ηπατίτιδα Β και C 2006, Αθήνα 2007

Ε.Ράπτη, Ε.Δήμου, Π.Μητσούλα, Ι.Κοσκίνας, Σ.Χατζηγιάννης

Ο συνδυασμός λαμβουδίνης (LAM) και διπιβαλικής αδεφοβίρης (ADV) αποτελεί τη θεραπεία εκλογής σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β ανθεκτική στη LAM.

Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ηπατίτιδα Β και C 2006, Αθήνα 2007

Γ.Β. Παπαθεοδωρίδης, Ε. Δήμου, Κ. Δημακόπουλος, Σ. Μανωλακόπουλος, Ε. Ράπτη, Δ. Τζουρμακλιώτης, Γ. Κητής, Ε. Μάνεσης και Σ. Ι. Χατζηγιάννης.

Έκβαση ασθενών με ΗΒεΑg-Αρνητική χρόνια ηπατίτιδα Β υπό μακροχρόνια θεραπεία με νουκλεοσ/τιδικά ανάλογα-Αρχικά με λαμβουντίνη.

Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ηπατίτιδα Β και C 2005, Αθήνα 2006

J. Koskinas, K. Petraki, N. Kavantzias, I. Rapti, D. Kountouras and S. Hadziyannis.

Hepatic expression of the proliferative marker Ki-67 and p-53 protein in HBV or HCV cirrhosis in relation to dysplastic liver cell changes and hepatocellular carcinoma.

J Vir Hep 2005; 12: 635-641

G. Papatheodoridis, E. Dimou, K. Dimakopoulos, S. Manolakopoulos, I. Rapti, G. Kitis, D. Tzourmakliotis, E. Manesis, S. Hadziyannis.

Outcome of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B on long-term nucleos(t)ide analog therapy starting with lamivudine.

Hepatology 2005;42(1):121-129

Ε. Ράπτη, Β. Σεβαστιανός, Ε. Χολόγκιτας, Γ. Παπαθεοδωρίδης, Σ. Χατζηγιάννης

Μακροχρόνια αγωγή με διπιβολική αδεφοβίρη (adefovir dipivoxil, ADV) σε ΗΒεΑg (-) χρόνια ηπατίτιδα Β: αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε πρωτοθεραπευόμενους (naïve) και με αντοχή στη λαμβουδίνη ασθενείς.

Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ηπατίτιδα Β και C 2004, Αθήνα 2005

Δ. Βασιλόπουλος, Ε. Ράπτη, Μ. Νικολάου, Σ. Χατζηγιάννης

Μελέτη της κυτταρικής ανοσίας σε ασθενείς με ΗΒV λοίμωξη.

Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ηπατίτιδα Β και C 2004, Αθήνα 2005

Ε. Ράπτη, Β. Σεβαστιανός, Ι. Κοσκίνας, Ε. Δήμου, Σ. Χατζηγιάννης

Θεραπεία με adefovir dipivoxil (ADV) σε μεταμοσχευμένους ή με μη αντιρροπούμενη κίρρωση ασθενείς με ΗΒεΑg (-) χρόνια ηπατίτιδα Β ανθεκτική στη λαμβουδίνη.

Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ηπατίτιδα Β και C 2003, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2004

Σ. Σάββας, Χ. Παλαμάρου, Ε. Ράπτη, Σ. Χατζηγιάννης  
Μονοθεραπεία και θεραπεία χρόνιας ηπατίτιδας C με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη α-2α (40 KD) και ριμπαβιρίνη.  
Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ηπατίτιδα Β και C 2003, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2004

I. Raptis, J. Koskinas, T. Emmanouil, S. Hadziyannis.  
Changing relative roles of hepatitis B and C viruses in the etiology of hepatocellular carcinoma in Greece. Epidemiological and clinical characteristics.  
J Vir Hep 2003;10:450-54

C. Boni, A. Penna, A. Bertoletti, V. Lamonaca, I. Rapti, G. Missale, M. Pilli, S. Urbani, A. Cavalli, S. Cerioni, R. Panebianco, J. Jenkins, C. Ferrari.  
Transient restoration of anti-viral T-cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B.  
J Hepatol 2003;39:595-605

Ειρήνη Ράπτη  
Κλινικές πτυχές της ηπατίτιδας C: Η πρόοδος των τελευταίων ετών.  
Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ιογενής ηπατίτιδα Β και C, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2003.

Ε. Ράπτη, Σ. Σάββας, Σ. Χατζηγιάννης  
Ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C γονοτύπου 4.  
Στο: Στέφανος Χατζηγιάννης: Ιογενής ηπατίτιδα Β και C, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2003.

Ειρήνη Ράπτη, Στέφανος Χατζηγιάννης.  
Πρωτοπαθή κακοήθη νεοπλάσματα του ήπατος: το πρόβλημα στην Ελλάδα σήμερα.  
Στο: Δημήτριος Κελέκης: Νεοπλάσματα του ήπατος. Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2003.

Ε. Ράπτη, Β. Σεβαστιανός, Ι. Κοσκίνας, Ε. Δήμου, Στ. Χατζηγιάννης

Θεραπεία με διπιβολική αδεφοβίρη (ADV) σε μεταμοσχευμένους ή με μη αντιρροπούμενη κίρρωση ασθενείς με HBeAg (-) χρόνια ηπατοπάθεια Β ανθεκτική στη λαμβουδίνη.

8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2003

Ε. Ράπτη, Β. Παπαδημητρόπουλος, Δ, Βασιλόπουλος, Χ. Παλαμάρου, Π. Μεσίσκλης, Σ. Χατζηγιάννης

Σηπτική πολυαρθρίτιδα από *S. aureus* MRSA σε ασθενή με μη αντιρροπούμενη κίρρωση λόγω χρόνιας ηπατίτιδας Β.

8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2003

Stephanos J. Hadziyannis and Irene Rapti.

Antiviral therapy in the prevention of hepatocellular carcinoma.

Στο: Shiv K. Sarin, Kunio Okuda: Hepatitis B and C, carrier to cancer, 1<sup>st</sup> edition, Harcourt India Private Limited 2002.

Ειρήνη Ράπτη.

Χρόνια ηπατίτιδα C: Φυσική ιστορία, κλινική και ηπατική συμμετοχή, θεραπευτική αντιμετώπιση.

Στο: SYLLABUS: Θεραπεύοντας την Χρόνια ηπατίτιδα C με βάση το γονότυπο του ιού, Εκδόσεις Ιατρική Παιδεία, Αθήνα 2002

ΣΠ Σάββας, Ε. Ράπτη, Ι. Κοσκίνας, Σ. Χατζηγιάννης

Αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη επαγωγικού σχήματος ιντερφερόνης-α και ριμπαβιρίνης.

28ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 2002

Vassilopoulos D., Rapti I., Nikolaou M., Hadziyannis S.

T-cell mediated immune response in patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B.

Hepatology 2001.

Χατζηγιάννης Σ., Ράπτη Ε.

Η αντιϊκή θεραπεία στην πρόληψη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου.

Ιατρική 2000;77:56-61

Koskinas J., Petraki K., Raptis I., Hadziyannis S.

Dysplastic/ Premalignant liver cell changes and hepatocellular proliferation in HBV or HCV related cirrhosis.

Hepatology 2000;32:235A.

Papatheodoridis G., Dimou E., Rapti I., Hadziyannis S.  
HBV reactivation and biochemical breakthrough after initially effective lamivudine therapy in patients with precore mutant HBV related liver disease.

Hepatology 2000;33:375A.

Kaloterakis A., Filiotou A., Koskinas J., Raptis I., Zouboulis C., Michelakakis H., Hadziyannis S.

Systemic AL amyloidosis in Gaucher disease. A case report and review of the literature.

J Intern Med 1999 Dec;249:587-590

Koskinas J., Raptis I., Manika Z., Hadziyannis S.

Overlapping syndrome of autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis associated with pyoderma gangrenosum and ulcerative colitis.

J Gastroenterol Hepatol 1999;11:1421-1424

Ράπτη Ε., Κοσκίνας Ι., Μάνεσης Ε., Χατζηγιάννης Σ.

Πρόληψη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου με ιντερφερόνη στη χρόνια ηπατίτιδα C.

6η Ημερίδα για την Ηπατίτιδα C, Αθήνα 1999.

Κοσκίνας Ι., Ψιλόπουλος Δ., Κετίκογλου Ι., Ράπτη Ε., Καρβουντζής Γ., Χατζηγιάννης Σ.

Κεραυνοβόλος ηπατική ανεπάρκεια ως πρώτη εκδήλωση μεταστατικής νόσου του ήπατος.

Ιατρική 1999;75:146-150.

Dimou E., Papatheodoridis G., Laras A., Rapti I., Dourakis S., Hadziyannis S. Efficacy of long term lamivudine therapy in HBeAg negative chronic hepatitis B.

Hepatology 1999;30:646A.

Ράπτη Ε., Σπανού Ε., Κοσκίνας Ι., Χατζηγιάννης Σ.

Επιδημιολογία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου στην Ελλάδα.

5η Ημερίδα για την Ηπατίτιδα C, Αθήνα 1998.

Ράπτη Ε., Λαράς Α., Κοσκίνας Ι., Χατζηγιάννης Σ.

Κλινική αξιολόγηση των απροσδιοριστων αποτελεσμάτων της RIBA-2.

5ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 1998.

Ράπτη Ε., Κοσκίνας Ι., Χατζηγιάννης Σ.

Επιδημιολογία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου στην Ελλάδα.

1ο Παγκόσμιο Συνέδριο για τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, Παρίσι 1998.

Διαλέξεις-Ανακοινώσεις

Ε.Ράπτη

Αντιμετώπιση της ΧΗΒ στην καθημερινή κλινική πράξη. Ισπανικά δεδομένα.

Εκπαιδευτική Διημερίδα της ΕΕΜΗ: Εστιάζοντας στο αποτέλεσμα.

Βελτιστοποίηση των κλινικών αποτελεσμάτων στην αντιμετώπιση των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β (ΧΗΒ)

Λευκάδα 29-30/9/2012

I.Rapti

Evaluation of serological and virological parameters indicating presence and activity of the viruses

38<sup>th</sup> Pan-Hellenic Medical Congress

Athens 16-19/5/2012

I.Rapti

Pharmacological treatment of hepatocellular carcinoma.

Greek Society for the Study of the Liver. "What changes in today's Hepatology?"

Ioannina 11-12/5/2012

Ε. Ράπτη

Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος: φυσική ιστορία-συννοσηρότητες.

12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Χανιά 12-15/5/2011

Ε.Ράπτη

Ερευνητικά ενδιαφέροντα στην αγωγή των πρωτοθεραπευόμενων ασθενών.

Διακοπή της αντικής αγωγής. Ποιους ασθενείς αφορά και πότε?

Επιστημονική εκδήλωση της ΕΕΜΗ με θέμα: Αξιολόγηση σύγχρονων δεδομένων και κλινικής πρακτικής στη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β.

Αθήνα 19/3/2011

Ε.Ράπτη

Επιδημιολογία, τρόποι μετάδοσης και προφύλαξης της ηπατίτιδας Β

Ημερίδα: χρόνια ηπατίτιδα Β: Ο ρόλος του γιατρού πρωτοβάθμιας περίθαλψης, Αθήνα 23/2/2011

Ε.Ράπτη

Αντιμετώπιση του HBV σε ειδικές ομάδες πληθυσμού (Management of HBV infection in special populations).

18<sup>η</sup> Διεθνής Δημερίδα Ηπατίτιδας Β και C 2011 Αθήνα

29-30/1/2011

Ε.Ράπτη

Επιδημιολογία, φυσική ιστορία και παθοφυσιολογία ηπατίτιδας C

Εισηγήτρια στο 2<sup>ο</sup> μάθημα του 4<sup>ου</sup> Σχολείου Κλινικής

Ηπατολογίας της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ήπατος Θεσσαλονίκη 4/12/2010

Ε.Ράπτη

Ηπατικές παθήσεις και νεφρός. Ηπατοπάθειες στην εξωνεφρική κάθαρση και νεφρική μεταμόσχευση.

16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Κως 2-5/5/2010

Ε. Ράπτη

Παρόν και μέλλον στη θεραπεία των ιογενών ηπατιτίδων-Ηπατίτιδα Β. Ο ρόλος της θεραπείας στην πρόληψη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου.

Εκπαιδευτική Δημερίδα: Κλινικά Προβλήματα Ηπατολογίας Θεσσαλονίκη 14-15/5/2010

Ε. Ράπτη

Κλινική προσέγγιση του ασθενούς με θαλασσαιμία και ηπατική νόσο. Ο ασθενής με εστιακή βλάβη ήπατος.

Πανελλήνιο Συνέδριο Θαλασσαιμίας Αθήνα 7-9/5/2010

Ε. Ράπτη

Prevention of HBV-related HCC cannot be achieved in several HBeAg negative CHB patients despite “effective” anti-HBV treatment. The “field-effects” of HBV integration and underlying cirrhosis.

17<sup>η</sup> Διεθνής Δημερίδα Ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 30-31/1/2010



Ε. Ράπτη

Θεραπεία ΗΒεΑg θετικών ασθενών.

Μαθήματα Ηπατολογίας με θέμα: Εξελίξεις στη χρόνια ηπατίτιδα Β. Αθήνα 11-12/12/2009

Ε. Ράπτη

Εξετάζοντας τα χαρακτηριστικά των ασθενών στη μακροχρόνια αντιμετώπιση της ΧΗΒ. Ειδικοί πληθυσμοί.

Επιστημονική εκδήλωση της ΕΕΜΗ: Θέματα προς εξέταση στη μακροχρόνια αντιμετώπιση της χρόνιας ηπατίτιδας Β. Καρδίτσα 21-22/11/2009

Ε.Ράπτη

Έγκυος με ΗΒV.

Επιστημονική εκδήλωση της ΕΕΜΗ με θέμα: Θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β. Παρόν και μέλλον. Αθήνα 14/3/09

Ε.Ράπτη

Παγκόσμιος επιπολασμός ΗΚΚ-παράγοντες κινδύνου.

Δημερίδα ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2009

Ε. Ράπτη, Ε. Δήμου, Π. Μητσούλα, Σ.Ι. Χατζηγιάνης

Θεραπεία με αδεφοβίρη της ΗΒεΑg-αρνητικής χρόνιας ηπατίτιδας Β ανθεκτικής στη λαμβουντίνη: προσθήκη vs αντικατάσταση.

Δημερίδα ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2007

Ε.Ράπτη

Επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις στην ΗΒV λοίμωξη.

Δημερίδα ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2005

Ε.Ράπτη, Ε.Δήμου, Π.Μητσούλα, Ι.Κοσκίνας, Σ.Χατζηγιάνης

Ο συνδυασμός λαμβουδίνης (LAM) και διπιβαλικής αδεφοβίρης (ADV) αποτελεί τη θεραπεία εκλογής σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β ανθεκτική στη LAM.

Δημερίδα ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2005

Ε. Ράπτη

Αυτοάνοση ηπατίτιδα (Ανοσοπαθγένεια/Γενετική προδιάθεση).

9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Μύκονος 2005

Ε. Ράπτη, Β. Σεβαστιανός, Ε. Χολόγκιτας, Γ. Παπαθεοδωρίδης, Σ. Χατζηγιάννης

Μακροχρόνια αγωγή με διπιβολική αδεφοβίρη (adefovir dipivoxil, ADV) σε ΗΒεΑg (-) χρόνια ηπατίτιδα Β: αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε πρωτοθεραπευόμενους (naïve) και με αντοχή στη λαμβουδίνη ασθενείς.

Δημερίδα ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2004.

Δ. Βασιλόπουλος, Ε. Ράπτη, Μ. Νικολάου, Σ. Χατζηγιάννης

Μελέτη της κυτταρικής ανοσίας σε ασθενείς με ΗΒV λοίμωξη.

Δημερίδα ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2004.

Ε. Ράπτη, Β. Σεβαστιανός, Ι. Κοσκίνας, Ε. Δήμου, Σ. Χατζηγιάννης

Θεραπεία με adefovir dipivoxil (ADV) σε μεταμοσχευμένους ή με μη αντιρροπούμενη κίρρωση ασθενείς με ΗΒεΑg (-) χρόνια ηπατίτιδα Β ανθεκτική στη λαμβουδίνη.

Δημερίδα ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2003.

Σ. Σάββας, Χ. Παλαμάρου, Ε. Ράπτη, Σ. Χατζηγιάννης

Μονοθεραπεία και θεραπεία χρονίας ηπατίτιδας C με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη α-2α (40 KD) και ριμπαβιρίνη.

Δημερίδα ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2003.

Ε. Ράπτη, Β. Σεβαστιανός, Ι. Κοσκίνας, Ε. Δήμου, Στ. Χατζηγιάννης

Θεραπεία με διπιβολική αδεφοβίρη (ADV) σε μεταμοσχευμένους ή με μη αντιρροπούμενη κίρρωση ασθενείς με ΗΒεΑg (-) χρόνια ηπατοπάθεια Β ανθεκτική στη λαμβουδίνη.

8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2003

Ε. Ράπτη, Β. Παπαδημητρόπουλος, Δ. Βασιλόπουλος, Χ. Παλαμάρου, Π. Μεσίσκλης, Σ. Χατζηγιάννης

Σηπτική πολυαρθρίτιδα από *S. aureus* MRSA σε ασθενή με μη αντιρροπούμενη κίρρωση λόγω χρονίας ηπατίτιδας Β.

8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2003

Ε. Ράπτη, Σ. Σάββας, Σ. Χατζηγιάννης

Ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C γονοτύπου 4.

Συνέδριο ιογενούς ηπατίτιδας Β και C, Αθήνα 2002.

ΣΠ Σάββας, Ε. Ράπτη, Ι. Κοσκίνας, Σ. Χατζηγιάννης

Αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη επαγωγικού σχήματος ιντερφερόνης-α και ριμπαβιρίνης.  
28ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 2002

Papatheodoridis G., Dimou E., Rapti I., Hadziyannis S.  
HBV reactivation and biochemical breakthrough after initially effective lamivudine therapy in patients with precore mutant HBV related liver disease.  
27-31/10/2000: 51ο ετήσιο συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρίας Μελέτης του Ήπατος, Ντάλας, Η.Π.Α. για τα νοσήματα του παγκρέατος, χοληφόρων

Koskinas J., Petraki K., Raptis I., Hadziyannis S.  
Dysplastic/ Premalignant liver cell changes and hepatocellular proliferation in HBV or HCV related cirrhosis.  
27-31/10/2000: 51ο ετήσιο συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρίας Μελέτης του Ήπατος, Ντάλας, Η.Π.Α. για τα νοσήματα του παγκρέατος, χοληφόρων

Dimou E., Papatheodoridis G., Laras A., Rapti I., Dourakis S., Hadziyannis S.  
Efficacy of long term lamivudine therapy in HBeAg negative chronic hepatitis B. 5-9/11/1999: 50ο ετήσιο συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρίας Μελέτης του Ήπατος, Ντάλας, Η.Π.Α.

Ράπτη Ε., Κοσκίνας Ι., Μάνεσης Ε., Χατζηγιάννης Σ.  
Πρόληψη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου με ιντερφερόνη στη χρόνια ηπατίτιδα C.  
6η Ημερίδα για την Ηπατίτιδα C, Αθήνα 1999.

Ράπτη Ε., Σπανού Ε., Κοσκίνας Ι., Χατζηγιάννης Σ.  
Επιδημιολογία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου στην Ελλάδα.  
5η Ημερίδα για την Ηπατίτιδα C, Αθήνα 1998.

Ράπτη Ε., Λαράς Α., Κοσκίνας Ι., Χατζηγιάννης Σ.  
Κλινική αξιολόγηση των απροσδιορίστων αποτελεσμάτων της RIBA-2.  
5ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 1998.

Ειρήνη Ράπτη  
Αιτιολογία και παθογένεια του ηπατοκυτταρικού καρκίνου.  
Οκτώβριος 1998, Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ογκολογίας, Ηράκλειο Κρήτης

Ράπτη Ε., Κοσκίνας Ι., Χατζηγιάννης Σ.  
Επιδημιολογία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου στην Ελλάδα.  
1ο Παγκόσμιο Συνέδριο για τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, Παρίσι 1998.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **A. Ιογενείς ηπατίτιδες**

Υπάρχουν πολλές μορφές ιογενών ηπατιτίδων, οι οποίες έχουν πάρει το όνομά τους από τα αντίστοιχα γράμματα του λατινικού αλφαβήτου με τα οποία προσδιορίζονται οι ιοί που τις προκαλούν. Οι σημαντικότερες εξ αυτών είναι οι ηπατίτιδες A-E, ενώ οι ιοί F και GBV-C/HGV δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια των ηπατιτίδων εν γένει.

Η ηπατίτιδα A είναι αυτοπεριοριζόμενη, οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας A (HAV), RNA ιό της οικογένειας Picornaviridae, μεταδίδεται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και έχει περίοδο επώασης 15-45 ημέρες.

Εκδηλώνεται στους ενήλικες συνήθως ως οξεία ικτερική ηπατίτιδα, ενώ στα παιδιά συνήθως διαλάθει ασυμπτωματικά. Ενίοτε ο HAV ευθύνεται για περιπτώσεις κεραυνοβόλου ηπατίτιδας ιδίως σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (1). Αν και όπως αναφέρθηκε, ο συνήθης τρόπος μετάδοσης είναι η κοπρανοστοματική οδός, επειδή κατά τη διάρκεια της επώασης και τα αρχικά στάδια της νόσου η ιαιμία είναι σημαντική, έχουν παρατηρηθεί αρκετές περιπτώσεις ηπατίτιδας A σε χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών καθώς και σε πολυμεταγγιζόμενα ιδίως με διαλύματα κεκαθαμένου παράγοντος VIII άτομα (2,3). Διεθνώς παρατηρείται μείωση της επίπτωσης

της οξείας ηπατίτιδας Α καθώς και των ατόμων με προϋπάρχουσα ανοσία στη νόσο, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι πιθανότητες σοβαρής νόσησης ιδίως των πιο ηλικιωμένων ατόμων. Η ηπατίτιδα Α μπορεί να προληφθεί με τον εμβολιασμό, ο οποίος γίνεται με δύο δόσεις η δεύτερη 6-18 μήνες μετά την πρώτη, με προστασία από τον ιό για περισσότερα από 20 χρόνια (4). Τα άτομα στα οποία συνιστάται εμβολιασμός είναι: 1)παιδιά που ζουν σε περιοχές με μεγάλη επίπτωση της νόσου, 2)άτομα που θα ταξιδέψουν σε χώρες με μέτρια ή μεγάλη ενδημικότητα της νόσου, 3)ομοφυλόφιλοι άνδρες, 4)χρήστες ενδοφλεβίων ουσιών, 5)άτομα που δουλεύουν με πρωτεύοντα μολυσμένα με HAV ή ασχολούνται με τον HAV σε εργαστήρια, 6)άτομα με διαταραχές παραγόντων πήξης, 7)κατά τη διάρκεια εξάρσεων της νόσου και 8)άτομα με χρόνιες ηπατοπάθειες, καθώς σε αυτούς είναι αποδεδειγμένο ότι η οξεία ηπατίτιδα Α αυξάνει πολύ τη νοσηρότητα και τη θνητότητα (4-6).

Η ηπατίτιδα Ε οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας Ε (HEV), RNA ιό, αταξινόμητο ακόμη, ο οποίος προκαλεί νόσο η οποία μοιάζει κατά πολύ με την οξεία ηπατίτιδα Α αλλά μπορεί να πάρει κεραυνοβόλο μορφή στις εγκύους. Ο HEV έχει ανιχνευθεί σε ένα σύνολο ζωικών ειδών, όπως οι χοίροι, τα πρόβατα, τα κοτόπουλα, οι αρουραίοι, τα πρωτεύοντα (πίθηκοι, χιμπατζήδες, κ.ά.) (7). Ο HEV μεταδίδεται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, όπως και ο HAV, αλλά σε αντίθεση με τον ιό της ηπατίτιδας Α ο

οποίος έχει σχεδόν παγκόσμια κατανομή, ο ιός της ηπατίτιδας E παρατηρείται συνήθως σε τροπικές και αναπτυσσόμενες χώρες. Εκεί προκαλεί οξεία ηπατίτιδα σε άτομα χωρίς ή με περιορισμένη ανοσία στον ιό. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται και σε βιομηχανοποιημένες χώρες στην Ευρώπη και στη Βόρειο Αμερική, όπου συχνά τα ζώα όπως οι χοίροι και οι αρουραίοι μεταδίδουν τη νόσο μέσω μόλυνσης των υδάτων (8,9). Ο HEV προκαλεί όπως αναφέρθηκε οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα, η θνητότητα της οποίας είναι όμως αυξημένη (20%) στις εγκύους οι οποίες μολύνθηκαν κατά τη διάρκεια εξάρσεως της νόσου σε αναπτυσσόμενες χώρες (8). Η πρόληψη της νόσου γίνεται μόνο με λήψη μέτρων σωστής υγιεινής καθώς η παθητική ανοσοπροφύλαξη βρίσκεται ακόμη σε πειραματικό επίπεδο (10).

Η ηπατίτιδα C οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), RNA ιό ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των Flaviviridae, ανακαλύφθηκε το 1989 και θεωρείται υπεύθυνος για τις περισσότερες περιπτώσεις της μη-A μη-B ηπατίτιδας (11-13). Ο HCV παρουσιάζει μεγάλη γενετική ετερογένεια. Τα στελέχη του που έχουν απομονωθεί παγκοσμίως έχουν ταξινομηθεί σε 6 γονοτύπους, περισσότερους από 50 υποτύπους, ενώ κάθε ασθενής μπορεί να έχει πολλά σχεδόν-είδη (quasispecies) του ιού (14). Ο HCV μεταδίδεται παρεντερικά (μετάγγιση αίματος και παραγώγων του πριν από το 1991-92

(13,15), χρήση ενδοφλεβίων ουσιών αλλά και ενδορρινική χρήση κοκαΐνης, τυχαίο δήγμα βελόνης κατά τη διάρκεια εργασίας, δερμογραφισμοί, μέσω ατελούς αποστείρωσης ιατρικών εργαλείων κ.ά.), μέσω σεξουαλικής επαφής (αν και η πιθανότητα σε μονογαμικούς συντρόφους ασθενών με ηπατίτιδα C είναι πολύ μικρή (16)), κάθετα κατά τον τοκετό (2-5% των νεογνών που γεννιούνται από anti-HCV(+) μητέρες μολύνονται από τον ιό (17)). Ο HCV προκαλεί τόσο οξεία όσο και χρόνια ηπατίτιδα C. Για την οξεία ηπατίτιδα C ο χρόνος επώασης είναι 15-75 ημέρες, η νόσος είναι συνήθως ασυμπτωματική (65%-70% των περιπτώσεων) και 75%-80% των περιπτώσεων χρονίζουν. Θεωρείται ότι εφόσον γίνει αντιληπτή η οξεία ηπατίτιδα C πρέπει να αντιμετωπιστεί θεραπευτικά, καθώς τα ποσοστά ανταπόκρισης είναι πολύ υψηλά (98%) (18). Η χρόνια ηπατίτιδα C έχει προσβάλλει περίπου 170.000.000 ανθρώπους παγκοσμίως, ενώ στις Η.Π.Α. η τελικού σταδίου ηπατική νόσος επί εδάφους χρόνιας HCV λοίμωξης αποτελεί την πρώτη αιτία μεταμόσχευσης ήπατος. Για το λόγο αυτό, η χρόνια ηπατίτιδα C πρέπει να αντιμετωπίζεται θεραπευτικά, με σκοπό την πρόληψη της εμφάνισης των επιπλοκών της (κίρρωση, ηπατοκυτταρικός καρκίνος). Η ενδεικνυόμενη πλέον θεραπεία της χρόνιας HCV λοίμωξης είναι ο συνδυασμός εβδομαδιαίας χορήγησης πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης α-2α ή α-2β και καθημερινής χορήγησης ριμπαβιρίνης για 6-12 μήνες



ανάλογα με το γονότυπο του ασθενούς. Τα ανωτέρω θεραπευτικά σχήματα έχουν δώσει ποσοστά θεραπευτικής ανταπόκρισης 40-90% αναλόγως γονοτύπου (19-21).

Η ηπατίτιδα δ οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας δ (Hepatitis Delta Virus, HDV), ένα RNA ιό, η χαρακτηριστική ιδιότητα του οποίου είναι ότι χρειάζεται υποχρεωτικά την παρουσία του επιφανειακού αντιγόνου (HBsAg) του ιού της ηπατίτιδας Β για να δράσει. Ο ιός ανακαλύφθηκε αρχικά ως πυρηνικό αντιγόνο σε ήπαρ ασθενών με βαριά χρόνια ηπατίτιδα Β (22,23). Η περαιτέρω μελέτη και γενετική του ανάλυση απέδειξε ότι υπάρχουν τρεις τουλάχιστον γονότυποι του ιού (24,25). Ο ιός μεταδίδεται παρεντερικά και αφορά α) είτε οξεία συλλοίμωξη από HDV και HBV που οδηγεί σε ποσοστό 95% σε ανοσολογική κάθαρση και των δύο μορφών ηπατίτιδας και ίαση, είτε β) σε επιλοίμωξη από τον HDV ασθενών που είναι ήδη θετικοί για τον HBV (HBsAg(+)) και οδηγεί σε χρονιότητα σε ποσοστό >70%. Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι η παρουσία του HDV συνοδεύεται από πολύ προχωρημένη ηπατική νόσο, πιστεύεται πλέον ότι η βαρύτητα της νόσου διαφέρει καθοριζόμενη από παράγοντες του ιού (γονότυπος) αλλά και γεωγραφικές παραμέτρους (24,25). Δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής επιτυχής θεραπεία για την HDV λοίμωξη καθώς φαίνεται, ότι μόνο η πρόληψη της

ηπατίτιδας B με εμβολιασμό αλλά και η εκρίζωση του HBsAg μπορεί να επιφέρει επιτυχή περιορισμό της HDV λοίμωξης (26).

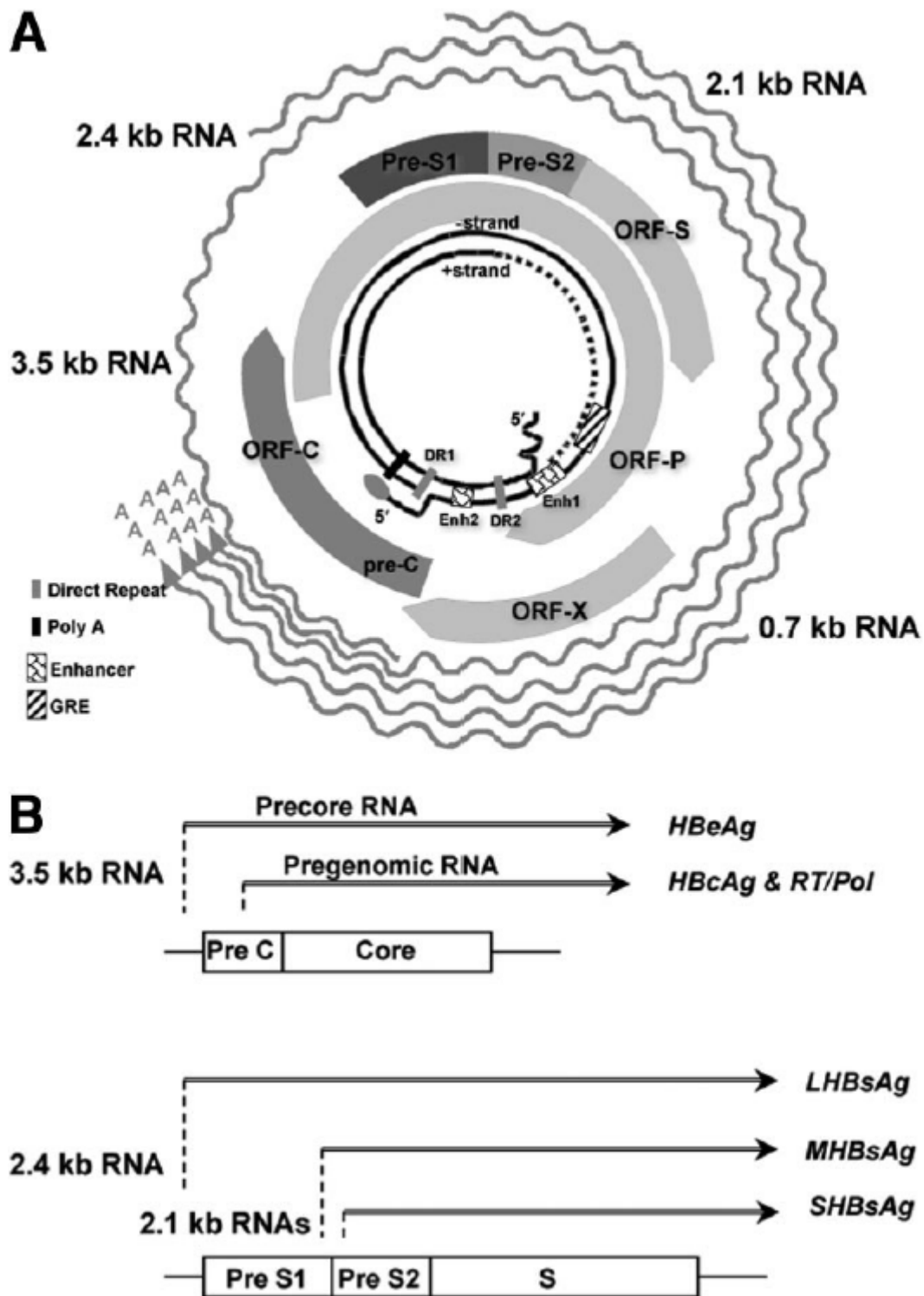
## **B. Ιογενής ηπατίτιδα B**

### **α. Ο ιός της ηπατίτιδας B-Μεταλλάξεις**

Ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV) ανήκει στους hepadna ιούς, στους οποίους ανήκουν ακόμη οι ιοί της ηπατίτιδας των τρωκτικών woodchuck, των σκιούρων εδάφους, των πάπιων Πεκίνου, καθώς και οι ιοί ηπατίτιδας που προσβάλλουν άλλα πρωτεύοντα.

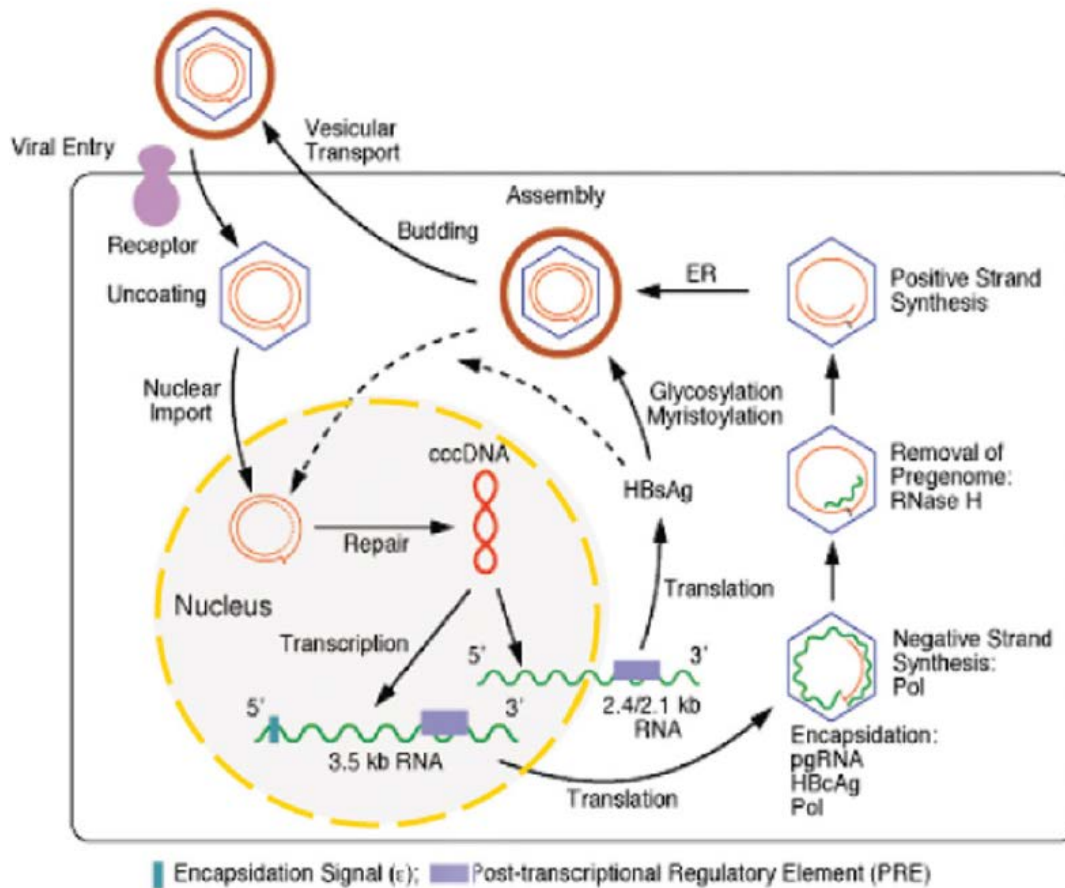
Το γονιδίωμα του αποτελείται από **μερικώς δίκλωνο DNA** με 3200 νουκλεοτίδια, ενώ περιέχει 4 μερικώς αλληλοεπικαλυπτόμενα **πλαίσια ανάγνωσης (ORFs, open reading frames)** τα οποία κωδικογράφουν τα αγγελιοφόρα RNA (mRNA) και τελικά τις πρωτεΐνες του ιού (27,28). Στις πρωτεΐνες αυτές συγκαταλέγονται: οι πρωτεΐνες του φακέλου ή αντιγόνο επιφανείας (HBsAg) (περιοχές pre-S1, pre-S2 και S), η πρωτεΐνη του πυρηνοκαμιδίου ή πυρηνικό αντιγόνο (HBcAg), η πρωτεΐνη X και τέλος, η πολυμεράση του ιού η οποία κωδικογράφεται από το μεγαλύτερο πλαίσιο ανάγνωσης και περιλαμβάνει σχεδόν τα 2/3 της γονιδιακής ομολογίας βάσεων. Οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες του ιού μεταφράζονται από τα ανάλογα πλαίσια ανάγνωσης σε αριθμό αγγελιαφόρων RNA τα οποία με τη

σειρά τους μεταγράφονται από το γονιδιακό DNA με τη βοήθεια RNA πολυμερασών από τον ξενιστή. Υπάρχουν συνολικά πέντε (5) αγγελιαφόρα RNA, από τα οποία αυτό που κωδικογράφει για την πρωτεΐνη του πυρηνοκασιδίου και εκείνη της πολυμεράσης ενεργεί και ως μήτρα για τη σύνθεση της αρνητικής κατεύθυνσης αλύσου DNA κατά τη διάρκεια πολλαπλασιασμού του ιού και είναι γνωστό ως **προγονιδιακό RNA (pregenomic RNA, pgRNA)** (Σχήμα 1) (29).



Σχήμα 1. Η δομή του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Β (Από: Liang T, Hepatology 2009;49:S13-S21)

Μετά την προσκόλληση του ιού στον κατάλληλο υποδοχέα και την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα του ηπατοκυττάρου, το DNA απογυμνώνεται, εισέρχεται στον πυρήνα του ηπατοκυττάρου όπου η εγκοπή της αρνητικής αλυσού συνενώνεται, η ελλιπής θετική αλυσος ολοκληρώνεται και το DNA μετατρέπεται σε κλειστή ομοιοπολική δομή (**ccc-DNA, closed covalent circular DNA**)(30). Ο πολλαπλασιασμός του ιού γίνεται από το προγονιδιακό αγγελιοφόρο RNA (pgmRNA) με τη δράση της πολυμεράσης του ιού, η οποία δρώντας αρχικά ως ανάστροφη μεταγραφάση συνθέτει από την αλυσίδα RNA την αρνητική αλυσσο DNA του ιού, ενώ στη συνέχεια δρώντας ως DNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση συνθέτει τη θετική αλυσσο του ιού (31). Για τη λειτουργία αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη του ccc-DNA (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Ο κύκλος ζωής του ιού της ηπατίτιδας Β (Από: Liang T, Hepatology 2009;49:S13-S21)

Ο πολλαπλασιασμός του ιού μέσω του ενδιάμεσου σταδίου του προγονιδιακού RNA έχει ως αποτέλεσμα την εισδοχή σημειακών **μεταλλαγών** και τη μεγάλη γενετική ετερογένεια του ιού, λόγω της υψηλής πιθανότητας σφάλματος της ανάστροφης μεταγραφάσης, η οποία δε διαθέτει μηχανισμούς διόρθωσης (proof reading capacity).

Παγκοσμίως αναγνωρίζονται σήμερα 8 γονότυποι και 9 **υποτύποι** του HBV (32-34). Η παρουσία λυσίνης ή αργινίνης στη θέση 122 καθώς και στη θέση

160, οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν του αντιγονικού επιτόπου «α» του αντιγόνου επιφανείας, αποτελούν καθοριστές d ή y και w ή r αντιστοίχως. Συνδυασμοί των αμινοξέων αυτών προσδιορίζουν τους 4 βασικούς υποτύπους του HBV, ως εξής: adw, adr, ayw, ayr (35). Ως **γονότυποι** ορίζονται τα στελέχη του HBV τα οποία διαφέρουν στην αλληλουχία τους >8% κατά την ανάλυση όλου του γονιδιώματος ή >4% στην S περιοχή (32). Οι γονότυποι του HBV είναι οι: A,B,C,D,E,F,G και H (32-34). Οι γονότυποι έχουν χαρακτηριστική γεωγραφική κατανομή. Ο γονότυπος A συναντάται κυρίως στη Βόρειο Ευρώπη, Βόρειο Αμερική και Νότιο Αφρική, οι γονότυποι B και C κυρίως στην Άπω Ανατολή, ο E στη Δυτική Αφρική, ο F στην Κεντρική Αμερική, ο G έχει διαπιστωθεί σε περιπτώσεις ασθενών από τις Η.Π.Α. και τη Γαλλία και ο προσφάτως ανακαλυφθείς γονότυπος H έχει βρεθεί σε ασθενείς από τη Νικαράγουα και την Καλιφόρνια (32-34). Ο γονότυπος D παρουσιάζει παγκόσμια κατανομή αλλά επικρατεί ως επί το πλείστον στην περιοχή της Μεσογείου, στη Μέση Ανατολή και στις Ινδίες. Στην Ελλάδα ο **γονότυπος D** επικρατεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% (36).

### **ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΧΡΟΝΙΑΣ HBV ΛΟΙΜΩΞΗΣ**

Φαίνεται ότι οι γονότυποι του HBV έχουν κλινική σημασία για την πορεία της χρόνιας HBV λοίμωξης, η οποία διαδράμει σε τέσσερις φάσεις, α)τη

φάση της ανοσοανοχής, β) αυτή της ανοσολογικής κάθαρσης, γ) τη φάση της ενσωμάτωσης και τέλος δ) τη φάση της ενεργοποίησης του ιού (27). **Στη φάση της κάθαρσης, ο ιός καθώς αναγνωρίζεται από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή, δημιουργείται ανοσολογική απάντηση η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του HBeAg και τη δημιουργία αντισώματος αντι-HBe.** Αυτή η διαδικασία ονομάζεται **οροαναστροφή** (10-20% κατ'έτος). Στη διάρκεια της φάσης αυτής της κάθαρσης του HBeAg, μεταλλαγμένα στελέχη του HBV τα οποία δεν παράγουν HBeAg και τα οποία είτε προέκυψαν κατά τα προγενέστερα στάδια της λοίμωξης ή μεταδόθηκαν μαζί με το φυσικό στέλεχος του ιού και μέχρι τώρα κυκλοφορούσαν ως σχεδόν είδη, επιλέγονται ανοσολογικά και αποτελούν από τη φάση αυτή και μετά το κυρίαρχο κυκλοφορούν είδος του HBV (37). Τα στελέχη αυτά δημιουργούνται αφ'ενός μεν με μεταλλαγή στην προπυρηνική περιοχή στη θέση 1896, όπου η γουανίνη (G) αντικαθίσταται από αδενίνη (A) με αποτέλεσμα τη δημιουργία κωδικονίου διακοπής της μετάφρασης, αφ'ετέρου με εμφάνιση συνδυασμού μεταλλαγών στην περιοχή του βασικού πυρηνικού υποκινητή (basic core promoter) στη θέση 1762 όπου η αδενίνη αντικαθίσταται από θυμίνη (T) και στη θέση 1764 όπου η γουανίνη αντικαθίσταται από αδενίνη. Οι μεταλλαγές αυτές ελαττώνουν την παραγωγή του προπυρηνικού mRNA και επομένως



ελαττώνουν επίσης την παραγωγή του HBeAg (38). Οι μεταλλάξεις αυτές οι οποίες επιλέγονται και οδηγούν στη δημιουργία HBeAg(-)/αντιHBe(+)  
ηπατίτιδας καθορίζονται από το γονότυπο του ιού (38-41). Ανάλογα δηλαδή με το γονότυπο του ιού, ο οποίος καθορίζει το νουκλεοτίδιο στη θέση 1858, καθορίζεται και η επιλογή ή όχι της μεταλλάξης G1896A που δημιουργεί το κωδικόνιο TAG διακοπής παραγωγής του αντιγόνου e. Η ύπαρξη θυμιδίνης στη θέση 1858 στους γονοτύπους B, C, D και E επιτρέπει την αντικατάσταση της γουανίνης από αδερίνη, ενώ η ύπαρξη κυτιδίνης στους γονοτύπους A και F λειτουργεί απαγορευτικά για τη μετάλλαξη αυτή (40-41). Στην Ελλάδα το 90% των περιπτώσεων χρόνιας ηπατίτιδας B οφείλεται σε προπυρηνικά μεταλλαγμένο ιό. Σημειωτέον, ότι ο βασικός πυρηνικός υποκινητής είναι πολύ σημαντικός για την αναπαραγωγή του HBV καθώς ελέγχει τη μεταγραφή αφενός του pg RNA-που χρησιμεύει για την παραγωγή του πυρηνοκαψιδίου core και της πολυμεράσης- αφ'ετέρου του προπυρηνικού RNA (prec mRNA) –που χρησιμεύει για τη σύνθεση της προπυρηνικής πρωτεΐνης και του HBeAg (42).

Κατά τη φάση της οροαναστροφής από HBe σε αντι-HBe, εκτός από τη δημιουργία και επιλογή προπυρηνικά μεταλλαγμένων στελεχών παρατηρείται επίσης και μία σωρεία σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο core της πυρηνικής πρωτεΐνης του ιού. Οι μεταλλάξεις αυτές αλλοιώνουν τη

δομή της πρωτεΐνης, μειώνουν την αναγνώριση από κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα συμβάλλοντας έτσι στην ανοσοδιαφυγή και εμμόνη της λοίμωξης (43).

Όπως ειπώθηκε, ο βασικός πυρηνικός υποκινητής (BCP) είναι εξαιρετικά σημαντικός για τον πολλαπλασιασμό του HBV. Αυτός εντοπίζεται στην κωδικογράφουσα περιοχή της πρωτεΐνης X. Έτσι, μεταλλάξεις στον BCP επηρεάζουν και τη δομή και δράση της πρωτεΐνης X. Οι μεταλλάξεις στη X, πιθανώς να παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, ενώ καθώς σχετίζονται με καταστολή αναπαραγωγής του HBV, επιτρέπουν ανοσοδιαφυγή και συμβάλλουν στην εμμόνη του ιού (44).

Πολύ σημαντικό όμως ρόλο παίζουν και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο επιφανείας s και ειδικά στην περιοχή του αντιγονικού καθοριστή a. Μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή μειώνουν τη δράση αντι-HBs αντισωμάτων και μεταλλαγμένα στην περιοχή αυτή στελέχη δεν αναγνωρίζονται από το ανοσολογικό σύστημα. Τέτοια στελέχη παρατηρούνται συχνά σε μεταμοσχεύσεις ήπατος, στις οποίες χορηγείται ανοσοσφαιρίνη αντι-HBs για την πρόληψη αναμόλυνσης του μοσχεύματος (45), καθώς και στο 2-3% των νεογνών που γεννιούνται από HBsAg (+) μητέρες με αποτέλεσμα να αναπτύξουν λοίμωξη από μεταλλαγμένο στέλεχος (46).

Τέλος, μεταλλάξεις παρατηρούνται στο γονίδιο της πολυμεράσης του ιού κατά τη διάρκεια αντικής θεραπείας. Έτσι, κατά τη διάρκεια χορήγησης λαμβουδίνης παρατηρείται συχνά ανάπτυξη μεταλλαγών στο μοτίβο YMDD της καταλυτικής περιοχής C του γονιδίου της πολυμεράσης (rtM204V/I/S), συχνά συνοδευόμενες και από μεταλλαγή στην καταλυτική περιοχή B (rtL180M) (αποσκοπεί στη βελτίωση του πολλαπλασιασμού του μεταλλαγμένου στελέχους (compensatory mutation)) (47,48). Επίσης, παρατηρούνται μεταλλάξεις στο γονίδιο της πολυμεράσης (περιοχές B και D) κατά τη διάρκεια αντικής θεραπείας με διπιβαλική αδεφοβίρη (rtN236T και rtA181T/V (49), ενώ κατά τη χορήγηση τελεπιβουδίνης αναπτύσσονται πανομοιότυπες με τη λαμβουδίνη μεταλλαγές. Κατά τη χορήγηση εντεκαβίρης απαιτούνται πολλαπλές μεταλλάξεις για την εμφάνιση ιικής διαφυγής: (rtI169T+rtL180M+rtM204V+rtM250V και rtL180M+rtT184G+rtM204V+rtS202I) και για το λόγο αυτό τα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων σε πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς υπό αγωγή με εντεκαβίρη είναι εξαιρετικά χαμηλά (1,2%), αυξάνονται όμως σημαντικά σε ασθενείς με προϋπάρχουσες μεταλλαγές λόγω αγωγής με λαμβουδίνη (50). Τέλος, κατά τη χορήγηση τενοφοβίρης, παρά την διαπίστωση σε πολύ μικρό αριθμό ασθενών μεμονωμένων αλλαγών σε συγκεκριμένες περιοχές του

γονιδίου της πολυμεράσης (conserved site changes) δεν έχει παρατηρηθεί μέχρι στιγμής ανάπτυξη ιικής αντοχής (50).

### **β. Επιδημιολογία της HBV λοίμωξης**

Η ηπατίτιδα Β αποτελεί μία από τις συχνότερες λοιμώδεις νόσους διεθνώς, καθώς υπολογίζεται ότι περίπου 350-400.000.000 άνθρωποι είναι μολυσμένοι από τον HBV (27). Επιπλέον, υπολογίζεται ότι 15-20% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β θα αναπτύξουν κίρρωση του ήπατος σε 5 χρόνια, ενώ μόνο 55-85% των ασθενών με κίρρωση σε έδαφος χρόνιας HBV λοίμωξης θα επιβιώσουν περισσότερο από 5 χρόνια (51,52). Η επίπτωση της χρόνιας λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας Β, διαφέρει σημαντικά ανά τον κόσμο. Έτσι, διακρίνονται α) οι περιοχές υψηλής ενδημικότητας (Νοτιοανατολική Ασία-εξαιρουμένης της Ιαπωνίας-, Κίνα καθώς και το μεγαλύτερο τμήμα της Αφρικής) όπου  $\geq 8\%$  του πληθυσμού είναι HBsAg (+), β) οι χώρες ενδιάμεσης ενδημικότητας (τμήματα της Νότιας και Ανατολικής Ευρώπης, Μέση Ανατολή, Ιαπωνία, Ινδία, Βόρειος Αφρική καθώς και οι περισσότερες χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης) όπου 2-7% είναι HBsAg(+) και τέλος γ) οι περιοχές χαμηλής ενδημικότητας (Βόρειος Αμερική, Δυτική Ευρώπη, Αυστραλία) όπου τα αντίστοιχα ποσοστά είναι  $< 2\%$ . Οι περιοχές υψηλής και ενδιάμεσης ενδημικότητας αποτελούν το 45% και 40% του παγκόσμιου πληθυσμού της γης αντίστοιχα,

ενώ η μετάδοση του ιού στις χώρες αυτές γίνεται κάθετα από τις μολυσμένες μητέρες στα παιδιά τους καθώς και οριζόντια στην παιδική ηλικία (53,54). Πράγματι, 60-90% των HBsAg(+) HBeAg(+) μητέρων με χρόνια ηπατίτιδα Β θα μεταδώσουν τον ιό στα τέκνα τους, ενώ η πιθανότητα μετάδοσης από ασυμπτωματικούς φορείς αντι-HBe (+) είναι 15-20% (55,56). Στις χώρες χαμηλής ενδημικότητας, οι οποίες αποτελούν <2% του παγκόσμιου πληθυσμού, η μετάδοση γίνεται στην ενήλικη ζωή, κυρίως μέσω σεξουαλικής επαφής και σπανιότερα με άλλους τρόπους (αιμοκάθαρση, χρήση της ίδιας σύριγγας κατά τη λήψη ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών, μετάγγιση μολυσμένου αίματος από δότη σε περίοδο επώασης κ.ά.) (27).

Σημαντική επίπτωση στον επιπολασμό της ηπατίτιδας Β έχει παίξει η καθιέρωση του υποχρεωτικού εμβολιασμού. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της Ταϊβάν, όπου η οροθετικότητα σε παιδιά μέχρι 9 ετών μειώθηκε από 10% το 1984 πριν την έναρξη του εμβολιασμού σε <1% το 1994, 10 χρόνια μετά την έναρξη του προγράμματος, με ταυτόχρονη σημαντική μείωση των επιπλοκών της χρόνιας ηπατίτιδας Β, όπως ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος (ΗΚΚ) (57).

Στην Ελλάδα, η βελτίωση τα τελευταία χρόνια των συνθηκών υγιεινής, ο υποχρεωτικός εμβολιασμός των παιδιών (περίπου από το 1996), ο έλεγχος

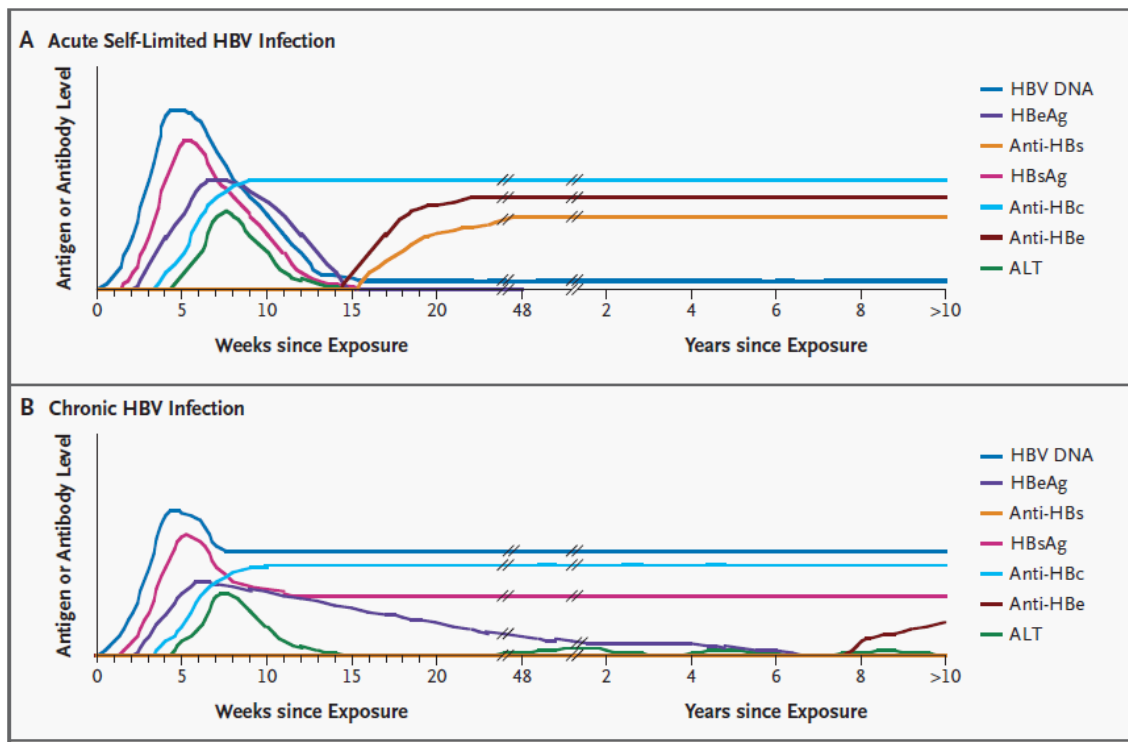
των εγκύων, ο καλύτερος έλεγχος του αίματος και των παραγώγων του και ο περιορισμός της ιατρογενούς διασποράς με τη χρήση εργαλείων μίας χρήσης, οδήγησαν σε μείωση της επίπτωσης της HBV λοίμωξης. Έτσι λοιπόν, τα ποσοστά HBV οροθετικότητας στους αιμοδότες είναι <1%, αν και υπάρχουν θύλακοι υψηλού επιπολασμού (Λάρισα 3,1%, ορεινή Ηλεία 7%, Θάσος 3,27%, κ.ά.) (58).

### **γ. Φυσική διαδρομή και πορεία της HBV λοιμώξεως**

Η φυσική πορεία της χρόνιας HBV λοιμώξεως ποικίλλει από την ασυμπτωματική μέχρι την κεραυνοβόλο ηπατίτιδα όσον αφορά την οξεία ηπατίτιδα και από την κατάσταση του χρονίου ανενεργού φορέα μέχρι τη χρόνια ηπατίτιδα Β και τις επιπλοκές της, την κίρρωση του ήπατος και τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (27, 28,38,39,59-61).

#### **Οξεία ηπατίτιδα Β**

Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών, η οξεία ηπατίτιδα Β παρουσιάζεται ως ασυμπτωματική (70-80% των περιπτώσεων) ειδικά στα παιδιά. Σε ένα μικρό ποσοστό, ~1% των περιπτώσεων, εκδηλώνεται με τη μορφή της κεραυνοβόλου ηπατίτιδας. Ο χρόνος επώασης είναι 4-10 εβδομάδες, αλλά μπορεί να φθάσει και τις 180 ημέρες. Αρχικά εμφανίζεται το επιφανειακό αντιγόνο του HBV (**HBsAg**) 6-30 ημέρες μετά την αρχική μόλυνση, το οποίο και παραμένει θετικό από λίγες ημέρες μέχρι και 6 μήνες (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3:** Πορεία οξείας αυτοπεριοριζόμενης και μη αυτοπεριοριζόμενης λοιμώξεως από τον ιό της ηπατίτιδας Β (από: Don Ganem, Alfred Prince. Hepatitis B virus infection-Natural history and clinical consequences. NEJM 2004;350(11):1118-1129)

Το HBV-DNA μπορεί να μετρηθεί στον ορό των ασθενών από τη στιγμή της θετικοποίησης του HBsAg και είναι συνήθως υψηλό- συχνά της τάξεως των  $10^9$ - $10^{10}$  copies/ml. Συχνά όμως, τόσο τα αντιγόνα του HBV όσο και το HBV-DNA δεν ανιχνεύονται στον ορό και στο ήπαρ παρά μετά από 4-7 εβδομάδες από την έκθεση στον ιό, ακόμη και με τη χρήση εξαιρετικά ευαίσθητων τεχνικών, ίσως λόγω χαμηλών αρχικά επιπέδων, παράγων που μπορεί να ενοχοποιείται και για την καθυστερημένη εμφάνιση ειδικής HBV ανοσίας (62, 63). Παραμονή του HBsAg στον ορό του ασθενούς για πάνω

από 6 μήνες, ουσιαστικά σηματοδοτεί τη μετάπτωση σε χρόνια ηπατίτιδα. Μετά το HBsAg, στον ορό εμφανίζεται το **anti-HBc IgM**, το οποίο σε αυτοπεριοριζόμενη λοίμωξη παραμένει για 3-12 μήνες. Αποτελεί τον πιο πρώιμο και ευαίσθητο δείκτη για τη διάγνωση της οξείας ηπατίτιδας B, αξιολογούνται δε οι υψηλοί του τίτλοι καθώς σε χαμηλούς τίτλους παρατηρείται και σε χρόνια ηπατίτιδα B, σε εξάρσεις δε της νόσου παρατηρείται και αύξηση του τίτλου του. Το **anti-HBc** παραμένει εφόρου ζωής, υποδηλώνοντας παρελθούσα HBV λοίμωξη. Σχεδόν ταυτόχρονα με την εμφάνιση του HBsAg, εμφανίζεται στον ορό το **HBeAg**, η διάρκεια της οροθετικότητας του οποίου είναι μικρή. Η πρώιμη αρνητικοποίηση του HBeAg και η εμφάνιση **anti-HBe** αποτελεί δείκτη αυτοπεριορισμού της οξείας ηπατίτιδας B, ενώ αντίθετα η παραμονή του HBeAg για περισσότερο από 10 εβδομάδες αποτελεί δείκτη μετάπτωσης σε χρονιότητα. Το anti-HBe παραμένει εφ'όρου ζωής και αποτελεί δείκτη αποδραμούσας λοίμωξης, όμως παρατηρείται και σε περιπτώσεις χρονίας HBeAg(-) ηπατίτιδας B από μεταλλαγμένο στην προπυρηνική περιοχή στέλεχος του ιού, όπως >90% των περιπτώσεων χρονίας ηπατοπάθειας B στην Ελλάδα. Μετά την αρνητικοποίηση του HBsAg, ακολουθεί περίοδος «παραθύρου» ενώ στη συνέχεια παρατηρείται ανάπτυξη **anti-HBs**, η παρουσία του οποίου υποδηλώνει ισόβιο ανοσία και παραμένει συνήθως εφ'όρου ζωής. Υπάρχει



όμως ένα ποσοστό 10-15% αρρώστων οι οποίοι χάνουν μεν το HBsAg αλλά δεν αναπτύσσουν ανιχνεύσιμους τίτλους anti-HBs, παρ'όλ'αυτά όμως θεωρείται ότι και αυτοί διατηρούν ανοσία έναντι του ιού.

Ο ίδιος ο HBV δεν είναι άμεσα κυτταροπαθογόνος. Αυτό συμβαδίζει με την παρατήρηση ότι πολλοί ασυμπτωματικοί φορείς όταν υποβάλλονται σε ηπατική βιοψία, έχουν ελάχιστη φλεγμονή παρά το συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό του ιού (64). Η ηπατοκυτταρική βλάβη δημιουργείται από την ανοσιακή απάντηση του ξενιστή έναντι των αντιγόνων του ιού στα μολυσμένα ηπατοκύτταρα. Έτσι, στην οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα B, παρατηρείται έντονη T-λεμφοκυτταρική απάντηση σε πολλά από τα αντιγόνα του ιού στο περιφερικό αίμα (65). Η απάντηση αυτή περιλαμβάνει τόσο τα CD4<sup>+</sup> βοηθητικά-T λεμφοκύτταρα (T-helper lymphocytes) κλάσεως II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC, class-II restricted), όσο και τα CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (cytotoxic T-lymphocytes) κλάσεως I του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC, class-I restricted). Η απάντηση αυτή στρέφεται έναντι πολλών επιτόπων του ιού και οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε ηπατοκυτταρική βλάβη μέσω πολλών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί έχουν κυρίως μελετηθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια και περιλαμβάνουν την

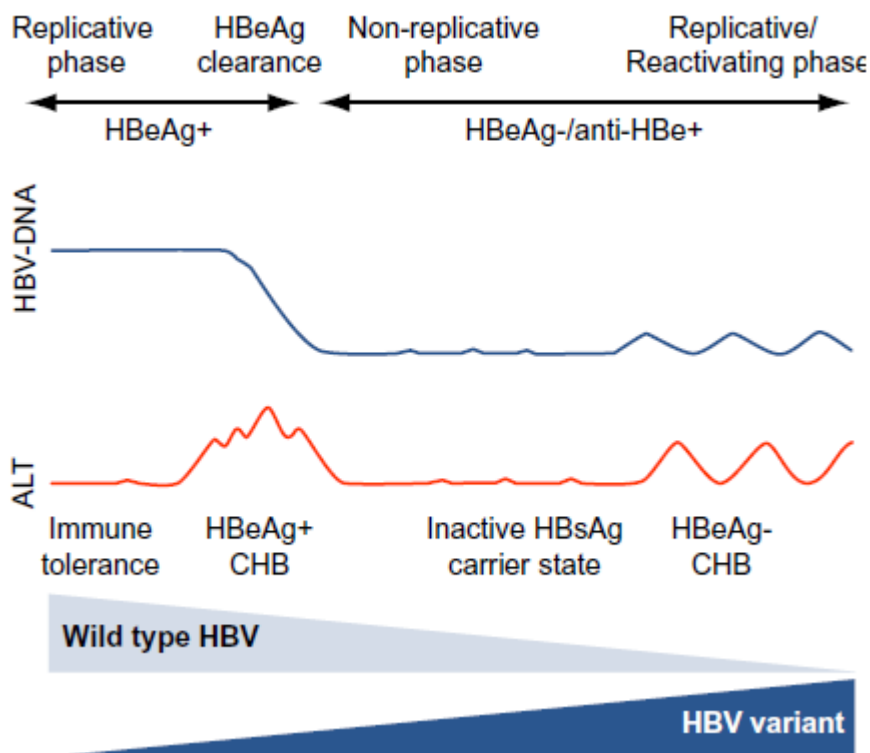
ενεργοποίηση της οδού της απόπτωσης, την κυτταροτοξική δράση προϊόντων της φλεγμονής, όπως ο παράγοντας λύσεως των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF), οι ελεύθερες ρίζες, οι πρωτεάσες κ.ά., καθώς και την κινητοποίηση και άλλων πλην των λεμφοκυττάρων μη ειδικών φλεγμονωδών κυττάρων, τα οποία και αυτά στρατολογούνται στον τόπο της φλεγμονής. Τέτοια κύτταρα είναι τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και κυρίως τα κύτταρα-φονιάδες (Natural Killer cells, NK). Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κατανοητό ότι η δράση κυττοκινών όπως ο TNF και η ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) μπορεί να είναι αμιγώς αντική και όχι κυτταροτοξική (66).

### Χρόνια ηπατίτιδα Β

Η εξέλιξη της οξείας ηπατίτιδας σε χρόνια εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, οι σημαντικότεροι των οποίων είναι: α) η ηλικία νοσήσεως, έτσι ενώ 95-98% των ενηλίκων με οξεία ηπατίτιδα παρουσιάζουν αυτοπεριοριζόμενη λοίμωξη, το ίδιο ισχύει μόνο για 5-10% των νεογνών και 25-30% των παιδιών <5 ετών, β) η βαρύτητα της κλινικής εικόνας της οξείας λοίμωξης, έτσι σε όλους σχεδόν τους ενήλικες (~99%) που παρουσιάζουν οξεία ικτερική ηπατίτιδα, αυτή αυτοπεριορίζεται και δεν εξελίσσεται σε χρόνια νόσο, γ) η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, έτσι οι ανοσοκατεσταλμένοι έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εξέλιξης της

οξείας ηπατίτιδας Β σε χρόνια απ'ότι οι ανοσοεπαρκείς ασθενείς, και δ)άλλοι παράγοντες, όπως φύλο, φυλή, εγκυμοσύνη (η παρουσία ΗΒεΑg σε έγκυες μητέρες αυξάνει την πιθανότητα μετάδοσης της λοίμωξης στο νεογνό και την μετάπτωση σε χρονιότητα).

Η χρόνια ηπατίτιδα Β, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, διαδράμει σε τέσσερις φάσεις, **α)** τη φάση της ανοσοανοχής, **β)** αυτή της ανοσολογικής κάθαρσης, **γ)** τη φάση της ενσωμάτωσης ή φάση του ασυμπτωματικού ΗΒsΑg φορέα και τέλος **δ)** τη φάση της ενεργοποίησης του ιού (Σχήμα 4) (27).



Σχήμα 4: Στάδια χρόνιας HBV λοίμωξης (από Hadziyannis S, J Hepatol 2011;55:183-191)

Η πρώτη φάση όπως αναφέρθηκε είναι αυτή **της ανοσοανοχής**. Η φάση αυτή, στον υγιή ενήλικα διαρκεί συνήθως 2-4 εβδομάδες, αντίθετα στη νεογνική περίοδο η φάση αυτή μπορεί να διαρκέσει για δεκαετίες. Χαρακτηρίζεται από έντονο πολλαπλασιασμό του ιού, παρουσία του HBeAg στον ορό, σχεδόν πλήρη απουσία ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή, κάτι το οποίο εκδηλώνεται με φυσιολογικές σχεδόν τις τιμές των αμινοτρανσφερασών, ενώ ιστολογικά παρατηρούνται ελάχιστες ιστολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ. Είναι γνωστό ότι το HBeAg περνά τον πλακούντα και προκαλεί ανοσοανοχή στο έμβρυο, κατάσταση που οδηγεί σε χρόνια HBV λοίμωξη, ενώ φαίνεται ότι προκαλεί περιορισμό της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή, η οποία στην περίπτωση αυτή είναι κυρίως Th2 και όχι Th1, μέσω μηχανισμών αποπτώσεως (67,68). Στη δεύτερη φάση, αυτή **της ανοσολογικής κάθαρσης**, παρατηρείται μία έντονη συνήθως ανοσολογική απάντηση του ξενιστή με παραγωγή κυτοκινών, λύση μολυσμένων ηπατοκυττάρων και συνεπακόλουθη μείωση του HBV-DNA και αύξηση των τιμών των αμινοτρανσφερασών και του anti-HBcIgM στον ορό. Η έντονη αυτή ανοσιακή απάντηση του ξενιστή χαρακτηρίζεται συνήθως από απώλεια του HBeAg και ανάπτυξη αντισωμάτων (anti-HBe), γι'αυτό και η φάση αυτή χαρακτηρίζεται και ως **ορομετατροπή, ή οροαναστροφή**. Η οροαναστροφή, όπως προαναφέρθηκε, γίνεται αφ'ενός

με μεταλλαγή στην προπυρηνική περιοχή στη θέση 1896, όπου η γουανίνη (G) αντικαθίσταται από αδενίνη (A) με αποτέλεσμα τη δημιουργία κωδικονίου διακοπής της μετάφρασης, αφ'ετέρου με εμφάνιση συνδυασμού μεταλλαγών στην περιοχή του βασικού πυρηνικού υποκινητή (basic core promoter) στη θέση 1762 όπου η αδενίνη αντικαθίσταται από θυμίνη (T) και στη θέση 1764 όπου η γουανίνη αντικαθίσταται από αδενίνη. Οι μεταλλαγές αυτές οι οποίες επιλέγονται και οδηγούν στη δημιουργία HBeAg(-)/αντιHBe(+) ηπατίτιδας καθορίζονται από το γονότυπο του ιού (38-41). Ανάλογα δηλαδή με το γονότυπο του ιού, ο οποίος καθορίζει το νουκλεοτίδιο στη θέση 1858, καθορίζεται και η επιλογή ή όχι της μεταλλαγής G1896A που δημιουργεί το κωδικόνιο TAG διακοπής παραγωγής του αντιγόνου e. Η ύπαρξη θυμιδίνης στη θέση 1858 στους γονοτύπους B, C, D και E επιτρέπει την αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη, ενώ η ύπαρξη κυτιδίνης στους γονοτύπους A και F λειτουργεί απαγορευτικά για τη μετάλλαξη αυτή (40-41). Στους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα B αυτή η φάση είναι η συμπτωματική της λοίμωξης και διαρκεί συνήθως 2-4 εβδομάδες, αντίθετα σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B, ιδίως σε HBeAg(+), η φάση αυτή μπορεί να διαρκέσει δεκαετίες χωρίς να επιτυγχάνεται η απώλεια του HBeAg (χρόνια HBeAg(+) ηπατίτιδα B) και να οδηγήσει σε σημαντική βλάβη του ηπατικού παρεγχύματος, κίρρωση και

ΗΚΚ. Κατά τη φάση της οροαναστροφής από ΗΒε σε αντι-ΗΒε, εκτός από τη δημιουργία και επιλογή προπυρηνικά μεταλλαγμένων στελεχών παρατηρείται επίσης και μία σωρεία σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο core της πυρηνικής πρωτεΐνης του ιού. Οι μεταλλαγές αυτές αλλοιώνουν τη δομή της πρωτεΐνης, μειώνουν την αναγνώριση από κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα συμβάλλοντας έτσι στην ανοσοδιαφυγή και εμμονή της λοίμωξης (43). Μετά από την ανάπτυξη ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή, παρατηρείται σημαντική ελάττωση ή και εξάλειψη των μολυσμένων ηπατοκυττάρων, ανακόπτεται ο ενεργός πολλαπλασιασμός του ιού, με αποτέλεσμα βιοχημική, ιστολογική και ιολογική ύφεση, ενώ ο υπολειμματικός ιός ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του ξενιστή και εισερχόμεθα στην τρίτη φάση της της λοίμωξης, αυτή **της ενσωματώσεως ή μη αναπαραγωγική φάση**. Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, στη φάση αυτή ανήκουν στους λεγόμενους υγιείς ή ασυμπτωματικούς φορείς. Στην πλειονότητά τους, παρουσιάζουν εξαιρετικά ήπιες ιστολογικές αλλοιώσεις και όπως αναφέρθηκε έχουν μη ανιχνεύσιμο ή πολύ χαμηλό HBV-DNA και anti-HBcIgM, φυσιολογικές τρανσαμινάσες αλλά θετικό HBsAg. Στην πορεία της φάσεως αυτής, 15-30% των αρρώστων παρουσιάζουν επανενεργοποίηση του ιού και έντονη ηπατοκυτταρική φλεγμονή, εισερχόμενοι έτσι στην τέταρτη και τελευταία φάση της νόσου, αυτή **της**

**ενεργοποίησης του ιού.** Στις περισσότερες περιπτώσεις, η έντονη αναπαραγωγή του ιού οφείλεται στην επικράτηση και ενεργό πολλαπλασιασμό μεταλλαγμένων στελεχών του ιού, τα οποία δεν παράγουν HBeAg (HBeAg αρνητικά στελέχη) και τα οποία όπως προαναφέρθηκε επικρατούν κατά την φάση της ορομετατροπής, και καθορίζονται από το γονότυπο του ιού.

Στην Ελλάδα, σε ποσοστό >90% των περιπτώσεων, επικρατεί η λεγόμενη χρόνια HBeAg αρνητική ηπατίτιδα Β από μεταλλαγμένο στην προπυρηνική περιοχή ιό. Οι ασθενείς με χρόνια HBeAg αρνητική ηπατίτιδα Β χαρακτηρίζονται από μονίμως ή διαλειπόντως αυξημένα ηπατικά ένζυμα, υψηλές συνήθως τιμές HBV-DNA (>10<sup>5</sup> copies/ml) και anti-HBcIgM στον ορό, ανοσοϊστοχημική έκφραση του HBc στον πυρήνα και το πρωτόπλασμα των μολυσμένων ηπατοκυττάρων, ενώ ιστολογικά έχουν συνήθως ικανές αλλοιώσεις χρόνιας ηπατίτιδας με συχνή δυστυχώς κατάληξη σε κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο (37). Πράγματι, σε μία σειρά 322 Ελλήνων ασθενών με χρόνια HBeAg (-) ηπατίτιδα Β, τα ποσοστά θνητότητας και ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου στην τετραετία από τη διάγνωση, ήταν 29% και 14% αντίστοιχα (69).

#### **δ. Παθογένεση της ηπατικής βλάβης**

Ο ιός της ηπατίτιδας Β δεν είναι άμεσα κυτταροτοξικός για το ήπαρ, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η ηπατική βλάβη οφείλεται στην απάντηση του ανοσιακού συστήματος στην προσβολή του ήπατος από τον ιό (65). Έτσι, όπως φαίνεται από προοπτικές μελέτες σε χιμπατζήδες με οξεία ηπατίτιδα Β, η κάθαρση του ιού οφείλεται τόσο στη μη ειδική (εγγενή) όσο και στην ειδική ανοσία. Πράγματι, φαίνεται ότι αρχικά δημιουργείται η μη ειδική ανοσολογική αντίδραση με τα κύτταρα «φυσικούς-φονείς» (natural killer cells, NK T cells) και τις εκκρινόμενες κυττοκίνες (ιντερφερόνη-γ, παράγων νέκρωσης των όγκων [TNFα] κ.ά), οι οποίες φαίνεται ότι περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό του ιού, χωρίς να προκαλούν θάνατο των ηπατοκυττάρων. Πράγματι, όταν μεταφέρουμε HBsAg-ειδικά CTL (κυτταροτοξικά) λεμφοκύτταρα σε ποντίκια τα οποία έχουν αναπαραγόμενο HBV-DNA, το ιικό DNA και RNA από το ήπαρ εξαφανίζονται, ακόμη και από ζώντα, μη προσβληθέντα ηπατοκύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό αναστέλλεται από τη χορήγηση αντισωμάτων έναντι του TNFα και της IFN-γ (66,70). Επιπλέον, η IL-2 (ιντερλευκίνη-2) καταστέλλει την έκφραση των HBV γονιδίων μέσω μετα-μεταγραφικού μηχανισμού. Στη συνέχεια της λοιμώξεως, αναλαμβάνουν προσαρμοστικοί ανοσολογικοί μηχανισμοί με ειδικά για τον HBV κύτταρα τα οποία δρουν τόσο κυτταροτοξικά, όσο και μέσω των



κυττοκινών. Με την υποχώρηση της λοίμωξης, εμφανίζονται τα εξουδετερωτικά αντισώματα, τα οποία όπως και τα ειδικά για τον HBV T-λεμφοκύτταρα παραμένουν δια βίου.

Έτσι, στην οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα B, παρατηρούνται πολύ ισχυρές T-λεμφοκυτταρικές αντιδράσεις, έναντι πολλαπλών επιτόπων του ιού της ηπατίτιδας B στο περιφερικό αίμα (65). Αυτές περιλαμβάνουν τόσο τα CD4<sup>+</sup> βοηθητικά-T λεμφοκύτταρα (T-helper lymphocytes) κλάσεως II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC, class-II restricted), όσο και τα CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) κλάσεως I του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC, class-I restricted). Ιδιαίτερα ισχυρές παρουσιάζονται οι CD4<sup>+</sup> βοηθητικές τάξεως II-εξαρτώμενες αντιδράσεις εναντίον του HBcAg (πυρηνοκαψίδιο) και του HBeAg και λιγότερο ισχυρές έναντι των πρωτεϊνών του φακέλλου. Οι αντιδράσεις έναντι του HBcAg παίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο για την κάθαρση τελικά του ιού. Επιπλέον, οι CTL τάξεως I-εξαρτώμενες αντιδράσεις έναντι των πρωτεϊνών του φακέλλου και της HBV πολυμεράσης είναι εξαιρετικά έντονες.

Αντίθετα, στη χρόνια ηπατίτιδα B, οι CD4<sup>+</sup> βοηθητικές τάξεως II-εξαρτώμενες, όπως και οι CTL τάξεως I-εξαρτώμενες αντιδράσεις είναι πολύ περιορισμένες έναντι όλων των αντιγόνων. Παρατηρείται βέβαια

έντονη Th1 (T-helper 1) αντίδραση έναντι των αντιγόνων του πυρηνοκαψιδίου και του φακέλλου του ιού στο ενδοηπατικό λεμφομονοκυτταρικό κυτταρικό διήθημα. Επίσης, κατά τη διάρκεια εξάρσεων της χρόνιας ηπατίτιδας Β, παρατηρείται αύξηση της έντασης της Τ-λεμφοκυτταρικής αντίδρασης έναντι των αντιγόνων του πυρηνοκαψιδίου, καθώς και των CD8<sup>+</sup>CTL αντιδράσεων, που συχνά οδηγεί σε κάθαρση της λοίμωξης.

Η χρόνια ΗΒεΑg αρνητική ηπατίτιδα Β αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή της νόσου διεθνώς (59, 61). Όμως, παρά την πρόοδο στην κατανόηση της επιδημιολογίας και της φυσικής πορείας της χρόνιας ΗΒεΑg αρνητικής μορφής της ΗΒV λοίμωξης, δεν έχουν καταστεί ακόμη κατανοητοί οι ανοσοπαθογενετικοί μηχανισμοί πρόκλησης ηπατικής νεκροφλεγμονής σε περίπου 1/3 των χρονίως πασχόντων. Οι μελέτες των περιφερικών ή ηπατικών ανοσιακών αποκρίσεων των ασθενών αυτών είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Επιπλέον, δεν έχει ακόμη επαρκώς διευκρινισθεί γιατί το μεγαλύτερο ποσοστό των ανενεργών ΗΒsAg φορέων είναι ικανοί να διατηρούν πολύ χαμηλά επίπεδα ιικού (ΗΒV) πολλαπλασιασμού και ελάχιστες ηπατικές αλλοιώσεις για δεκαετίες ή και ισοβίως.

## **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Ο σκοπός λοιπόν της μελέτης ήταν η ανάλυση της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης ασθενών με χρόνια ΗΒεΑg αρνητική ηπατίτιδα Β (χρόνια νόσος αλλά και ασυμπτωματικοί φορείς) και η σύγκριση των αντιδράσεων αυτών με τις ανοσιακές απαντήσεις ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β αλλά και υγιών ατόμων.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι ανοσιακές απαντήσεις των CD4 και CD8 λεμφοκυττάρων σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του HBV, δηλαδή στην ΗΒcΑg και ΗΒsΑg, αλλά και σε συνθετικά αλληλοεπικαλυπτόμενα πεπτίδια μήκους 20 αμινοξέων τα οποία αφορούν όλη την πρωτεΐνη ΗΒcΑg και σε συνθετικό αντιγονικό επίτοπο της ΗΒsΑg πρωτεΐνης (ΗΒsΑg 182-191).

## **ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **A. Ασθενείς**

Στη συγκεκριμένη μελέτη εντάχθηκαν **41** ασθενείς με χρόνια ΗΒεΑg αρνητική HBV λοίμωξη, **9** ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β (ALT>10 φορές της ανώτερης φυσιολογικής τιμής, anti-HBcIgM>1,5/IMX Abbott και κλινική συμπτωματολογία οξεία ηπατίτιδας, χωρίς ιστορικό χρόνιας HBV λοίμωξης ή άλλης συνυπάρχουσας ηπατοπάθειας) και **22** υγιείς ενήλικες ως ομάδα ελέγχου. Οι ασθενείς με ΗΒεΑg αρνητική χρόνια HBV λοίμωξη

είχαν HBsAg (+)/HBeAg (-) για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των έξι μηνών. Από αυτούς, οι **30** κατετάγησαν στην κατηγορία των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β (ALT > 1,5 φορές της ανώτερης φυσιολογικής τιμής σε δύο τουλάχιστον μετρήσεις και HBV DNA > 10<sup>5</sup> ιικά αντίγραφα (copies)/ml με PCR), ενώ οι **11** ήταν ασθενείς με χρόνια ανενεργό φορεία HBV (ALT επανειλημμένα φυσιολογική στις μετρήσεις και HBV DNA < 3 X 10<sup>4</sup> copies/ml για χρονικό διάστημα τουλάχιστον ενός έτους). Για όλους τους συμμετέχοντες στη μελέτη καταγράφονταν τα δημογραφικά χαρακτηριστικά (ηλικία, φύλο, οικογενειακή κατάσταση) καθώς και πληροφορίες σχετιζόμενες με την ηπατίτιδα Β (χρονικό διάστημα οροθετικότητας, πιθανοί τρόποι μετάδοσης, πλήρες ατομικό και οικογενειακό αναμνηστικό). Όλοι ήταν Έλληνες (Καυκάσιοι) και σε κάθε συμμετέχοντα γινόταν αιμοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στον **πίνακα 1** παρατίθενται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των αρρώστων με χρόνια ηπατίτιδα Β.

**Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β**

Αριθμός ασθενή (no)	Φύλο	Ημερομηνία γεννήσεως	Ηλικία	Τρόπος μετάδοσης του HBV	Τρέχουσα θεραπεία
1	A	1946	54	Ενδοοικογενειακή	Lamivudine
2	A	1951	49	Άγνωστος	Lamivudine
3	A	1931	69	Άγνωστος	Lamivudine
4	A	1940	60	HBsAg(+) σύζυγος	Lamivudine
5	A	1933	67	HBsAg(+) σύζυγος	Καμία
6	A			Άγνωστος	
7	A	1963	37	Άγνωστος	Lamivudine
8	A	1946	54	Άγνωστος	Καμία/naive
9	A	1937	63	Άγνωστος	Καμία/naive
10	A	1949	51	Ενδοοικογενειακή	Entecavir
11	A	1940	60	Άγνωστος	Καμία
12	A	1936	64	HBsAg(+) σύζυγος	Καμία
13	A	1935	65	Άγνωστος	Lamivudine
14	A	1941	59	Άγνωστος	Καμία
15	A	1941	59	Άγνωστος	Καμία
16	A	1942	59	Κάθετη	Καμία/naive
17	A	1952	49	Ενδοοικογενειακή	Καμία/naive
18	A	1954	47	Ενδοοικογενειακή	Καμία/naive
19	A	1963	38	Κάθετη	Καμία
20	A	1948	53	Άγνωστος	Καμία/naive
21	A	1947	54	Άγνωστος	Καμία
22	A	1951	50	HBsAg(+) σύζυγος	Καμία
23	A	1954	47	Ενδοοικογενειακή	Καμία/naive
24	A	1966	35	Κάθετη	Καμία/naive
25	Γ	1945	56	Κάθετη	Καμία/naive
26	A	1949	52	Ενδοοικογενειακή	Καμία
27	A	1952	50	Ενδοοικογενειακή	Καμία/naive
28	Γ	1950	52	Ενδοοικογενειακή	Καμία
29	A	1930	72	Άγνωστος	Καμία
30	A	1943	59	Άγνωστος	Καμία

Οι χρόνιοι ασυμπτωματικοί φορείς δεν είχαν υποβληθεί έως τώρα σε κάποια θεραπευτική αντιμετώπιση, ενώ οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β είτε ήταν χωρίς θεραπεία μέχρι στιγμής (naive), είτε παρουσίαζαν έξαρση μετά από διακοπή προηγούμενης θεραπείας (χρονικό διάστημα από ολοκλήρωση θεραπείας μεγαλύτερο από 6 μήνες), είτε λόγω ανάπτυξης αντοχής στη χορηγούμενη θεραπεία (κυρίως λαμβουδίνη).

Στον **πίνακα 2** παρατίθενται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των αρρώστων με ασυμπτωματική φορεία HBsAg.

**Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά ασθενών με ασυμπτωματική φορεία HBsAg**

Αριθμός ασθενή (no)	Φύλο	Ημερομηνία γεννήσεως	Ηλικία	Τρόπος μετάδοσης του HBV
<b>1</b>	A	1946	54	Άγνωστος
<b>2</b>	Γ	1948	52	Ενδοοικογενειακή
<b>3</b>	A	1957	43	Ενδοοικογενειακή
<b>4</b>	A	1957	43	Άγνωστος
<b>5</b>	A	1935	65	Άγνωστος
<b>6</b>	Γ	1970	31	Μετάγγιση
<b>7</b>	Γ	1947	54	Άγνωστος
<b>8</b>	A	1956	45	Άγνωστος
<b>9</b>	A	1953	48	Άγνωστος
<b>10</b>	A	1944	57	Άγνωστος
<b>11</b>	A	1979	22	Κάθετη

ενώ στον **πίνακα 3** αυτά των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β.

**Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β**

Αριθμός ασθενή (no)	Φύλο	Ημερομηνία γεννήσεως	Ηλικία	Τρόπος μετάδοσης του HBV
1	A	1967	33	
2	Γ	1966	35	
3	A	1973	28	
4	A	1924	77	
5	A	1970	31	
6	A	1939	63	
7	Γ	1974	28	
8	A	1971	32	
9	A	1968	35	

Κριτήρια αποκλεισμού ένταξης στη μελέτη αποτελούσαν η συνύπαρξη ηπατοπάθειας άλλης αιτιολογίας, όπως χρόνια ηπατίτιδα C, χρόνια ηπατίτιδα B/D, αλκοολική ηπατοπάθεια, αυτοάνοση ηπατίτιδα, χολοστατικά νοσήματα του ήπατος (πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (PSC), πρωτοπαθής χολική κίρρωση (PBC)), συλλοίμωξη με HIV, μεταβολική νόσος του ήπατος, φαρμακευτική οξεία ή χρόνια ηπατοπάθεια, λήψη ανοσοκατασταλτικής αγωγής.

## **B. Μέθοδοι**

### **α. Εργαστηριακός έλεγχος-Βιοψία ήπατος**

Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β αλλά και οι ασυμπτωματικοί φορείς και οι άρρωστοι με οξεία ηπατίτιδα Β υποβάλλονταν σε αιμοληψία κατά την οποία γινόταν προσδιορισμός των επιπέδων των αμινοτρανσφερασών, του

anti-HBcIgM, και του ιικού φορτίου του ιού της ηπατίτιδας B (HBV-DNA) με PCR (μέθοδος: Roche Monitor ή REAL-TIME PCR). Επίσης οι πρωτοθεραπευόμενοι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B (naive) υποβάλλοντο προ της έναρξης της θεραπευτικής αγωγής σε βιοψία ήπατος, στην οποία καθοριζόταν η έκταση της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας (grade) και της ίνωσης (stage) σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Ishak (71). Σε βιοψία ήπατος υποβάλλοντο επίσης οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B, εφόσον η προηγούμενη βιοψία απείχε δύο χρόνια ή περισσότερο από την παρούσα χρονική στιγμή.

### **β. Αντισώματα και αντιδραστήρια**

Χρησιμοποιήθηκαν: ορός phosphate buffer (phosphate buffer saline, PBS), ορός από έμβρυα μόσχου (fetal bovine serum, FBS), καλλιεργητικό μέσο RPMI, διάλυμα αντιβιοτικών (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) και φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) τα οποία αγοράστηκαν από την GIBCO (GIBCOBRL Laboratories, Grand Island, NY). Χρησιμοποιήθηκε επίσης παραφορμαλδεύδη η οποία αγοράστηκε από τη Merck καθώς και πλάκες νιτροκυτταρίνης Elispot 96 θέσεων από τη Millipore (Bedford, MA). Επίσης, Ficoll-Histopaque 1077-1, Phorbol 12 Myristate 13-Acetate (PMA), ιονομυκίνη, μπρεφελντίνη-A (BFA), διμεθυλικό σουλφοξείδιο (DMSO), αλβουμίνη από βόιο ορό (Bovine Serum Albumin, BSA) και αζίδιο του



νατρίου ( $\text{NaN}_3$ ) τα οποία αγοράστηκαν από τη SIGMA (St Louis, MO). Οι πλάκες 96 θέσεων με αποστρογγυλεμένη βάση για τις λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες αγοράστηκαν από την Costar (Cambridge, MA) και η [ $^3\text{H}$ ]-θυμιδίνη- με δραστηριότητα  $2\text{mCi/ml}$ - από την Amersham, Αγγλία.

Τα διαλύματα λύσης και διαπερατοποίησης για τον κυτταρομετρητή ροής (Facs lysing and permeabilizing solution) καθώς και τα συνδεδεμένα (conjugated) μονοκλωνικά αντισώματα αντι-CD3PerCP, αντι-CD8FITC, αντι-ανθρώπειο IFN- $\gamma$ PE καθώς και τα ισοτυπικά ταιριασμένα αρνητικά κοντρόλ τους, δηλαδή τα mouse IgG1PerCP, IgG1FITC και IgG2aPE αγοράστηκαν από την Becton Dickinson (BD). Το kit της ανθρωπείας IFN- $\gamma$  για την τεχνική Elispot, το οποίο περιείχε: αντι-ανθρώπειο αντίσωμα IFN- $\gamma$ , Tween-20, biotinylated δευτερεύον αντι-ανθρώπειο αντίσωμα IFN- $\gamma$ , στρεπταβιντίνη αλκαλική φωσφατάση και 5-bromo-4-chloro-3-indonyl-phosphate/4-nitrobluetetrazolium (BCIP/NT) αγοράστηκε από την R&D Systems, Inc (Minneapolis, MN).

Οι πρωτεΐνες HBsAg και HBcAg αποτέλεσαν ευγενική προσφορά του καθηγητή G. Hess (Roche Diagnostics, Mannheim, Γερμανία). Επιπλέον, 17 συνθετικά πεπτίδια με μήκος 20-32 αμινοξέα (aa) τα οποία εκάλυπταν όλο το μήκος της πρωτεΐνης HBcAg και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες, αποτέλεσαν ευγενική προσφορά των

καθηγητών W. F. Carman και W. Boner (Ινστιτούτο Ιολογίας, Πανεπιστήμιο Γλασκώβης, Γλασκώβη, Ηνωμένο Βασίλειο). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά πεπτίδια με μήκος 10-20 αμινοξέα (aa) από καλά περιγεγραμμένους επιτόπους συνδεδεμένους με το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (MHC-restricted) που αφορούσαν τις πρωτεΐνες HBsAg και HBcAg (**HBc28-47**: RDLLDTASALYREALESPFH, **HBc111-125**: GRETVIEYLVSFQVW, **HBc117-131**: EYLVSFQVWIRTPPA, **HBc120-139**: VSFQVWIRTPPAYRPPNAPI, **HBs182-191**: FFLLRILTI). Χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα συνθετικό πεπτίδιο του ιού Epstein-Barr (EBV), (GLCTLVAML, 9aa), ως θετικό κοντρόλ για την τεχνική Elispot. Τα πεπτίδια αυτά παρασκευάστηκαν από την Interactiva Biotechnologie GmbH, Γερμανία και φυλάχθηκαν στους -20°C σε υποπολλαπλάσια (aliquots) με συγκέντρωση 1 mg/ml σε 1-2% DMSO.

#### **γ. Απομόνωση λεμφοκυττάρων-Λεμφοκυτταρική καλλιέργεια**

Από κάθε ασθενή συλλέγονταν κάθε φορά 20 ml φρέσκου ηπαρινισμένου ολικού αίματος, από το οποίο απομονώνονταν τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells) με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης βαθμιδωτής πυκνότητας (gradient centrifugation) (72).

Για να γίνει αυτό, τοποθετούσαμε 10 ml ηπαρινισμένου αίματος (100 μl ηπαρίνης για κάθε 10 ml αίματος) σε σωληνάρια των 50 ml. Προσθέταμε ίση ποσότητα θρεπτικού υλικού (RPMI με αντιβιοτικά, δηλαδή 100 IU/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη) και αναμιγνύαμε καλά. Στη συνέχεια τοποθετούσαμε 3 ml διαλύματος ficoll-hyraque σε σωληνάρια των 15 ml. Προσθέταμε 10 ml από το μίγμα αίματος/RPMI-αντιβιοτικά στάγδην με μεγάλη προσοχή άνωθεν του διαλύματος ficoll-hyraque, προσπαθώντας να αποτρέψουμε όσο το δυνατόν την ανάμιξη των δύο υλικών. Βεβαιωνόμασταν ότι τα φιαλίδια ήταν ισοζυγισμένα και φυγοκεντρούσαμε για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία 20°C και ταχύτητα 400-800g χωρίς φρένο. Στην πρώτη αυτή φυγοκέντρωση αποφεύγεται η απότομη επιτάχυνση ή επιβράδυνση, έτσι ώστε να μην διαταραχθεί η δημιουργία της στιβάδας. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης παίρναμε την υπερκείμενη της ficoll στιβάδα (προσέχοντας να μην πάρουμε ούτε ficoll ούτε αιμοπετάλια) και μεταφέραμε σε νέο σωληνάριο των 15 ml, όπου προσθέταμε πάλι διάλυμα RPMI-αντιβιοτικά και αναμιγνύαμε καλά. Ακολουθούσε η δεύτερη φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 20°C και ταχύτητα 250-450g, με χρήση φρένου αυτή τη φορά. Τα κύτταρα έχουν τώρα συγκεντρωθεί στο κάτω μέρος των σωληναρίων δημιουργώντας στιβάδα (**pellet**). Αφαιρούσαμε το υπερκείμενο, αφήνοντας μόνο 1-2 ml για να διαλυθεί η

στιβάδα. Στη φάση αυτή μπορούσαμε να μεταφέρουμε τα κύτταρα από τα τέσσερα σωληνάρια σε ένα και στη συνέχεια προσθέταμε διάλυμα RPMI-αντιβιοτικά έτσι ώστε η στιβάδα να διαλυθεί εντελώς. Φυγοκεντρούσαμε για τελευταία φορά για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 20°C και ταχύτητα 250-450g, με χρήση φρένου. Αφαιρούσαμε το υπερκείμενο και αναμιγνύαμε το pellet πολύ καλά με 1-2 ml RPMI-10%FBS (fetal bovine serum, ο οποίος έχει θερμανθεί για 40 λεπτά στους 56°C ώστε να αδρανοποιηθεί και ο οποίος επιτρέπει την ανάπτυξη των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων). Για να μετρήσουμε τα κύτταρα, αναμιγνύαμε 10 μl από το διάλυμα με 190 μl διαλύματος trypan blue. Τοποθετούσαμε το δείγμα στην ειδική πλάκα Neubauer και μετρούσαμε τα κύτταρα. Στη συνέχεια, τα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνταν σε ειδικές πλάκες με 96 θέσεις (96-well plates), όπου τοποθετούνταν σε συγκέντρωση  $10^6$  κύτταρα/ml ή  $10^5$  κύτταρα/θέση για 7 ημέρες σε κλίβανο υγρασίας 5% CO<sub>2</sub> σε θερμοκρασία 37°C. Για τη διέγερση των λεμφοκυττάρων χρησιμοποιούνταν: α) μόνο θρεπτικό υλικό ως αρνητικός μάρτυρας, β) ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του ιού (HBcAg, HBsAg) ή γ) συνθετικά αλληλοεπικαλυπτόμενα πεπτίδια. Όλα τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνταν σε συγκέντρωση 20 μg/ml (τελική συγκέντρωση στην καλλιεργητική πλάκα: 10 μg/ml). Κάθε πεπτίδιο χρησιμοποιούνταν σε τριπλέτες, δηλαδή ετοποθετείτο σε τρία συνεχόμενα

πηγαδάκια (wells) της καλλιεργητικής πλάκας. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι: HBcore 1-23, 4-33, 14-43, 24-53, 28-47 (εταιρεία Interactiva), 34-63, 44-73, 54-83, 64-93, 74-103, 84-113, 94-113, 104-123, 111-125 (εταιρεία Interactiva), 114-133, 117-131 (εταιρεία Interactiva), 120-139 (εταιρεία Interactiva), 124-153, 134-165, 144-175 και 156-185. Όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν επίσης ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του ιού (HBcAg, HBsAg) καθώς και συνθετικός αντιγονικός επίτοπος της πρωτεΐνης HBsAg (HBsAg 182-191) (εταιρεία Interactiva).

Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων υπολογιζόταν μετά από μέτρηση της ενσωματωμένης ραδιενεργού θυμιδίνης ( $^3\text{H}$ - Thymidine). Η θυμιδίνη προσετίθετο στα κύτταρα την έκτη ημέρα της καλλιέργειας σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{Ci/ml}$  ή 1 $\mu\text{Ci}/\theta\acute{\epsilon}\sigma\eta$ . Σε 18 ώρες μετά την προσθήκη της θυμιδίνης γινόταν η συγκομιδή των κυττάρων (harvesting) με αυτοματοποιημένο harvester (Micro96 Harvester, Skatron Instruments AS, Lier, Νορβηγία). Για κάθε ασθενή ή υγιή μάρτυρα υπολογιζόταν ο δείκτης διέγερσης (*stimulation index, SI*) ο οποίος ορίστηκε ως ο λόγος μετρούμενης ραδιενεργού ακτινοβολίας (μέση τιμή κρούσεων (cpm) ανά λεπτό) λεμφοκυττάρων μετά από προσθήκη των ειδικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων του ιού προς την ακτινοβολία των μη διεγερμένων

λεμφοκυττάρων. Τιμές  $SI \geq 2$  θεωρούνταν ενδεικτικές πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων (θετική απάντηση).

#### **δ. Ενδοκυττάρια μέτρηση κυτταροκινών**

Περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών ή υγιών μαρτύρων καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI σε ειδικές πλάκες με 96 θέσεις (96-well plates), όπου τοποθετούνταν σε συγκέντρωση  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml για 16 ώρες σε κλίβανο υγρασίας 5% CO<sub>2</sub> σε θερμοκρασία 37°C. Για τη διέγερση των λεμφοκυττάρων χρησιμοποιούνταν: α) μόνο θρεπτικό υλικό ως αρνητικός μάρτυρας, β) μη ειδικοί διεγέρτες των T-λεμφοκυττάρων, όπως PMA (σε συγκέντρωση 25 ng/ml) και ιονομυκίνη (σε συγκέντρωση 1 μg/ml) ή γ) πρωτεΐνες του ιού (HBsAg και HBcAg) ή συνθετικά πεπτίδια σε συγκέντρωση 10 μg/ml. Μία ώρα μετά την έναρξη της καλλιέργειας, προσθέταμε μπρεφελδίνη A (brefeldin A), για αναστολή της εξωκυττάρωσης πρωτεϊνών, σε συγκέντρωση 10 μg/ml. Μετά το τέλος της καλλιέργειας γινόταν χρώση των λεμφοκυττάρων με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι δεικτών επιφανείας των T-λεμφοκυττάρων (CD3, CD8), δηλαδή τα αντι-CD3PerCP και αντι-CD8FITC ή με τα αντίστοιχα ισοτυπικά αντισώματα, δηλαδή τα IgG1PerCP και IgG1FITC αντίστοιχα. Μετά την τοποθέτηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων τα κύτταρα τοποθετούνταν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τα

κύτταρα πλένονταν μία φορά με PBS που περιέχει 0,5% BSA και 0,1% NaN<sub>3</sub> και γινόταν διαπερατοποίηση της μεμβράνης τους με το ειδικό διάλυμα (FACS Lysing and Permeabilizing Solution). Μετά από ένα δεύτερο πλύσιμο, γινόταν χρώση των κυττάρων με ειδικό αντίσωμα έναντι της ενδοκυττάριας ιντερφερόνης- $\gamma$  (αντι-ανθρώπειν IFN- $\gamma$ PE) ή το αντίστοιχο ισοτυπικό αντίσωμα ως μάρτυρα, δηλαδή το IgG2aPE και τα κύτταρα τοποθετούνταν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, σταθεροποιούνταν με PBS που περιείχε παραφορμαλδεΐδη 1% και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Η ανάλυση των κυττάρων γινόταν με τη βοήθεια κυτταρομετρητή ροής (Facs scan, Becton Dickinson) με τη χρήση ειδικού προγράμματος λογισμικού (Cell Quest, BD). Με τη βοήθεια του λογισμικού αυτού, μετρούνταν οι υποπληθυσμοί των T λεμφοκυττάρων (CD4 και CD8) καθώς και το αντίστοιχο ποσοστό τους που εμφάνιζε ενδοκυττάρια παραγωγή ιντερφερόνης- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Για κάθε ασθενή ή μάρτυρα λαμβάνονταν 10000 events και τα λεμφοκύτταρα αναλύονταν (were gated) ανάλογα με το μέγεθος και την κοκκίωσή τους. Από τους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων επιλέγονταν τα CD3PerCP<sup>+</sup> κύτταρα (T-λεμφοκύτταρα) και αναλύονταν περαιτέρω σε

CD8<sup>+</sup> ή CD8<sup>-</sup> κύτταρα. Στη συνέχεια υπολογιζόταν το ποσοστό των IFN-γ<sup>+</sup> κυττάρων στους υποπληθυσμούς των CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> και CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> κυττάρων με τη χρήση του δείκτη παραγωγής IFN-γ (IFN-γ production index) (73). Το ίδιο γινόταν και για τα CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> και CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> κύτταρα.

#### Δείκτης παραγωγής IFN-γ (%)

$$= \frac{\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+}{(\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+) + (\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^-)} \times 100$$

#### ε. Μέθοδος IFN-γ Elispot

Η παραγωγή IFN-γ από τα περιφερικά λεμφοκύτταρα μετρήθηκε επίσης για κάποιους από τους ασθενείς και με τη μέθοδο ELISPOT για μέτρηση της ανθρώπινης IFN-γ, με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, σε πλάκες νιτροκυτταρίνης 96 θέσεων προστέθηκε σε κάθε θέση 100 μl διαλυμένο αντι-ανθρώπειο αντίσωμα έναντι της IFN-γ και οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο υγρασίας 5% CO<sub>2</sub> σε θερμοκρασία 37°C για όλο το βράδυ. Στη συνέχεια, οι πλάκες πλύθηκαν τρεις φορές με PBS/0,05% Tween 20 (ρυθμιστικό διάλυμα/washing buffer) και ακολούθησε προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι/θέση 200 μl PBS/1% BSA για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ακολούθησαν τρία ακόμη πλυσίματα, σε κάθε θέση προστέθηκε 200 μl πλήρους RPMI ως ότου ετοιμαστούν τα κύτταρα για καλλιέργεια. Στη



συνέχεια, πρόσφατα απομονωμένα PBMCs προστέθηκαν σε συγκέντρωση  $3 \times 10^5$  κύτταρα/θέση. Για τη διέγερση των PBMCs χρησιμοποιήθηκαν: α) μόνο θρεπτικό υλικό ως αρνητικός μάρτυρας, β) ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του HBV (συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$ ) ή γ) ένα συνθετικό πεπτίδιο του EBV (συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$ ) ως θετικός μάρτυρας. Κάθε υλικό χρησιμοποιούνταν σε δύο συνεχόμενες θέσεις της πλάκας (duplicates) και ακολούθως τα κύτταρα επωάζονταν για 16 ώρες σε συνθήκες  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . Μετά από τέσσερα διαδοχικά πλυσίματα με το ρυθμιστικό διάλυμα, προστέθηκαν σε κάθε θέση 100  $\mu\text{l}$  biotinylated δευτερεύοντος αντι-ανθρώπινου αντισώματος IFN- $\gamma$ . Μετά από αυτό, οι πλάκες τοποθετούνταν σε θερμοκρασία  $4^\circ\text{C}$  για όλο το βράδυ, οπότε στη συνέχεια πλένονταν ξανά 3 φορές και μετά προσετίθετο σε κάθε πηγαδάκι 100  $\mu\text{l}$  στρεπταβιντίνης/αλκαλικής φωσφατάσης για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πλάκες πλένονταν τρεις φορές ακόμη με το ρυθμιστικό διάλυμα, ξεπλένονταν με απεσταγμένο νερό και προστίθενταν σε κάθε θέση 100  $\mu\text{l}$  BCIP/NT για 30 λεπτά και οι πλάκες τοποθετούνταν στο σκοτάδι. Διακόπταμε τη χρωματομετρική αντίδραση πλένοντας τις πλάκες με νερό βρύσης και ακολούθως τις στεγνώναμε με θερμό αέρα. Στις πλάκες αναπτύσσονταν τότε σημάδια (*spots*), τα οποία αντιστοιχούσαν στα κύτταρα τα οποία παράγουν IFN- $\gamma$  (*spot forming cells, SFCs*). Τα σημάδια

μετριόνταν από δύο ανεξάρτητους μεταξύ τους ερευνητές. Ακολούθως, για να υπολογίσουμε την παραγωγή IFN- $\gamma$  από κάθε θέση αφαιρούσαμε τα σημάδια στην περιοχή που υπήρχε μόνο θρεπτικό υλικό από τα σημάδια στις θέσεις που είχε προστεθεί και πεπτίδιο/πρωτεΐνη. ***Η απάντηση θεωρείτο θετική όταν βρίσκονται >5SFCs/θέση.***

#### **στ. Ορολογικές αντιδράσεις/μέθοδοι υπολογισμού του HBV-DNA**

Η ανίχνευση στον ορό HBsAg, anti-HBc, HBeAg, anti-HBe και anti-HBs γινόταν με εμπορικά διαθέσιμες ανοσολογικές τεχνικές μικροσωματιδίων (AXSYM, Abbott Laboratories, Chicago, IL). Το IgM anti-HBc μετριόταν με μία ημιποσοτική ενζυμική ανοσολογική μέθοδο μικροσωματιδίων (MEIA-IMx Core-M, Abbott Laboratories, Chicago, IL). Η μέτρηση του HBV-DNA στον ορό πραγματοποιούνταν με μία ποσοτική μέθοδο αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) (HBV Amplicor-Monitor, Roche) με ευαισθησία 400 ιικά αντίγραφα/ml (copies/ml) ή 2,6 δεκαδικούς λογαρίθμους (logs<sub>10</sub>).

#### **ζ. Στατιστική ανάλυση**

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των μελετώμενων ομάδων έγινε με τις μεθόδους/δοκιμασίες  $\chi^2$  ή Fischer's exact test (για σύγκριση των ποιοτικών μεταβλητών/αναλογιών μεταξύ των ομάδων) και Mann-Whitney ή Student's test (για τη σύγκριση συνεχόμενων ποσοτικών μεταβλητών). Η

στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS 10,0 (SPSS Inc, Chicago, IL), ενώ το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **A. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών**

Στον **πίνακα 4** φαίνονται τα χαρακτηριστικά των τριών ομάδων (χρονία ηπατίτιδα Β, ασυμπτωματικοί φορείς, οξεία ηπατίτιδα Β) όσον αφορά το φύλο, την ηλικία, τη διάμεση και μέση τιμή της ALT, του anti-HBcIgM και του HBV-DNA.

**Πίνακας 4. Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη ή οξεία ηπατίτιδα Β**

	ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β	ΑΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ HBV	ΟΞΕΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β
<b>Αριθμός</b>	30	11	9
<b>Φύλο (Α/Γ)</b>	28/30	8/11	7/9
<b>(άνδρες %)</b>	(93%)	(73%)	(78%)
<b>Ηλικία (έτη)</b>			
<b>διάμεση τιμή</b>	54 (35-71)	48 (22-65)	33(28-77)
<b>μέση τιμή</b>	54,5±9*	46,7±12	40,2±17,4
<b>ALT (IU/L)</b>			
<b>διάμεση τιμή</b>	126 (27-1115)	18 (9-40)	977 (541-3445)
<b>μέση τιμή</b>	230,2±255,3**	19,1±8,4	1644,6±1096
<b>HBV-DNA</b>			
<b>(log10 copies/ml)</b>	6,79	2,7	ND
<b>διάμεση τιμή</b>	(3,78-9,13)	(2,6-3,97)	
<b>μέση τιμή</b>	6,6±1,4*** (6,26±1,43)	3,08±2,7 (2,99±0,56)	ND
<b>IgM antiHBc</b>			

<b>διάμεση τιμή</b>	0,46 (0,18-1,93)	0,15 (0,05-0,46)	2,4 (1,94-2,82)
<b>μέση τιμή</b>	0,64±0,47****	0,16±0,11	2,44±0,31
<b>Βιοψία ήπατος (φλεγμονή/grade HAI score)</b>			
<b>διάμεση τιμή</b>	6,5 (2-17)	ND	ND
<b>μέση τιμή</b>	7,1±3,4	ND	ND
<b>Βιοψία ήπατος (ίνωση/stage)</b>			
<b>διάμεση τιμή</b>	3 (1-6)	ND	ND
<b>μέση τιμή</b>	3,1±1,5	ND	ND

Τα χαρακτηριστικά εκφράζονται σαν μέση τιμή (mean) ± 1 σταθερή διακύμανση (standard deviation).

\***p=0,04** σε σύγκριση με τους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα, ενώ σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς φορείς δεν ήταν στατιστικά σημαντική διαφορά (**p=0,07**). Επίσης δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασυμπτωματικών φορέων και των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα (**p=0,36**).

\*\***p<0,005** [τόσο στη σύγκριση των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β και των ασυμπτωματικών φορέων (**p=0,000094**) όσο και μεταξύ των ασθενών με χρόνια και οξεία ηπατίτιδα Β (**p=0,0046**), αλλά και των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς φορείς (**p=0,002**)].

**\*\*\* $p < 0,0005$ .**

**\*\*\*\* $p < 0,0005$**  κατά τη σύγκριση ασυμπτωματικών φορέων με ασθενείς με οξεία ή χρόνια ηπατίτιδα Β αλλά και κατά τη σύγκριση των ασθενών με οξεία και χρόνια ηπατίτιδα Β μεταξύ τους.

Συντομογραφίες: ND: not done (μη γενόμενο), ALT: πυροσταφυλική τρανσαμινάση.

Αυτά τα οποία προκύπτουν από την παράθεση και ανάλυση των δημογραφικών στοιχείων είναι:

**α)** η μεγαλύτερη πλειοψηφία των ασθενών με ηπατίτιδα Β ήταν άνδρες (93%, 73% και 78% στην κατηγορία της χρόνιας ηπατίτιδας Β, των ασυμπτωματικών φορέων Β και της οξείας ηπατίτιδας Β αντίστοιχα) χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων,

**β)** οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β είχαν μεγαλύτερη ηλικία (μέση ηλικία 54 έτη), τόσο από τους ασυμπτωματικούς φορείς (μέση ηλικία 47 έτη) όσο και από τους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β (μέση ηλικία 40 έτη),

**γ)** όπως αναμενόταν, οι ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β είχαν στατιστικά μεγαλύτερη τιμή ALT από τους ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη ( $p=0,005$ ) και τους ασυμπτωματικούς φορείς ( $p=0,002$ ), ενώ στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά των επιπέδων της ALT μεταξύ των αρρώστων με χρόνια HBV λοίμωξη και των ασυμπτωματικών HBsAg φορέων ( $p < 0,0005$ ),

**δ)** ευνόητο επίσης ήταν ότι οι ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β θα είχαν πολύ υψηλότερα επίπεδα anti-HBcIgM τόσο σε σχέση με τους αρρώστους με

χρονία ηπατίτιδα Β όσο και συγκριτικά με τους ασυμπτωματικούς φορείς ( $p < 0,00005$ ).

ε) τα επίπεδα του HBV-DNA, μετρημένα με ευαίσθητη τεχνική PCR ήταν στατιστικά μεγαλύτερα, όπως επίσης αναμενόταν, στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς φορείς ( $p < 0,0005$ ).

Τέλος, στ) στοιχεία για βιοψία ήπατος υπάρχουν σε 24/30 (80%) ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, όπου η μέση τιμή του βαθμού (grade) της νεκροφλεγμονής (histologic activity index, HAI) και του σταδίου (stage) της ίνωσης ήταν 7,1 και 3,1 αντίστοιχα, σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης βιοψίας ήπατος Ishak. Από τους ασθενείς με HBsAg ασυμπτωματική φορία, σε βιοψία ήπατος είχαν υποβληθεί μόνο οι 3/11 και διαπιστώθηκαν ελάχιστες αλλοιώσεις νεκροφλεγμονής και ίνωσης (τα στοιχεία αυτά δεν παρατίθενται). Οι ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα δεν υπεβλήθησαν, όπως είναι φυσικό σε βιοψία ήπατος.

## **B. Απομόνωση λεμφοκυττάρων (λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες)**

### **α. Ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι αλληλοεπικαλυπτόμενων HBc πεπτιδίων**

Οι αποκρίσεις από τις λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες υπολογίστηκαν μετά από διέγερση των κυττάρων με:

α) ολικές πρωτεΐνες του ιού HBV (HBsAg, HBcAg),

β) συνθετικά πεπτίδια 20-32 αμινοξέων (aa), τα οποία εκάλυπταν όλη την πρωτεΐνη HBV core, καθώς και

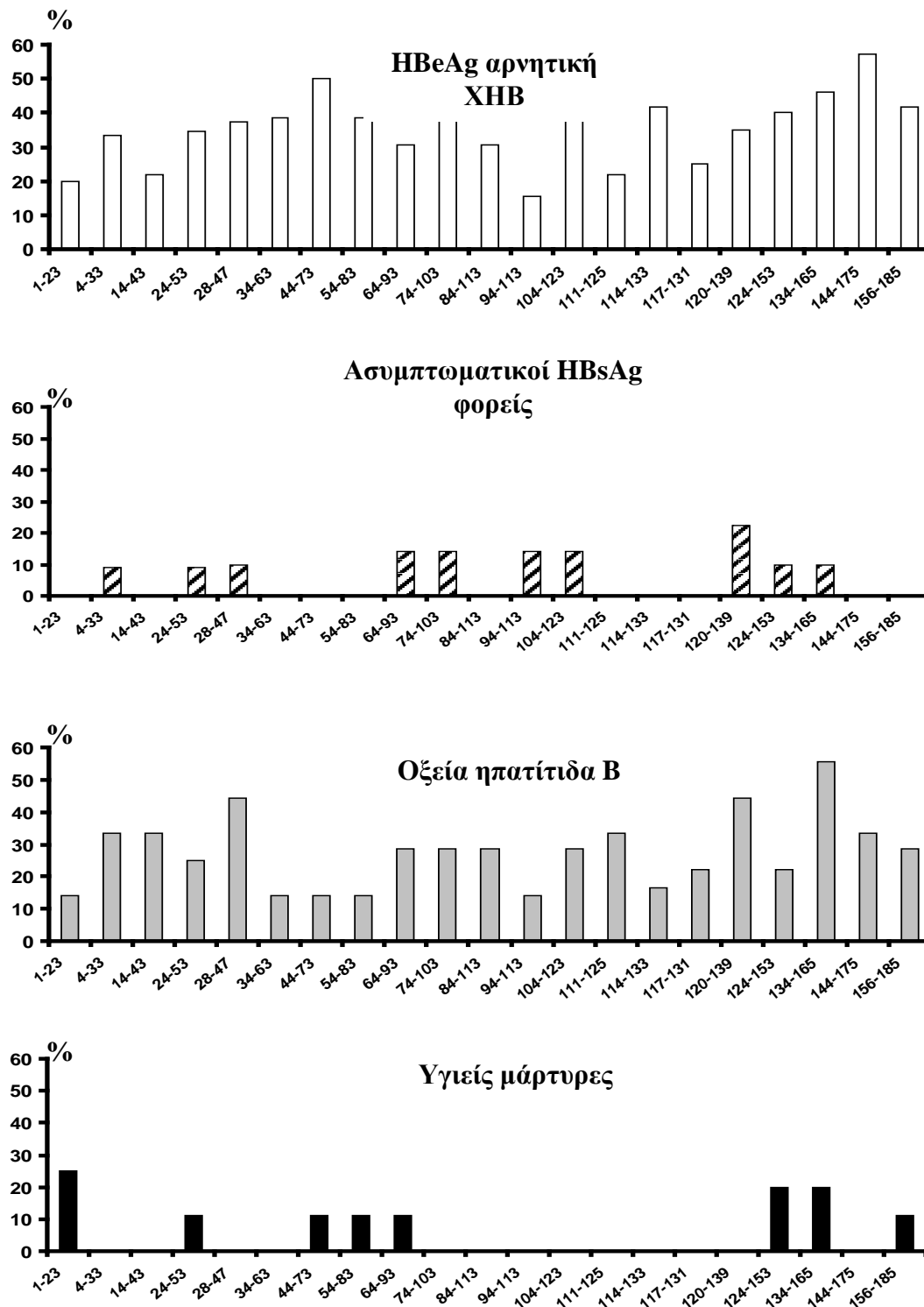
γ) μικρά συνθετικά πεπτίδια 10-20 aa τα οποία αντιπροσώπευαν γνωστούς MHC-II αντιγονικούς επιτόπους από τις πρωτεΐνες HBV core και

δ) ένα συνθετικό πεπτίδιο το οποίο αποτελεί γνωστό αντιγονικό επίτοπο του HBsAg (HBs 182-191).

Στο σχήμα 5, παρουσιάζεται το ποσοστό των ασθενών (HBeAg αρνητική χρόνια ηπατίτιδα Β (XHB), ασυμπτωματικοί HBsAg φορείς και οξεία ηπατίτιδα Β) καθώς και των υγιών μαρτύρων που παρουσίασαν ανοσολογικές αποκρίσεις μετά από τη διέγερση με αλληλοεπικαλυπτόμενα HBc πεπτίδια. Όπως φαίνεται, οι ασθενείς με HBeAg (-) XHB παρουσίαζαν απαντήσεις (SI>2) σε μία πλειάδα HBc πεπτιδίων, ανοσιακή απόκριση που μοιάζει έντονα με αυτή των αρρώστων με οξεία ηπατίτιδα Β. Αντίθετα, οι ασυμπτωματικοί HBsAg φορείς καθώς και οι υγιείς μάρτυρες παρουσίασαν αποκρίσεις σε ελάχιστα HBc πεπτίδια. Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρατίθενται και στους πίνακες 5 και 6.



**Σχήμα 5. Συχνότητα (%) των ανοσιακών απαντήσεων των περιφερικών λεμφοκυττάρων (PBMCs) έναντι 21 αλληλοεπικαλυπτόμενων συνθετικών πεπτιδίων της περιοχής ΗΒsAg, στις διαφορετικές ομάδες ασθενών και υγιών μαρτύρων, μετά από 7ήμερη in vitro καλλιέργεια**



**Πίνακας 5. Λεμφοκυτταρικές αντιδράσεις (ποσοστά %) έναντι αλληλοεπικαλυπτόμενων ΗΒc πεπτιδίων**

Ομάδες ασθενών	HBc1-23	HBc4-33	HBc14-43	HBc24-53	Interactiva HBc28-47	HBc34-63	HBc44-73	HBc54-83	HBc64-93
Υγιείς μάρτυρες	25	0	0	11,111111	0	0	11,111111	11,111111	11,111111
HBsAg φορείς	0	9,0909091	0	9,0909091	10	0	0	0	14,285714
ΧΗΒ	20,00	33,33	21,74	34,62	37,50	38,46	50,00	38,46	30,77
Οξεία Ηπατίτιδα Β	14	33	33	25	44	14	14	14	29

HBc74-103	HBc84-113	HBc94-113	HBc104-123	Interactiva HBc111-125	HBc114-133	Interactiva HBc117-131	Interactiva HBc120-139	HBc124-153	HBc134-165
0	0	0	0	0	0	0	0	20	20
14,285714	0	14,285714	14,285714	0	0	0	22,222222	10	10
46,15	30,77	15,38	40,00	21,74	41,67	25,00	34,78	40,00	46,15
29	29	14	29	33	17	22	44	22	56

HBc144-175	HBc156-185
0	11,111111
0	0
57,14	41,67
33	29

**Πίνακας 6. Λεμφοκυτταρικές αντιδράσεις (Stimulation index, SI) έναντι αλληλοεπικαλυπτόμενων ΗΒc πεπτιδίων**

Ομάδες	HBc1-23	HBc4-33	HBc14-43	HBc24-53	Interactiva HBc28-47	HBc34-63	HBc44-73	HBc54-83
	(P4) 1-23	(P5) 4-33	(P6) 14-43	(P7) 24-53	(IP8) 28-47	(P8) 34-63	(P9) 44-73	(P10) 54-83
Υγιείς μάρτυρες	9,133693	1,4377	0,5994	3,6016	1,3211	1,1334	2,2225	3,0004
Φορείς HBsAg	0,381641	1,1482	0,3464	1,2896	2,7835	0,1365	0,2403	0,4146
ΧΗΒ	3,291648	5,0922	5,6182	9,4428	11,976	6,5159	16,563	6,9582
Οξεία ηπατ. Β	0,954383	8,8976	8,6318	4,5241	6,8961	5,1898	3,2699	2,9834

Ομάδες	HBc 64-93	HBc74-103	HBc84-113	HBc94-113	HBc104-123	Interactiva HBc111-125	HBc114-133
	(P11) 64-93	(P12) 74-103	(P13) 84-113	(P14) 94-113	(P15) 104-123	(IP6) 111-125	(P16) 114-133
Υγιείς μάρτυρες	2,4542	1,3075	1,4791	0,3334	1,4445	1,6758	1,1429
Φορείς HBsAg	0,7873	0,7428	0,3626	0,5717	0,6861	0,5207	0,2622
ΧΗΒ	14,562	19,217	27,67	1,0412	3,6359	6,8207	3,1556
Οξεία ηπατ. Β	4,6913	6,172	5,0362	1,1462	2,5677	2,2312	3,2422

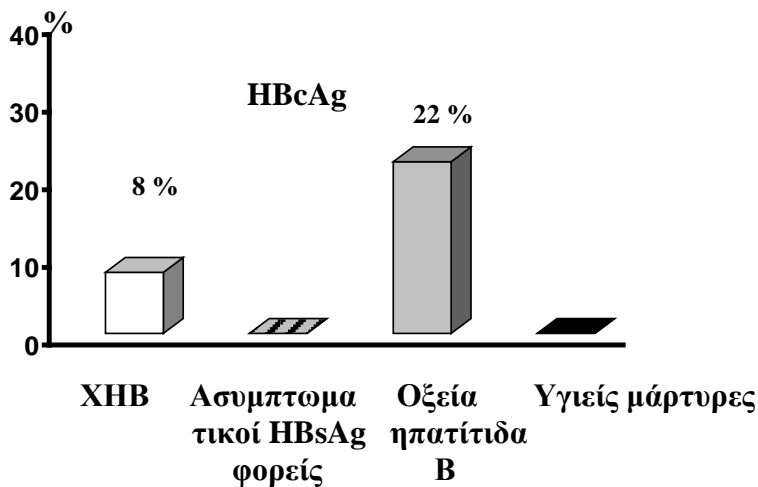
  

Ομάδες	Interactiva HBc117-131	Interactiva HBc120-139	HBc124-153	HBc134-165	HBc144-175	HBc156-185
	(IP7) 117-131	(IP9) 120-139	(P17) 124-153	(P18) 134-165	(P19) 144-175	(P20) 156-185
Υγιείς μάρτυρες	1,3109	0,9343	5,4901	4,5889	1,7662	2,562
Φορείς HBsAg	0,3131	1,5073	0,728	1,2687	0,4861	0,4529
ΧΗΒ	8,197	10,566	37,826	28,138	108,2	17,935
Οξεία ηπατ. Β	2,0982	2,3027	2,9689	8,7722	6,5746	3,067

### **β. Ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι της ολικής πρωτεΐνης HBc**

Τα ανωτέρω αποτελέσματα αφορούσαν, όπως προαναφέρθηκε τα αλληλοεπικαλυπτόμενα HBc πεπτίδια. Όσον αφορά όμως την ολική πρωτεΐνη HBc, μόνο οι άρρωστοι με οξεία ηπατίτιδα (22,2%) και οι άρρωστοι με HBeAg (-) ΧΗΒ (8%) παρουσίασαν κάποια ανοσιακή απόκριση, ενώ αντίθετα οι ασυμπτωματικοί HBsAg φορείς και οι υγιείς μάρτυρες δεν είχαν καμία εμφανή αντίδραση (0% αντίστοιχα), όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.

**Σχήμα 6. Ανοσιακές αποκρίσεις έναντι του HBcAg στις εξεταζόμενες ομάδες**

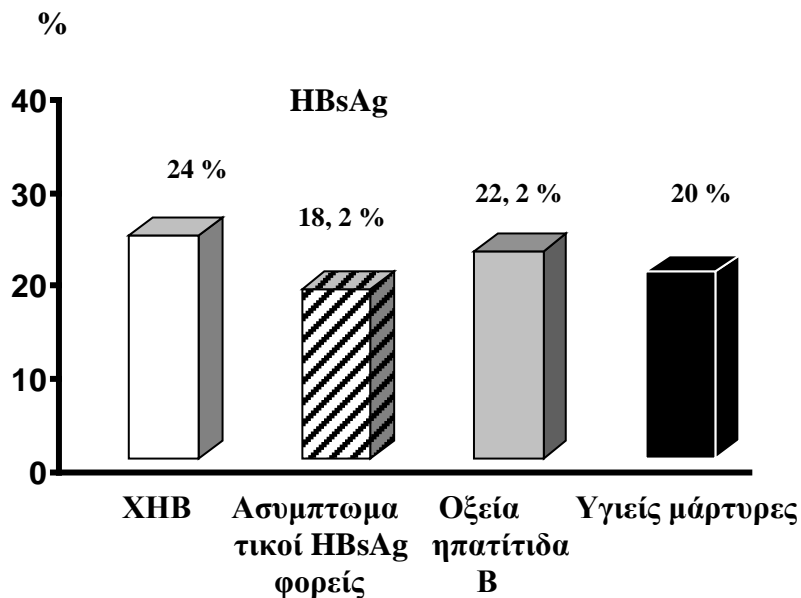


### **γ. Ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι της ολικής πρωτεΐνης HBs**

Αντίθετα με την ολική πρωτεΐνη HBc, οι ανοσιακές αποκρίσεις έναντι της ολικής πρωτεΐνης HBs δεν διέφεραν μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών, δηλαδή τα ποσοστά ανταπόκρισης στους ασθενείς με ΧΗΒ ήταν

24%, στους ασυμπτωματικούς φορείς 18,2%, στους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β 22,2% και στους υγιείς μάρτυρες 20%, όπως φαίνεται παραστατικά και στο σχήμα 7. Πρέπει να αναφέρουμε ότι αποκρίσεις παρατηρήθηκαν και σε 2/10 υγιείς μάρτυρες, όμως ο ένας εξ' αυτών ήταν εμβολιασμένος έναντι του HBV.

**Σχήμα 7. Ανοσιακές αποκρίσεις έναντι του HBsAg στις εξεταζόμενες ομάδες**

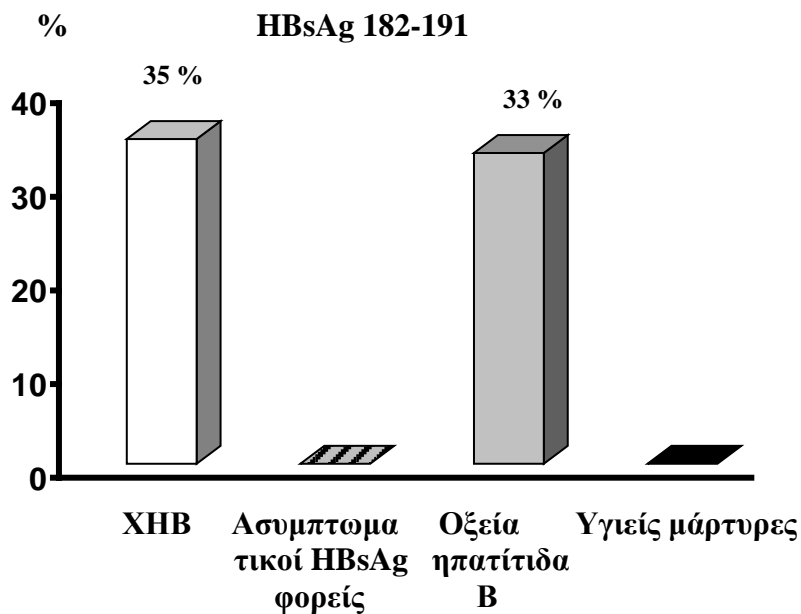


**δ. Ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του γνωστού MHC-II T-λεμφοκυτταρικού επιτόπου HBs 182-191**

Κατά τη διέγερση των κυττάρων με το γνωστό MHC-II συνδεδεμένο T-λεμφοκυτταρικό επίτοπο της πρωτεΐνης HBs (HBs 182-191) διαπιστώθηκε ανοσιακή απόκριση στο 1/3 περίπου των ασθενών με XHB (35%) και οξεία

ηπατίτιδα Β (33%), όχι όμως στους ασυμπτωματικούς φορείς και στους υγιείς μάρτυρες (0% αντίστοιχα), όπως φαίνεται και στο σχήμα 8.

**Σχήμα 8. Ανοσιακή απόκριση έναντι του HBs επιτόπου 182-191 στις εξεταζόμενες ομάδες**



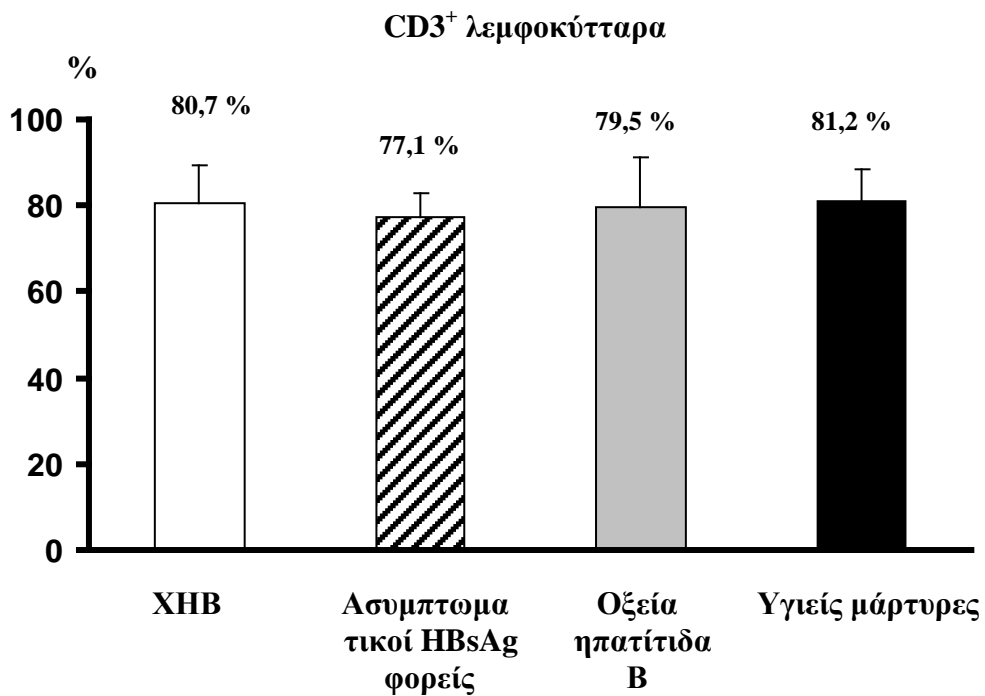
### **Γ. Προσδιορισμός υποπληθυσμών T-λεμφοκυττάρων**

Κατά τον προσδιορισμό των CD3<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών και των υγιών μαρτύρων όπως προκύπτει και από το σχήμα 9.

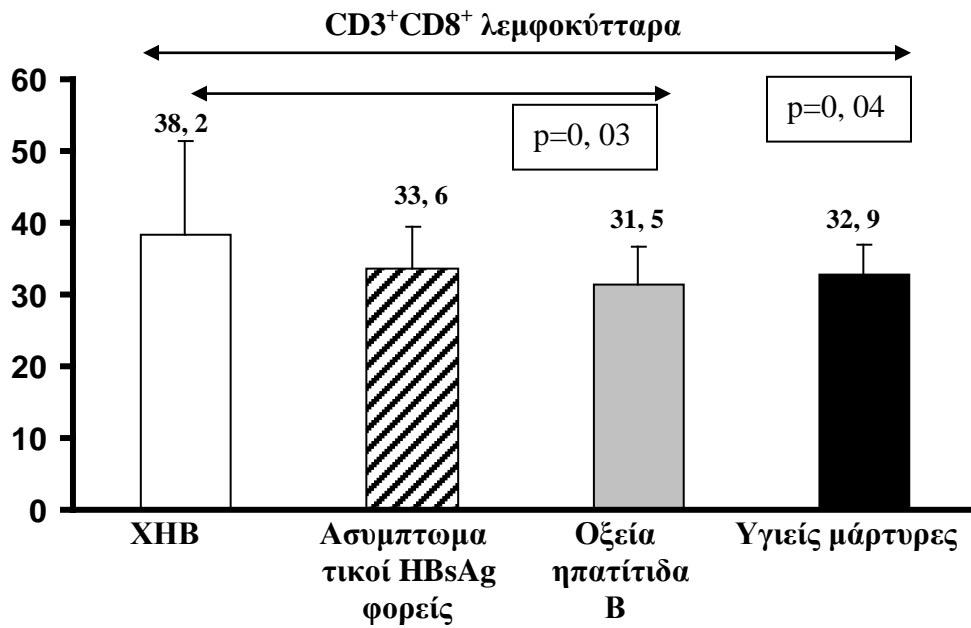
Αντίθετα, κατά τον προσδιορισμό των CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων, διαπιστώθηκε ένα στατιστικώς σημαντικό μεγαλύτερο ποσοστό αυτών στους ασθενείς με XHB (38,2±13,1%) σε σύγκριση με τους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β (31,5±5,17%) και τους υγιείς μάρτυρες ((32,9±4,2%)

( $p=0,03$  και  $0,04$  αντίστοιχα), όπως εκφράζεται και στο σχήμα 10. Οι ασυμπτωματικοί φορείς παρουσίαζαν ελαφρώς μεγαλύτερο ποσοστό  $CD3^+CD8^+$  λεμφοκυττάρων ( $33,6\pm 5,7\%$ ) σε σχέση με τους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β και τους υγιείς μάρτυρες, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να φθάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ( $p= 0,4$  και  $0,73$  αντίστοιχα).

**Σχήμα 9. Το ποσοστό των περιφερικών  $CD3^+$  λεμφοκυττάρων στις διάφορες εξεταζόμενες ομάδες με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής**



**Σχήμα 10. Το ποσοστό των περιφερικών CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων στις διάφορες εξεταζόμενες ομάδες με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής**



### Δ. Παραγωγή ιντερφερόνης-γ (IFN-γ)

Ο αριθμός των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων τα οποία παράγουν IFN-γ μετά από ειδική και μη ειδική διέγερση υπολογίστηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους: α) την ενδοκυττάρια μέτρηση IFN-γ με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής και τη μέθοδο ELISPOT σε ένα μικρότερο αριθμό ασθενών.

#### α. Ενδοκυττάρια μέτρηση IFN-γ



Ο αριθμός των Τ-λεμφοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους (CD4 και CD8) που παράγουν IFN-γ υπολογίστηκε με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής μετά από ειδική και μη ειδική διέγερση. Έτσι, αρχικά υπολογίστηκε το συνολικό ποσοστό των CD3<sup>+</sup> κυττάρων που παράγουν IFN-γ και έγινε σύγκριση μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών και των υγιών μαρτύρων, ενώ για τους υποπληθυσμούς των CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> και CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> κυττάρων υπολογίστηκε ο δείκτης παραγωγής IFN-γ (IFN-γ production index), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο *Αντιδραστήρια και Μέθοδοι (Ενδοκυττάρια μέτρηση κυττοκινών)*, δηλαδή:

**Δείκτης παραγωγής IFN-γ (%) (από CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> κύτταρα)**

$$= \frac{\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+}{(\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+) + (\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^-)} \times 100$$

**Δείκτης παραγωγής IFN-γ (%) (από CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> κύτταρα)**

$$= \frac{\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+}{(\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+) + (\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^-)} \times 100$$

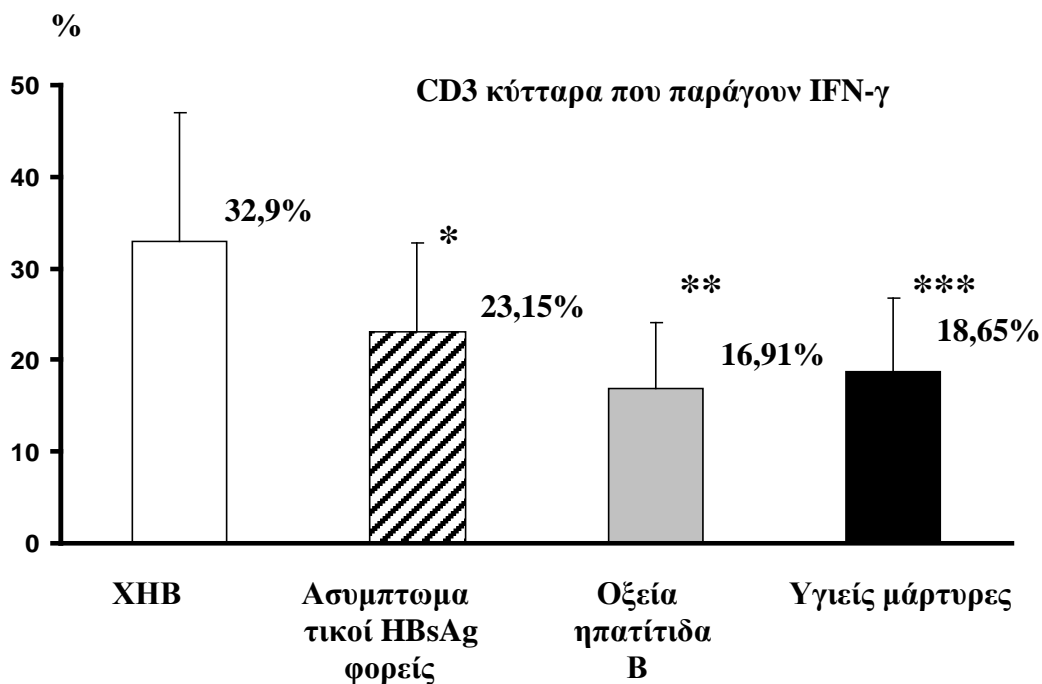
ώστε να μην υπάρξει λάθος αποτέλεσμα λόγω της διαφορετικής αναλογίας CD4/CD8 κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ασθενών και υγιών μαρτύρων.

### **1.Μη ειδική διέγερση**

Όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο *Αντιδραστήρια και Μέθοδοι (Ενδοκυττάρια μέτρηση κυττοκινών)*, στα απομονωθέντα PBMCs προστέθηκε για όλο το βράδυ PMA και Ionomycin, ένας συνδυασμός που είναι γνωστό ότι προκαλεί μη ειδική διέγερση των ανοσιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την παραγωγή προφλεγμονωδών κυττοκινών, όπως η IFN- $\gamma$ . Το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  μετά από τέτοια διέγερση είναι ενδεικτικό του συνολικού αριθμού των περιφερικών ενεργοποιημένων/δραστικών (effector) T-λεμφοκυττάρων. Με τη μέθοδο αυτή διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με HBeAg (-) XHB παρουσίασαν έναν αρκετά σημαντικό ποσοστό παραγωγής IFN- $\gamma$  τόσο από τα συνολικά CD3<sup>+</sup> λεμφοκύτταρα, όσο και από τους υποπληθυσμούς των CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> και CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων, σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες (ασυμπτωματικοί HBsAg φορείς, ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β και υγιείς μάρτυρες), όπως φαίνεται και στα σχήματα 11α, 11β και 11γ. Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των ασθενών με XHB και όλες τις άλλες ομάδες σε όλες τις περιπτώσεις (CD3 κύτταρα, CD4 IFN- $\gamma$  δείκτης, CD8

IFN- $\gamma$  δείκτης), εκτός από την περίπτωση της παραγωγής IFN- $\gamma$  από τα CD8 κύτταρα μεταξύ των ατόμων με ΧΗΒ και των ασυμπτωματικών φορέων ( $p=0,07$ ). Επιπλέον, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι οι ασυμπτωματικοί φορείς διατηρούσαν ένα σημαντικό ποσοστό T-λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IFN- $\gamma$  σε σύγκριση με τους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β και τους υγιείς μάρτυρες αν και η διαφορά αυτή δεν έφτανε τα επίπεδα της στατιστικής σημαντικότητας.

**Σχήμα 11α. Ποσοστό των περιφερικών CD3<sup>+</sup> κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$ , μετρούμενα με τη μέθοδο της ενδοκυττάριας χρώσης για κυττοκίνες μετά από ολονύχτια μη ειδική διέγερση με PMA και ιονομυκίνη.**

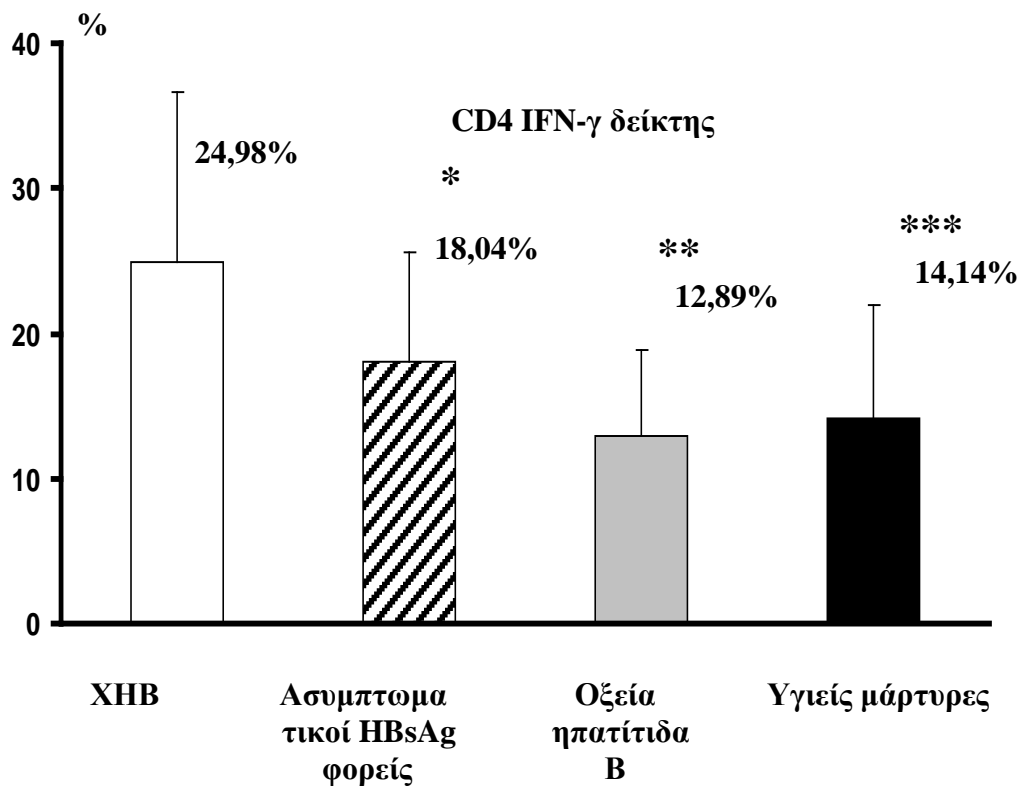


\*  $p=0,02$  κατά τη σύγκριση ασθενών με HBeAg (-) ΧΗΒ και ασυμπτωματικών HBsAg φορέων.

\*\*  $p<0,0001$  κατά τη σύγκριση ασθενών με HBeAg (-) ΧΗΒ και αυτών με οξεία ηπατίτιδα Β.

\*\*\* $p < 0,0001$  στη σύγκριση ασθενών με HBeAg (-) XHB και υγιών μαρτύρων.

**Σχήμα 11β. Ποσοστό των περιφερικών  $CD3^+CD4^+$  κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$ , μετρούμενα με τη μέθοδο της ενδοκυττάριας χρώσης για κυττοκίνες μετά από ολονύχτια μη ειδική διέγερση με PMA και ιονομυκίνη. Το ποσοστό εκφράζεται μέσω του δείκτη παραγωγής IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  production index) λόγω της διαφορετικής αναλογίας CD4/CD8 κυττάρων σε κάθε εξεταζόμενη ομάδα**

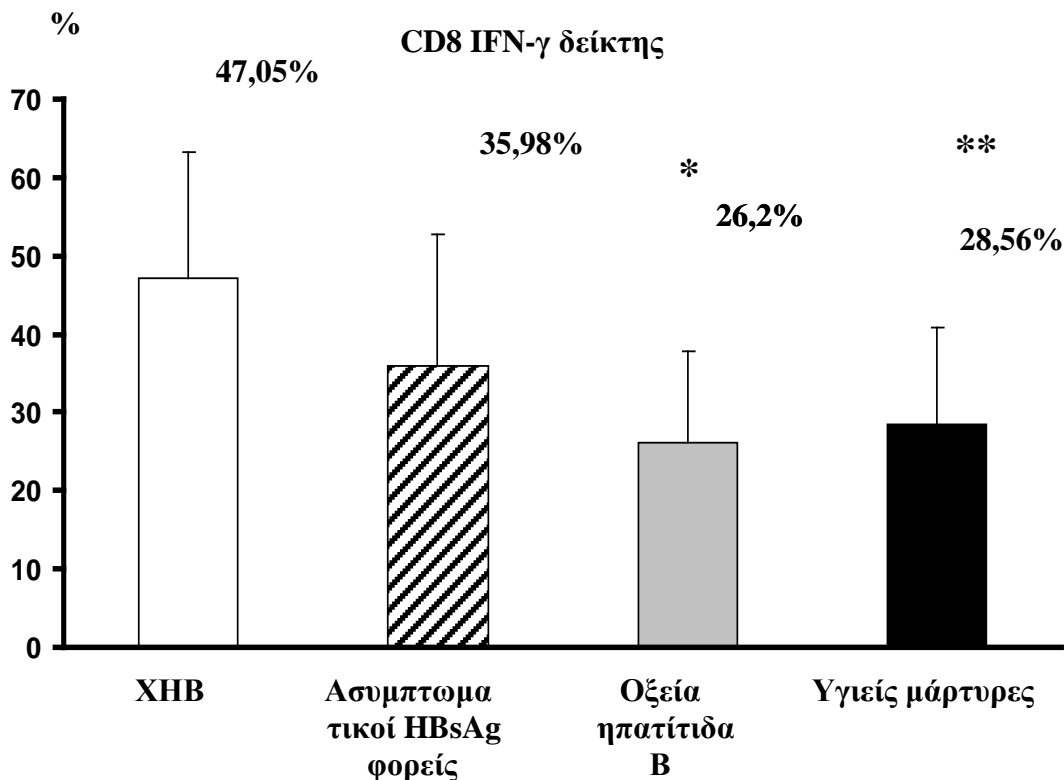


\*  $p = 0,03$  κατά τη σύγκριση ασθενών με HBeAg (-) XHB και ασυμπτωματικών HBsAg φορέων.

\*\*  $p = 0,0003$  κατά τη σύγκριση των αρρώστων με HBeAg (-) XHB και αυτών με οξεία ηπατίτιδα B.

\*\*\*  $p = 0,0002$  στη σύγκριση αρρώστων με HBeAg (-) XHB και υγιών μαρτύρων.

**Σχήμα 11γ. Ποσοστό των περιφερικών CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> κυττάρων που παράγουν IFN-γ, μετρούμενα με τη μέθοδο της ενδοκυττάριας χρώσης για κυττοκίνες μετά από ολονύχτια μη ειδική διέγερση με PMA και ιονομυκίνη. Το ποσοστό εκφράζεται μέσω του δείκτη παραγωγής IFN-γ (IFN-γ production index) λόγω της διαφορετικής αναλογίας CD4/CD8 κυττάρων σε κάθε εξεταζόμενη ομάδα**



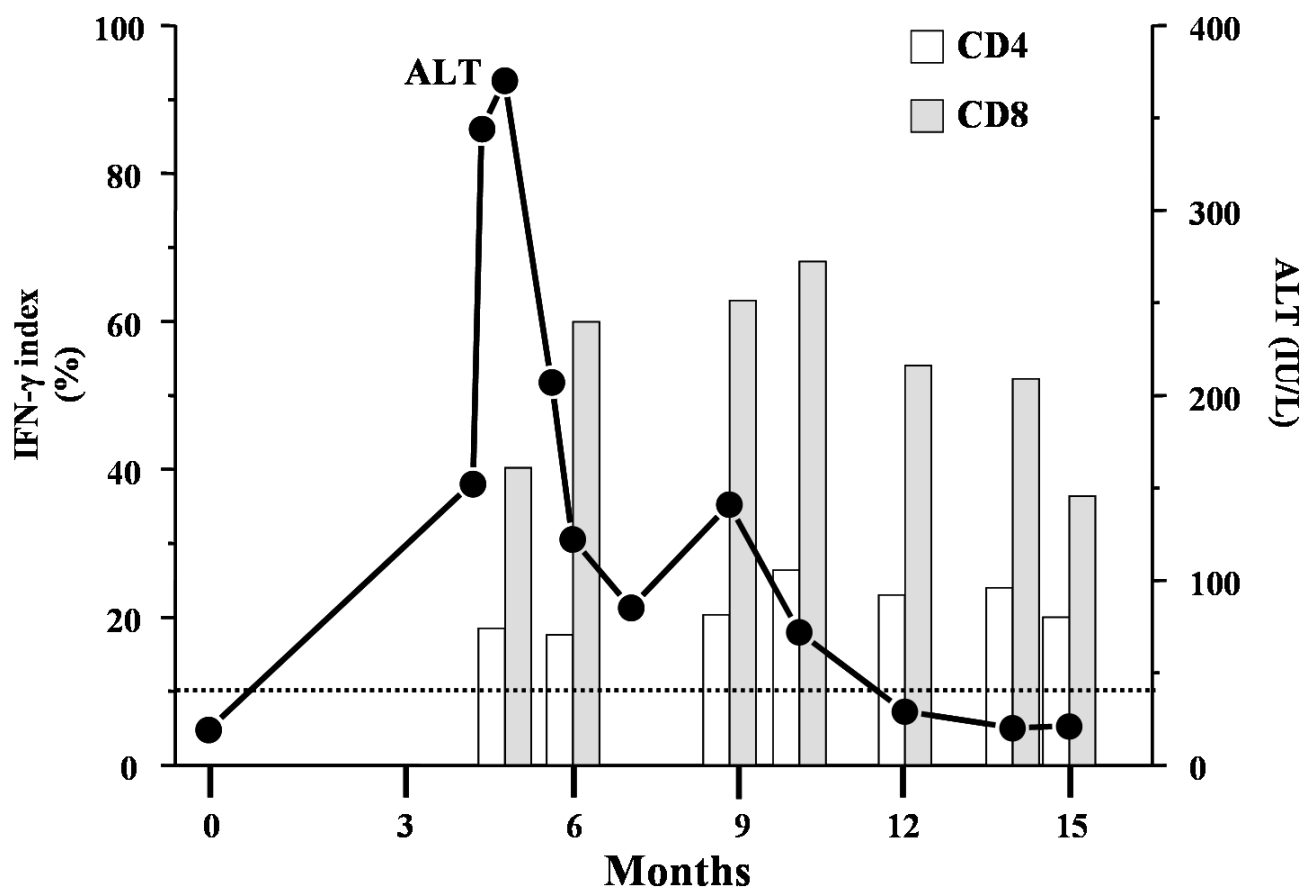
\*  $p=0,0004$  κατά τη σύγκριση των αρρώστων με HBeAg (-) XHB και αυτών με οξεία ηπατίτιδα B.

\*\*  $p=0,00002$  στη σύγκριση αρρώστων με HBeAg (-) XHB και υγιών μαρτύρων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις αρρώστων ελέγχθηκε στο πέρας του χρόνου και στα διάφορα στάδια της ηπατικής νόσου η μεταβολή στο ποσοστό των περιφερικών δραστικών T-λεμφοκυττάρων (effector T-cells). Ένα τέτοιο

αντιπροσωπευτικό παράδειγμα παρουσιάζεται στο σχήμα 12, όπου σε έναν ασθενή με ΗΒεΑg (-) ΧΗΒ παρατηρείται αύξηση των ενεργοποιημένων CD8 λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, κατά την αύξηση της πυροσταφυλικής αμινοτρανσφεράσης (ALT), ενώ τα δραστικά περιφερικά CD4 κύτταρα δεν επηρεάζονται.

**Σχήμα 12. Διαχρονική πορεία της τιμής της ALT και της μη ειδικής παραγωγής IFN- $\gamma$  (υπολογιζόμενης με το δείκτη παραγωγής IFN- $\gamma$ ) από τα περιφερικά CD4 και CD8 λεμφοκύτταρα σε έναν ασθενή με ΗΒεΑg (-) ΧΗΒ**



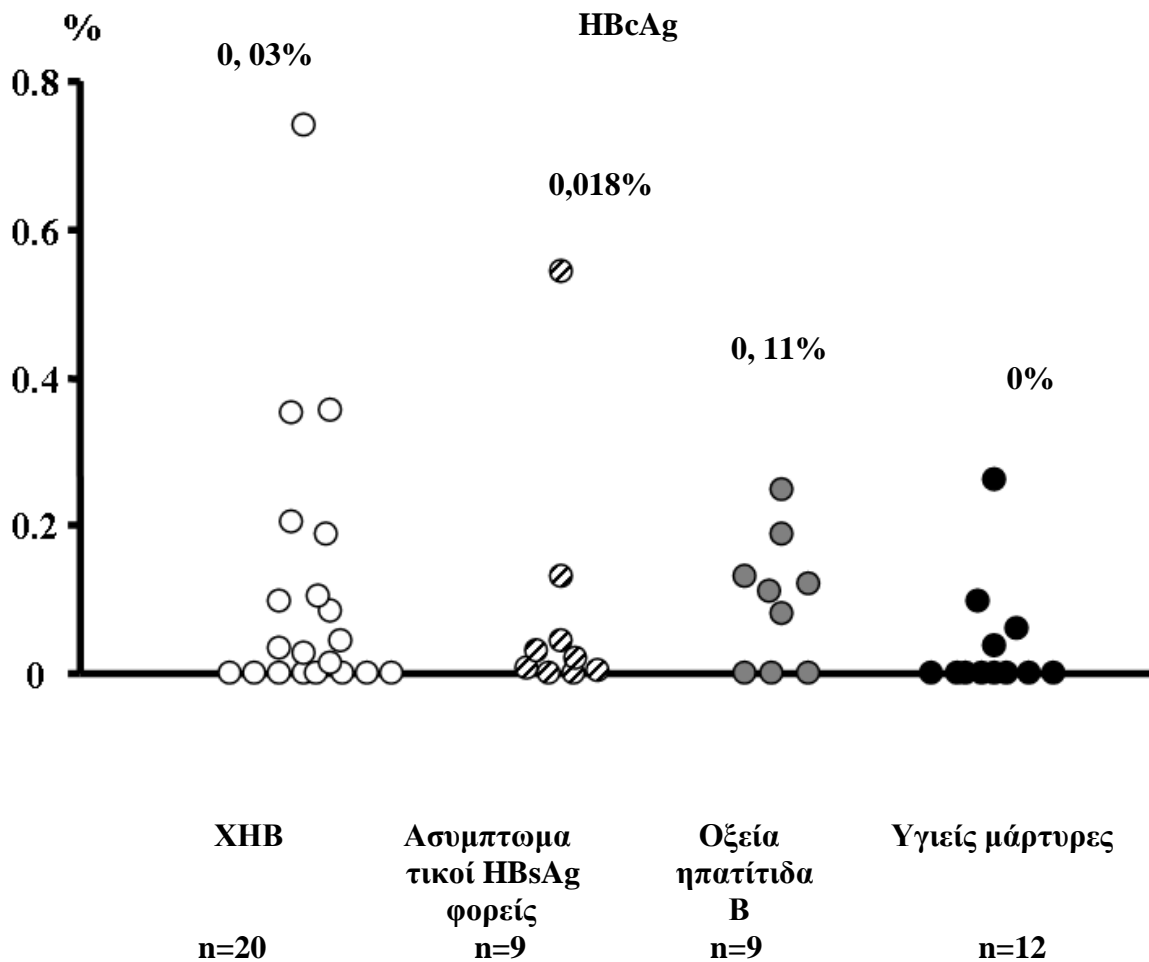
## **2.Ειδική διέγερση με πρωτεΐνες και πεπτίδια του HBV**

Ο αριθμός των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  μετρήθηκε και μετά από ολονύκτια διέγερση με πρωτεΐνες του HBV (HBcAg και HBsAg) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ενδοκυττάριας μέτρησης κυττοκινών, όπως προπεριγράφηκε στην παράγραφο *Αντιδραστήρια και Μέθοδοι (Ενδοκυττάρια μέτρηση κυττοκινών)*.

Εν γένει, η συχνότητα των ειδικών για το HBc T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία ήταν χαμηλό και δεν ξεπερνούσε το 0,8% σε όλες τις κατηγορίες των ασθενών.

Ειδικότερα, οι ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα B και αυτοί με HBeAg (-) XHB παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό ειδικών για το HBcAg περιφερικών T-λεμφοκυττάρων (διάμεση τιμή 0,11% και 0,03% αντίστοιχα, όπως φαίνεται και στο σχήμα 13α). Αντίθετα, οι HBsAg ασυμπτωματικοί φορείς και οι υγιείς μάρτυρες παρουσίαζαν μικρότερο αριθμό ειδικών για το HBcAg περιφερικών T-κυττάρων (διάμεση τιμή 0,018% και 0%, αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων ομάδων αν και ο αριθμός των ασθενών που εξετάστηκαν ήταν αναλογικά μικρός.

**Σχήμα 13α. Ποσοστό των περιφερικών Τ-λεμφοκυττάρων (CD3<sup>+</sup>) μετά από ολονύκτια διέγερση με HBcAg και μετρούμενο με τη μέθοδο ενδοκυττάριας χρώσης κυττοκινών**

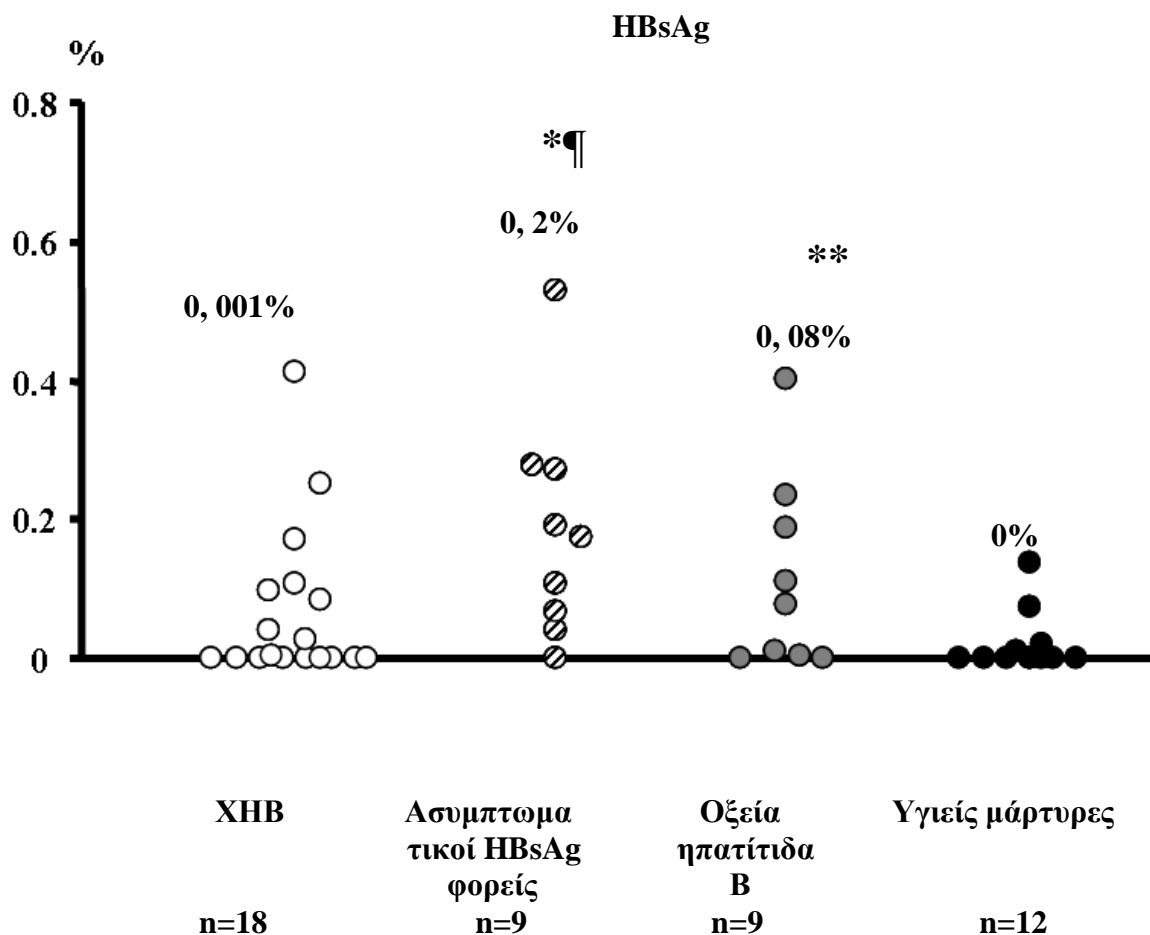


Σε αντίθεση όμως με τα κυκλοφορούντα για το HBcAg διεγερμένα Τ-λεμφοκύτταρα που παράγουν IFN- $\gamma$  τα οποία παρατηρούνται όπως αναφέραμε σε μικρά σχετικά ποσοστά ιδίως στους ασυμπτωματικούς HBsAg φορείς, στην περίπτωση του HBsAg, οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο πληθυσμό IFN- $\gamma$  παραγόντων Τ-



λεμφοκυττάρων (διάμεση τιμή 0,2%). Και αυτό σε σύγκριση με τους αρρώστους με χρόνια ηπατίτιδα Β (διάμεση τιμή 0,01%,  $p=0,03$ ) και τους υγιείς μάρτυρες (διάμεση τιμή 0%,  $p=0,002$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των HBsAg ασυμπτωματικών φορέων και των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β (διάμεση τιμή 0,08%,  $p=0,3$ ). Τα ανωτέρω φαίνονται και παραστατικότερα στο σχήμα 13β.

**Σχήμα 13β. Ποσοστό των περιφερικών Τ-λεμφοκυττάρων (CD3<sup>+</sup>) μετά από ολονύκτια διέγερση με HBsAg και μετρούμενο με τη μέθοδο ενδοκυττάριας χρώσης κυττοκινών**



\*  $p=0,02$  κατά τη σύγκριση ασυμπτωματικών HBsAg φορέων και υγιών μαρτύρων

¶  $p=0,03$  κατά τη σύγκριση ασυμπτωματικών HBsAg φορέων και ασθενών με HBeAg (-) XHB

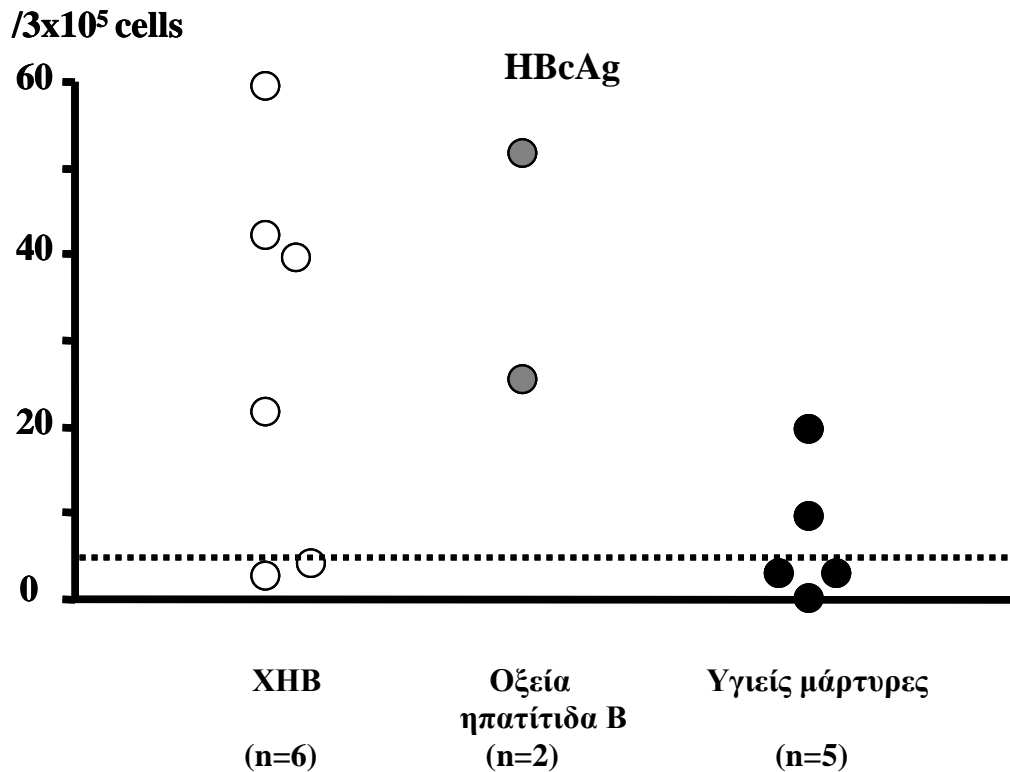
\*\*  $p=0,03$  από τη σύγκριση ασθενών με οξεία ηπατίτιδα B και υγιών μαρτύρων

### **β. Μέθοδος IFN- $\gamma$ ELISPOT**

Τέλος, σε έναν μικρό αριθμό HBV ασθενών και υγιών μαρτύρων, προσδιορίστηκε η παραγωγή IFN- $\gamma$  από τα περιφερικά λεμφοκύτταρα με τη μέθοδο ELISPOT όπως προπεριγράφηκε στην παράγραφο *Αντιδραστήρια και Μέθοδοι (Μέθοδος IFN- $\gamma$  ELISPOT)*. Με τη μέθοδο λοιπόν αυτή, υπολογίστηκε ο αριθμός των SFCs (spot forming cells), τα οποία αντιστοιχούν στα κύτταρα τα οποία παράγουν IFN- $\gamma$ , μετά από ολονύκτια διέγερση με HBcAg ή HBsAg, σε 6 ασθενείς με HBeAg (-) XHB, 2 με οξεία ηπατίτιδα B και 5 υγιείς μάρτυρες.

Όσον αφορά την παραγωγή IFN- $\gamma$  έναντι του HBsAg, αυτή ήταν πολύ περιορισμένη σε όλες τις εξετασθείσες ομάδες ( $<5\text{SFCs}/3 \times 10^5 \text{PBMCs}$ ) και δεν παρουσιάζεται καν. Αντίθετα, και οι 2 ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα B αλλά και 4/6 ασθενείς με HBeAg (-) XHB παρήγαγαν  $>10$  ειδικά για το HBc SFCs/ $3 \times 10^5$  PBMCs, ενώ μόνο 1/5 υγιείς μάρτυρες παρουσίασε  $>10$  ειδικά για το HBc SFCs/ $3 \times 10^5$  PBMCs. Τα ανωτέρω παρατίθενται παραστατικά στο σχήμα 14.

**Σχήμα 14. Αριθμός των IFN- $\gamma$  SFCs μετά από ολονόκτια διέγερση των PBMCs με την πρωτεΐνη HBc, μετρημένο με μία μέθοδο ELISPOT για υπολογισμό της ανθρώπινης IFN- $\gamma$**



## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Από την ανωτέρω μελέτη, τα βασικά αποτελέσματα της οποίας δημοσιεύθηκαν πρόσφατα, προέκυψε ότι οι ασθενείς με HBeAg (-) χρόνια ηπατίτιδα B παρουσιάζουν ισχυρές T-κυτταρικές ανοσιακές αντιδράσεις (κυρίως CD4), που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι της ίδιας ή παρόμοιας ισχύος με αυτές των ασθενών με οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα B (74). Για να καταλήξουμε στα συμπεράσματα αυτά, χρησιμοποιήθηκε ικανός αριθμός αρρώστων με HBeAg (-) XHB ή

ασυμπτωματικοί HBsAg φορείς, άρρωστοι με οξεία ηπατίτιδα Β, καθώς και υγιείς μάρτυρες και μελετήθηκαν οι περιφερικές Τ-λεμφοκυτταρικές αντιδράσεις (CD4 και CD8) με τη χρήση παραδοσιακών μεθόδων, όπως οι λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες, αλλά και νεότερων τεχνικών όπως η μέθοδος ELISPOT και η ενδοκυττάρια χρώση κυττοκινών (κυρίως IFN-γ).

Η HBeAg (-) ΧΗΒ, αν και παλαιότερα θεωρούνταν μία σπάνια μορφή της νόσου που περιοριζόταν μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές του κόσμου, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κατανοητό ότι είναι πολύ πιο συχνή απ' ότι πιστευόταν και παρουσιάζει διαφορετική γεωγραφική κατανομή. Έτσι θεωρείται ότι από τα 350 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως που είναι θετικοί για το HBsAg, 7-30% έχουν προσβληθεί από μεταλλαγμένα στελέχη του HBV τα οποία δεν εκφράζουν το HBeAg (59,75).

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η τυπική πορεία της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας Β περιλαμβάνει μία HBeAg (+) φάση με πολύ υψηλά επίπεδα HBV-DNA στον ορό, κατά την οποία παρατηρείται ανοσοανοχή και φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες στον ορό (37,76). Στη συνέχεια, επέρχεται μετά από άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα, η οροαναστροφή με απώλεια του HBeAg και ανάπτυξη anti-HBe. Στη φάση αυτή, το HBV-DNA παρουσιάζει προοδευτική ελάττωση ενώ παρατηρείται αύξηση των αμινοτρανσφερασών στον ορό, δηλωτικό της ανοσολογικής βλάβης που

επέρχεται στο ήπαρ. Και είναι κατά την περίοδο αυτή, όπου μεταλλαγμένα στελέχη του HBV (στην προπυρηνική περιοχή ή την περιοχή του βασικού πυρηνικού υποκινητή) τα οποία δεν εκφράζουν HBeAg αλλά επιτρέπουν την αναπαραγωγή του HBV-DNA, επικρατούν ανοσολογικά (37,75,76). Στους περισσότερους αρρώστους ακολουθεί μία περίοδος «ηρεμίας», η φάση του ασυμπτωματικού HBsAg φορέα, όπου δεν παρατηρείται ιική αναπαραγωγή, οι τρανσαμινάσες είναι φυσιολογικές και σε βιοψία ήπατος η βλάβη είναι ελάχιστη έως απύσα. Και ενώ οι άρρωστοι αυτοί είναι HBeAg (-)/anti-HBe (+), παρουσιάζουν εξάρσεις της ιικής αναπαραγωγής (μόνιμες ή περιστασιακές) που ακολουθούνται από έξαρση της ανοσιακής αντίδρασης, με αποτέλεσμα αύξηση των τρανσαμινασών και ανοσολογική βλάβη του ήπατος και εγκατάσταση της HBeAg (-) χρόνιας ηπατίτιδας Β. Οι εξάρσεις αυτές του ικού πολλαπλασιασμού και η εγκατάσταση πλέον των μεταλλαγμένων στελεχών του ιού μέσω της ανοσολογικής πίεσης, καθορίζονται από παράγοντες τόσο του ιού (γονότυπος, ρυθμός ικού πολλαπλασιασμού) όσο και του ξενιστή (MHC απλότυπος, παρουσία του HBeAg το οποίο επάγει ως γνωστόν ανοχή, βαθμός της ηπατικής νεκροφλεγμονής, κυτταροπλασματική έκφραση του HBcAg) (36, 37, 61). Οι κύκλοι αυτοί των εξάρσεων της ιικής αναπαραγωγής →

ανοσιακή αντίδραση του ξενιστή  $\longrightarrow$  ηπατική νεκροφλεγμονή, οδηγεί σε ανάπτυξη κίρρωσης του ήπατος και ΗΚΚ.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των κυτταρικών ανοσιακών αντιδράσεων των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β από μεταλλαγμένο στέλεχος του HBV στην προπυρηνική περιοχή ή/και στην περιοχή του βασικού πυρηνικού υποκινητή, σε φάσεις εξάρσεως είτε αυτόματης είτε μετά από διακοπή αντικής αγωγής, κυρίως με νουκλεοσιδικά ανάλογα και η σύγκρισή τους με αυτές των ασυμπτωματικών HBsAg φορέων, των αρρώστων με οξεία ηπατίτιδα Β και υγιών μαρτύρων.

Κατ'αρχάς, όσον αφορά τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των αρρώστων με HBeAg (-) XHB, οι ασθενείς αυτοί είναι ως επί το πλείστον άρρενες και μεγαλύτεροι σε ηλικία σε σύγκριση τόσο με τους ασυμπτωματικούς φορείς, όσο και με τους αρρώστους με οξεία ηπατίτιδα Β.

Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με αυτά παλαιότερων εργασιών, όπου ειδικά για την HBeAg (-) XHB αναφέρεται ότι οι άρρωστοι αυτοί είναι σημαντικά μεγαλύτερης ηλικίας τόσο από τους HBsAg ασυμπτωματικούς φορείς, όσο και από τους HBeAg(+) ασθενείς, καθώς η HBeAg (-) φάση είναι η τελευταία όπως αναφέραμε στην πορεία της HBeAg (-) XHB, όπου παρατηρείται μία ολοένα αυξανόμενη άθροιση των προπυρηνικών μεταλλαγών (37,39,69,77,78). Επίσης, τα ευρήματά μας συμφωνούν με μία

επιδημιολογική εργασία, όπου έγινε συλλογή των 50 σημαντικότερων μελετών από διάφορες χώρες με θέμα την HBeAg (-) XHB και όπου για την περιοχή της Μεσογείου αναλύθηκαν 17 μελέτες με συνολικά 1374 ασθενείς (75). Στην ανάλυση αυτή λοιπόν, για την περιοχή της Μεσογείου, αναφέρεται ότι η μέση ηλικία των ασθενών με HBeAg (-) XHB είναι 40,8 έτη (32-54 έτη) και ότι το ποσοστό των αρρένων αρρώστων κυμαίνεται από 67%-87%. Πέρα όμως από τη διαφορά ηλικίας και φύλου, οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν επίσης στατιστικά υψηλότερες τιμές *anti-HBcIgM* απ' ό, τι οι άρρωστοι με HBsAg ασυμπτωματική φορεία. Οι υψηλές αυτές τιμές αυξάνονται περαιτέρω στις σοβαρές εξάρσεις της νόσου και είναι ενδεικτικές της έντονης χυμικής ανοσιακής απάντησης που εκδηλώνουν οι άρρωστοι αυτοί έναντι της πρωτεΐνης του πυρήνα του HBV (79). Άλλωστε, οι αλλαγές στον τίτλο του *anti-HBcIgM* κατά τη διάρκεια της πορείας της HBeAg (-) XHB, αποτελούν ένα πολύ ευαίσθητο δείκτη της ιικής αναπαραγωγής και της ηπατικής βλάβης και έχουν επιπλέον χρησιμοποιηθεί και για τον έλεγχο της αντιικής αγωγής (κυρίως με IFN-a).

Τέλος, όπως αναμενόταν, τα επίπεδα του *HBV-DNA* των ασθενών με HBsAg ασυμπτωματική φορεία είναι σταθερά χαμηλά (μέση τιμή:  $2,99 \log_{10} \pm 0,56$ ), ενώ των ατόμων με HBeAg (-) XHB είναι σε υψηλά επίπεδα (μέση τιμή:  $6,26 \log_{10} \pm 1,43$ ).

Άλλωστε, όπως αναφέρεται συνοπτικά και στην παράγραφο *Ασθενείς*, για να τεθεί η διάγνωση της HBeAg (-) ΧΗΒ, πρέπει να ισχύουν τα κάτωθι κριτήρια:

- 1) HBsAg (+) και HBeAg (-) για τουλάχιστον 6 μήνες (ιδανικά για 1 χρόνο). Το κριτήριο αυτό αποκλείει τους αρρώστους που βρίσκονται στο ασταθές στάδιο της HBeAg ορομετατροπής,
- 2) αυξημένα επίπεδα ALT στον ορό, είτε μονίμως είτε περιστασιακώς,
- 3) αναπαραγόμενο HBV-DNA στον ορό ή/και HBcAg στο ήπαρ. Αν χρησιμοποιούνται ποσοτικές μέθοδοι PCR, τότε τα επίπεδα του HBV-DNA θα πρέπει να είναι  $>10^5$  ιικά αντίγραφα/κυβικό χιλιοστό. Συνήθως, πριν από την αύξηση της ALT κατά τις εξάρσεις της νόσου, παρατηρείται σημαντική αύξηση του HBV-DNA, ενώ 80% περίπου των αρρώστων παρουσιάζουν και αύξηση του τίτλου είτε του anti-HBcIgM είτε του ολικού anti-HBc κατά τη διάρκεια ή μετά από τη βιοχημική έξαρση της νόσου (37, 28, 59, 69).

Στη συνέχεια, κατά την εφαρμογή των λεμφοκυτταρικών καλλιιεργειών, μελετήθηκαν οι ανοσιακές αντιδράσεις των περιφερικών λεμφοκυττάρων (PBMCs) έναντι ολικών αφ' ενός πρωτεϊνών του HBV (HBcAg και HBsAg), αφ' ετέρου δε, συνθετικών πεπτιδίων από τις πρωτεΐνες αυτές. Από τις μέχρι τώρα αντίστοιχες μελέτες στη βιβλιογραφία, η παρούσα είναι ίσως η μοναδική που ασχολείται τόσο εκτεταμένα με την HBeAg (-) μορφή της



XHB (80-84). Ας δούμε λοιπόν περιληπτικά τα αποτελέσματα μερικών από τις σημαντικότερες δημοσιευμένες εργασίες και ας τα συγκρίνουμε με τα δικά μας.

Σε μελέτη του Ferrari και συν. (80) μελετήθηκαν 21 ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β, 29 με ΧΗΒ (13 ΗΒεΑg (+) και 16 anti-ΗΒε (+)), 13 ασυμπτωματικοί φορείς και 24 υγιείς μάρτυρες. Τα PBMCs των ατόμων αυτών διεγέρθηκαν με τις ολικές πρωτεΐνες *HBcAg*, *ΗΒεΑg*, *ΗΒsΑg*, *preS1* και *preS2* και εκτιμήθηκαν οι ανοσιακές απαντήσεις. Έτσι διαπιστώθηκε, ότι οι ασθενείς με αυτοπεριοριζόμενη οξεία ηπατίτιδα Β είχαν πολύ έντονη ανοσιακή απάντηση στο *ΗΒcΑg* και *ΗΒεΑg*, που είναι μερικές φορές συγκρίσιμη με αυτή του ΡΗΑ (φυτοαιμαγλουτινίνη: μιτογόνο των Τ-λεμφοκυττάρων). Αντίθετα τα PBMCs των αρρώστων με ΧΗΒ, παρουσίαζαν μία πολύ ασθενή ή και μηδενική αντίδραση στο *ΗΒcΑg*. Όμως, παρ' όλ' αυτά οι ασθενείς με anti-ΗΒε (+) ΧΗΒ και οι ασυμπτωματικοί φορείς παρουσίαζαν πιο έντονες ανοσιακές αποκρίσεις έναντι του *ΗΒcΑg* συγκριτικά με τους *ΗΒεΑg* (+) ΧΗΒ, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν οι Lohr και συν. 5 χρόνια μετά, όταν μελέτησαν τις ανοσιακές αποκρίσεις στο *ΗΒcΑg* 25 ασθενών με ΧΗΒ (16 *ΗΒεΑg* (+) και 9 *ΗΒεΑg* (-)), 16 ασυμπτωματικών *ΗΒsΑg* φορέων, 15 ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β και 9 εμβολιασθέντων

ατόμων (81). Η ένταση λοιπόν της απόκρισης στο HBcAg ήταν: ασθενείς με οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα Β> ασθενείς με ΧΗΒ> ασυμπτωματικοί HBsAg φορείς> εμβολιασθέντα άτομα. Επίσης, αντίστοιχα ήταν τα ευρήματα των Jung και συν. οι οποίοι το 1991 μελέτησαν 20 αρρώστους με οξεία ηπατίτιδα Β, 26 με ΧΗΒ (δεν γινόταν διάκριση μεταξύ HBeAg (+) ή (-) αρρώστων), 7 εμβολιασθέντες έναντι του HBV και 14 υγιείς μάρτυρες (82). Τα PBMCs των υπό εξέταση ατόμων διεγείρονταν με HBcAg και HBsAg. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι τα άτομα με οξεία ηπατίτιδα Β είχαν έντονες και συχνές αποκρίσεις έναντι του HBcAg και έντονη παραγωγή κυττοκινών (IFN- $\gamma$ ), δεν ίσχυε όμως το ίδιο για το HBsAg (σχεδόν απουσία αποκρίσεων). Επιπλέον, οι άρρωστοι με ΧΗΒ παρουσίαζαν λιγότερο έντονες και συχνές αποκρίσεις και παραγωγή κυττοκινών κατά τη διέγερση με HBcAg, αλλά παρόμοια ελάχιστες αποκρίσεις έναντι του HBsAg.

Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τις ανωτέρω εργασίες, καθώς κατά τη διέγερση των PBMCs των ασθενών μας με την πρωτεΐνη HBcAg, μόνο 8% των ασθενών με ΧΗΒ παρουσίασε απόκριση σε σύγκριση με 22% των αρρώστων με οξεία ηπατίτιδα Β. Αν όμως η απόκριση των PBMCs των αρρώστων της μελέτης μας με ΧΗΒ στο HBcAg ήταν περιορισμένη, δε φάνηκε να ισχύει το ίδιο και για τα πεπτίδια του HBc που χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία κάλυπταν όλη την έκταση της πρωτεΐνης core

του HBV. Παρατηρήσαμε λοιπόν, ότι ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με HBeAg (-) XHB παρουσίαζε έντονες αποκρίσεις έναντι πολλαπλών πεπτιδίων του HBcAg. Έτσι, 20% των αρρώστων με XHB παρουσίασαν απόκριση έναντι του HBc 1-23 έναντι 14% των ατόμων με οξεία ηπατίτιδα B. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το πεπτίδιο HBc 14-43 ήταν 22% έναντι 33%, για το HBc 34-63 38% έναντι 14%, για το HBc 54-83 38% έναντι 14% κ.ο.κ. Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 5, ενώ το μοτίβο των αποκρίσεων απεικονίζεται πολύ παραστατικά στο σχήμα 5. **Φαίνεται λοιπόν ότι η συχνότητα των αποκρίσεων ομοιάζει με αυτή των αρρώστων με οξεία ηπατίτιδα B**, σε αντίθεση με παλιότερες εργασίες, όπου όμως ο αριθμός των αρρώστων με HBeAg (-) XHB που είχαν μελετηθεί ήταν πολύ περιορισμένος.

Πράγματι, στη μελέτη της Jung και συν. (83), μελετήθηκαν οι ανοσιακές αποκρίσεις 49 αρρώστων με οξεία ηπατίτιδα B και 39 με XHB (μόνο όμως οι 5 από αυτούς ήταν HBeAg (-)). Τα PBMCs των αρρώστων διεγέρθηκαν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη HBcAg καθώς και με πεπτίδια που κάλυπταν το HBcAg και το HBeAg. Στην εργασία αυτή διαπιστώθηκε ότι σε μεμονωμένες χρονικές στιγμές η T-λεμφοκυτταρική απάντηση στα πεπτίδια του HBcAg έφθανε το 50% για τους αρρώστους με οξεία ηπατίτιδα B (90% μετά από διαδοχικές μετρήσεις), αλλά μόνο το 13% για τους

ασθενείς με ΧΗΒ (και 0% για τους 5 αρρώστους με ΗΒεΑg (-) ΧΗΒ). Και στη δική μας εργασία αλλά και σε παλαιότερες που είχαν εξεταστεί και ασυμπτωματικοί ΗΒsΑg φορείς, διαπιστώθηκε ότι η ομάδα των αρρώστων αυτών παρουσιάζει ελάχιστες ανοσιακές αποκρίσεις, τόσο σε συχνότητα όσο και σε ένταση έναντι των διαφόρων ΗΒc πεπτιδίων, που είναι συγκρίσιμη με αυτή των υγιών μαρτύρων (81, 84).

Επιπλέον, καταδείξαμε ότι οι ασθενείς με χρόνια ΗΒεΑg (-) ηπατίτιδα Β παρουσίαζαν ανοσιακές αποκρίσεις έναντι του συνθετικού ΜΗC-II αντιγονικού επιτόπου 182-191 της ΗΒsΑg πρωτεΐνης (απόκριση στο 1/3 περίπου των ασθενών με ΧΗΒ (35%)) παρόμοια με αυτή των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β (33%), ενώ οι ασυμπτωματικοί φορείς και οι υγιείς μάρτυρες δεν παρουσίαζαν ανοσιακές αποκρίσεις (0% αντίστοιχα), όπως φαίνεται και στο σχήμα 8 (85).

Παράλληλα με την ικανότητα πολλαπλασιασμού των περιφερικών Τ-λεμφοκυττάρων, η οποία μελετήθηκε με τις λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες, μελετήθηκε επιπλέον και η λειτουργικότητά τους, όσον αφορά την παραγωγή κυττοκινών, κυρίως δε ιντερφερόνης-γ. Όσον αφορά λοιπόν, τους υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων των διαφόρων κατηγοριών αρρώστων που εξετάσθηκαν, με ιδιαίτερο βάρος στους ασθενείς με ΗΒεΑg (-) ΧΗΒ και τους ασυμπτωματικούς ΗΒsΑg φορείς, ενώ το ποσοστό των CD3<sup>+</sup>

λεμφοκυττάρων δε παρουσίαζε διαφορές μεταξύ των ομάδων, κατά τον προσδιορισμό του ποσοστού των  $CD3^+CD8^+$  λεμφοκυττάρων διαπιστώθηκε ένα στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό αυτών στους ασθενείς με ΧΗΒ ( $38,2\pm 13,1\%$ ) σε σύγκριση με τους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β ( $31,5\pm 5,2\%$ ) και τους υγιείς μάρτυρες ( $32,9\pm 4,2\%$ ) ( $p=0,03$  και  $0,04$  αντίστοιχα), όχι όμως σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς φορείς ( $33,6\pm 5,7\%$ ) ( $p=0,125$ ). Επιπλέον, το ποσοστό των  $CD3^+CD8^+$  λεμφοκυττάρων των ασυμπτωματικών φορέων δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από αυτό των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β ( $p=0,4$ ) ούτε από αυτό των υγιών μαρτύρων ( $p=0,72$ ).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ευρήματα παλαιότερων μελετών, όπου διαπιστώθηκε ότι οι HBsAg (+)/anti-HBe (+) ασυμπτωματικοί φορείς δεν παρουσίαζαν διαφορές στους υποπληθυσμούς των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων τους σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (86), αντίθετα με τους ασθενείς τόσο με HBeAg (+) όσο και με anti-HBe (+) ΧΗΒ, οι οποίοι παρουσίαζαν αυξημένο ποσοστό  $CD8^+$  λεμφοκυττάρων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (87). Στις παλιότερες αυτές μελέτες όμως, δεν είχε γίνει σύγκριση των HBeAg (+) ή HBeAg (-) αρρώστων με ΧΗΒ και των ατόμων με HBsAg (+) φορεία. Αυξημένο ποσοστό  $CD8^+$  λεμφοκυττάρων και ελάττωση του τίτλου  $CD4^+/CD8^+$  λεμφοκυττάρων είχε διαπιστωθεί και σε

αρρώστους με οξεία ηπατίτιδα Β, ενώ ο τίτλος απεκαθίστατο με την υποχώρηση της οξείας φάσης της λοίμωξης (88). Πιθανώς λοιπόν, ο αυξημένος αριθμός των περιφερικών CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με HBeAg (-) ΧΗΒ και αυξημένη ιική αναπαραγωγή, να σημαίνει ότι οι άρρωστοι αυτοί παρουσιάζουν έντονες ανοσιακές αποκρίσεις έναντι του HBV, οι οποίες όμως δεν επαρκούν για την εκρίζωση του ιού και ευθύνονται εν μέρει για την πρόκληση της νεκροφλεγμονώδους βλάβης.

Όσον αφορά τα ποσοστά των ειδικών για το HBc και HBs διεγερμένων περιφερικών CD3<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων, αυτά ήταν χαμηλά (<0,8%), σε όλες τις μελετηθείσες ομάδες ασθενών (σχήματα 13α και 13β). Βέβαια, οι ασθενείς με HBeAg (-) ΧΗΒ και με οξεία ηπατίτιδα Β παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά ειδικών για το HBc διεγερμένων CD3<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων σε σχέση με τους ασυμπτωματικούς φορείς και τους υγιείς μάρτυρες, χωρίς όμως να φθάσει η διαφορά σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (σχήμα 13α).

Όμως, αξιοσημείωτο ήταν το εύρημα των στατιστικά υψηλότερων ποσοστών ειδικών για το HBs CD3<sup>+</sup> διεγερμένων λεμφοκυττάρων των ασυμπτωματικών φορέων, συγκριτικά με τους ασθενείς με ΧΗΒ (p=0,036) και των υγιών μαρτύρων (p=0,002) (σχήμα 13β).

Τέλος, σε μικρό αριθμό ασθενών (6 ασθενείς με ΧΗΒ, 2 με οξεία ηπατίτιδα Β και 5 υγιείς μάρτυρες) μελετήθηκε με τη μέθοδο ELLISPOT η παραγωγή

ιντερφερόνης- $\gamma$  έναντι του HBc και HBs. Η παραγωγή IFN- $\gamma$  έναντι του HBsAg ήταν πολύ περιορισμένη σε όλες τις εξετασθείσες ομάδες ( $<5\text{SFCs}/3 \times 10^5 \text{PBMCs}$ ). Αντίθετα, και οι 2 ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα B αλλά και 4/6 ασθενείς με HBeAg (-) XHB παράγααν  $>10$  ειδικά για το HBc SFCs/ $3 \times 10^5$  PBMCs, ενώ μόνο 1/5 υγιείς μάρτυρες παρουσίασε  $>10$  ειδικά για το HBc SFCs/ $3 \times 10^5$  PBMCs (σχήμα 14). Η παραγωγή IFN- $\gamma$  σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B έχει μελετηθεί και στο παρελθόν με τη μέθοδο ELLISPOT. Έτσι, στη μελέτη της Jung και συνεργατών, σε σημαντικό αριθμό ασθενών τόσο με οξεία όσο και με χρόνια ηπατίτιδα B, διαπιστώθηκε παραγωγή ιντερφερόνης- $\gamma$  έναντι του HBc αλλά και HBc πεπτιδίων σε 60-82% των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα B και 25-43% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B (89). Σε άλλη μελέτη, ο Hyodo και συν. διαπίστωσαν σημαντική παραγωγή IFN- $\gamma$  έναντι του HBc σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B και αυξημένες αμινοτρανσφεράσες (90). Όμως, σε καμία από τις δύο μελέτες δεν γινόταν διάκριση μεταξύ HBeAg (+) και HBeAg (-) χρόνιας ηπατίτιδας B.

Προς επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων, σε πρόσφατη εργασία της Maini και συν., με τη χρήση των MHC-I tetramers, μελετήθηκαν τόσο στην περιφέρεια όσο και στο ήπαρ τα ποσοστά των ειδικών για τον HBV CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων (91). Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι: 1) οι

ασυμπτωματικοί φορείς παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα των ειδικών αυτών κυττάρων στην περιφέρεια, σε αντίθεση με τους ασθενείς με ΧΗΒ (αφορούσε βέβαια HBeAg (+) αρρώστους), 2) στο ήπαρ όμως η σχετική συχνότητα των κυττάρων αυτών δεν παρουσίαζε διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, καθώς οι ασυμπτωματικοί φορείς είχαν μεν περισσότερα ειδικά για τον ιό κύτταρα, αλλά είχαν μικρότερα γενικώς ποσοστά των μη ειδικών CD8<sup>+</sup> κυττάρων σε σχέση με τους ασθενείς, 3) τα ειδικά αυτά CD8<sup>+</sup> κύτταρα των φορέων είχαν φαινότυπο μη ενεργοποιημένων αλλά έμπειρων έναντι συγκεκριμένα των χρησιμοποιηθέντων αντιγόνων T-λεμφοκυττάρων (CD8 T-λεφοκύτταρα μνήμης), φαινότυπος που διόλου δε διέφερε από αυτό των T-λεμφοκυττάρων αρρώστων που ιώνται μετά από οξεία ηπατίτιδα Β (92). Καθώς λοιπόν, στις δύο αυτές ξεχωριστές ομάδες αρρώστων παρατηρείται παρόμοια σχετική συχνότητα ειδικών για τον HBV CD8<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων στο ήπαρ με διαφορετικό όμως βαθμό νεκροφλεγμονώδους βλάβης, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η λύση των ηπατοκυττάρων δεν οφείλεται μόνο στα ειδικά έναντι του HBV λεμφοκύτταρα αλλά κυρίως σε μη ειδικά κύτταρα και πιθανώς να σχετίζεται επιπλέον και με μη-κυττολυτικούς μηχανισμούς (π.χ. έκκριση κυττοκινών).



## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Συμπερασματικά, στην εργασία μας κατεδείχθη ότι **οι ασθενείς με HBeAg (-) χρόνια ηπατίτιδα B** παρουσιάζουν σημαντικές ανοσιακές αποκρίσεις με ικανότητα πολλαπλασιασμού των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων (ιδίως των CD4) έναντι πολλαπλών αντιγονικών επιτόπων των πρωτεϊνών του πυρηνοκαψιδίου (core) αλλά και του φακέλλου (envelope) του HBV. Παρουσιάζουν επιπλέον, και σημαντική ικανότητα παραγωγής ιντερφερόνης-γ, όμως τα διεγερμένα αυτά κύτταρα έναντι των πρωτεϊνών του HBcore και envelope είναι πολύ περιορισμένα (<1%), γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει ότι στις εξάρσεις της HBeAg (-) ΧΗΒ παρατηρείται ενεργοποίηση μη ειδικών T-λεμφοκυττάρων, τα οποία χωρίς να κατορθώνουν την εκρίζωση του ιού, συμμετέχουν όμως στην πρόκληση νεκροφλεγμονής που είναι χαρακτηριστική στους ασθενείς αυτούς.

Περαιτέρω, **οι ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα B** παρουσιάζουν αφενός μεν ικανότητα πολλαπλασιασμού των CD4 λεμφοκυττάρων τους παρόμοια με αυτή των ασθενών με HBeAg (-) ΧΗΒ, χωρίς όμως να έχουν αυξημένο το συνολικό ποσοστό των διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων (effector T-cells). Όμως, αντίθετα, το ποσοστό των ειδικών για το HBcAg και το HBsAg διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων παρουσιάζεται αυξημένο, γεγονός που υποδηλώνει ότι κατά τη διάρκεια των επεισοδίων οξείας ηπατίτιδας

αναπτύσσεται μία ειδική και εστιασμένη έναντι των πρωτεϊνών του ιού ανοσιακή απάντηση, η οποία οδηγεί τελικά και στην εκρίζωση της λοίμωξης.

Τέλος, **οι ασυμπτωματικοί φορείς** ενώ παρουσιάζουν ισχνή CD4 ανοσιακή απάντηση έναντι των πρωτεϊνών/πεπτιδίων του HBcAg και του HBsAg διατηρούν ένα σημαντικό ποσοστό διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων τόσο μη ειδικών όσο και ειδικών έναντι του HBsAg.

Παρότι στη δική μας μελέτη δεν ελέγξαμε τη λειτουργικότητα των ειδικών αυτών διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων των ασυμπτωματικών φορέων, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι στην ομάδα αυτή των ασθενών, υπάρχει τόσο στην περιφέρεια όσο και στο ήπαρ ένας πληθυσμός ειδικών για τον ιό HBV T-λεμφοκυττάρων που παράγει κυττοκίνες με αποτέλεσμα να ελέγχει τον πολλαπλασιασμό του ιού χωρίς να προκαλεί ιστολογική βλάβη μέσω κυτταρόλυσης.

## **Περίληψη**

### **Κυτταρικές ανοσιακές αντιδράσεις στην ΗΒεΑg αρνητική χρονία ηπατίτιδα Β**

Σκοπός: Η ανοσοπαθογένεια της ΗΒεΑg αρνητικής χρονίας ηπατίτιδας Β (ΧΗΒ) δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Σκοπός λοιπόν της παρούσας μελέτης ήταν η αποτύπωση των κυτταρικών ανοσιακών αντιδράσεων στη μορφή αυτή της ΧΗΒ.

Ασθενείς και μέθοδοι: Μελετήσαμε τις κυτταρικές ανοσιακές αντιδράσεις των περιφερικών λεμφοκυττάρων χρησιμοποιώντας λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες, μεθόδους ενδοκυττάριας χρώσης κυττοκινών (intracellular cytokine staining (ICS) καθώς και μέτρησης της παραγωγής ιντερφερόνης-γ με τη μέθοδο ELISPOT μετά από μη ειδική και ειδική διέγερση με ολικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Β (Hepatitis B Virus, HBV) αλλά και συνθετικά πεπτίδια.

Τριάντα ασθενείς με ΗΒεΑg αρνητική ΧΗΒ, έντεκα ασυμπτωματικοί φορείς, εννέα ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β και εικοσιδύο υγιείς μάρτυρες εισήχθησαν στη μελέτη.

Αποτελέσματα: Οι ασθενείς με ΗΒεΑg (-) ΧΗΒ παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό διεγερμένων περιφερικών CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων και παράλληλα

αυξημένο πολλαπλασιασμό των περιφερικών CD4 λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* διέγερση με αλληλοεπικαλυπτόμενα πεπτίδια του πυρηνοκαψιδίου του HBV καθώς και ένα πεπτίδιο του φακέλλου του HBV (HBs 182-191 aa), αντίδραση ομοιάζουσα σε ένταση με αυτή των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β.

Με τη χρήση ενδοκυττάριας χρώσης κυττοκινών (ICS), διαπιστώσαμε στην HBeAg (-) XHB έναν διεγερμένο πληθυσμό T-λεμφοκυττάρων με παραγωγή IFN- $\gamma$  (CD4+ και CD8+), μετά από μη ειδική διέγερση συγκριτικά με όλες τις άλλες ομάδες ασθενών και υγιών μαρτύρων. Επιπλέον οι ασθενείς με HBeAg(-) XHB καθώς και αυτοί με οξεία ηπατίτιδα Β παρουσίασαν έναν εξίσου αυξημένο αριθμό ειδικών για το πυρηνοκαψίδιο του ιού (HBcore) T λεμφοκυττάρων, όπως μετρήθηκε με τις μεθόδους υπολογισμού της IFN- $\gamma$ . Αντίθετα, ενώ οι ασυμπτωματικοί HBsAg φορείς είχαν ελάχιστες αντιδράσεις πολλαπλασιασμού των CD4+ λεμφοκυττάρων συνολικά όμως διατηρούσαν αυξημένο αριθμό διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων ειδικών για την πρωτεΐνη του φακέλλου (όπως μετρήθηκε με ICS).

Συμπεράσματα: Η μελέτη αυτή κατέδειξε ότι οι συνολικές CD4+ T λεμφοκυτταρικές αντιδράσεις των ασθενών με HBeAg (-) XHB είναι συγκρίσιμες με αυτές των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β, ενώ στους

ασυμπτωματικούς HBsAg φορείς παρά τις περιορισμένες CD4+αντιδράσεις, η ικανότητα διέγερσης των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων διατηρείται.

## **Abstract**

### **Cellular immune responses in hepatitis B virus e antigen negative chronic hepatitis B**

Background-Aims: The immunopathogenesis of hepatitis B e antigen (HBeAg) negative chronic hepatitis B (CHB) virus (HBV) infection has not been adequately investigated.

Patients and methods: We studied the cellular immune responses of peripheral lymphocytes using proliferative assays, intracellular cytokine staining (ICS) and ELISPOT interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) assays after non-specific and specific stimulation with whole HBV proteins and synthetic peptides. Thirty patients with HBeAg negative CHB, eleven HBsAg inactive carriers, nine patients with acute hepatitis B and twenty-two healthy controls were included in the study.

Results: Patients with HBeAg negative CHB demonstrated an increased number of peripheral CD8<sup>+</sup> T-cells while their peripheral blood mononuclear cells showed increased proliferation after in vitro stimulation with overlapping hepatitis B core peptides and an envelope derived epitope (HBs 182-191 aa), similar to those observed in acute hepatitis B. Using ICS, we found an expanded population of IFN- $\gamma$  producing T lymphocytes, CD4<sup>+</sup>

and CD8+, after non-specific stimulation, in HBeAg negative CHB compared to all other groups. HBeAg negative CHB and acute hepatitis B patients had a similarly increased number of core specific T cells measured by the IFN- $\gamma$  assays. Inactive HBsAg carriers showed minimal proliferative responses overall while they exhibited an increased number of envelope specific effector T cells (measured by ICS).

Conclusions: We showed that overall CD4+ T cell responses from patients with HBeAg negative CHB were comparable to those of acute hepatitis B, while in inactive HBsAg carriers despite their limited proliferative capacity the effector activity of their peripheral T cells was maintained.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Vento S, Garofano T, Renini C, Cainelli F, Casali F, Ghironzi G, et al. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998;338:286-290.
2. Shaw DD, Whiteman DC, Merritt AD, el-Saadi DM, Stafford RJ, Heel K, et al. Hepatitis A outbreaks among illicit drug users and their contacts in Queensland, 1997. *Med J Aust* 1999;170:584-587.
3. Chudy M, Budek I, Keller-Stanislawski B, McCaustland KA, Neidhold S, Robertson BH, et al. A new cluster of hepatitis A infection in hemophiliacs traced to a contaminated plasma pool. *J Med Virol* 1999;57:91-99.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 1999;48:1-37.
5. Keefe EB. Is hepatitis A more severe in patients with chronic hepatitis B and other chronic liver diseases? *Am J Gastroenterol* 1995;90:201-205



6. Keefe EB. Vaccination against hepatitis A and B in chronic liver disease. *Viral Hepatitis Rev* 1999;5:77-88.
7. Labrique AB, Thomas DL, Stoszek SK et al. Hepatitis E: an emerging infectious disease. *Epidemiol Rev* 1999;21:162-179.
8. Bryan JP, Tsarev SA, Iqbal M, et al. Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against the disease. *J Infect Dis* 1994;170:517-521.
9. Thomas DL, Yarbough PO, Vlahov D, et al. Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin Microbiol* 1997;35:1244-1247.
10. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine* 1997;15:1834-1838.
11. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.
12. Kuo G, Choo QL, Alter HJ et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362.

13. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-770.
14. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liv Dis* 1995;15:41-63
15. Kleinmann SH, Busch MP. The risks of transfusion-transmitted infection: direct estimation and mathematical modeling. *Baillieres Best Pract Res Res Clin Haematol* 2000;13:631-649.
16. Vandelli C, Renzo F, Romano L, Tisminetzky S, De Palma M, Stroffolini T, Ventura E, Zanetti A. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol* 2004;99:855-9.
17. Ceci O, Margiotta M, Marello F, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus in a cohort of 2447 HIV-seronegative pregnant women: a 24-month prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:570.
18. Jaeckel E, Conberg M, Wedemeyer H et al. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 2001;345:1452.

19. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001;358:958-965.
20. Fried MW, Shiffman M, Reddy RK, et al. Pegylated (40KDa) interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982.
21. Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan T, et al. Peginterferon a-2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355.
22. Rizetto M. The delta agent. *Hepatology* 1983; 3: 729-737.
23. Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature* 1986; 323: 508-14
24. Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, et al. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology* 1997; 234: 160-167.

25. Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1993; 90: 9016-9020.
26. Lau DT, Doo E, Park Y, et al. Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology* 1999 ;30: 546-549.
27. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-45.
28. Lok AS, Heathcote J, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001;120:1828-53.
29. Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication-an update. *J Vir Hep* 1996;3:217-26.
30. Weiser B, Ganem D, Seeger C. Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogeneous forms in livers from animals infected with ground squirrel hepatitis virus. *J Virol* 1983;48:1-9.
31. Tavis JE. The replication strategy of hepadnaviruses. *Vir Hep Rev* 1996;2:205-218.
32. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-503.

33. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;8:167-74.
34. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83: 2059-73.
35. Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995;38:24-34.
36. Lindh M, Anderson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus large-scale analysis using a new genotyping method. *J Inf Dis* 1997;175:1285-93.
37. Hadziyannis SJ. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition to pathogenesis and treatment. *Vir Hep Rev* 1995;1:7-36.
38. Laras A, Koskinas J, Hadziyannis S. In vivo suppression of precore mRNA synthesis is associated with mutations in the hepatitis B virus core promoter. *Virology* 2000; 295:86-89.
39. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of

- hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. Lancet 1989;2:588-591.
- 40.Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore region during hepatitis B e antigen seroconversion. Hepatology 1999;29:976-84
- 41.Rodríguez-Frias F, Buti M, Jardí R et al. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. Hepatology 1995;22:1641-47.
- 42.Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengle R, Cattaneo R, Schaller H. Replication strategy of human hepatitis B virus. J Virol 1987;61:904-11.
- 43.Carman WF, Boner W, Fattovich G, Colman K, Dornan E, Thursz M, Hadziyannis SJ. Hepatitis B virus core protein mutations are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and in T helper cell epitopes during clinical remission. J Inf Dis 1997;175:1093-1100.
- 44.Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Brechot C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. Oncogene 1999;18:4848-4859.

45. Carman WF, Trautwein C, Vandeursen FJ, Colman K, Dornan E, McIntyre G, Waters J, Kliem V, Muller R, Thomas HC, Manns MP. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996;24:489-93.
46. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lin HH, Wang SM, Chen DS. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997;26:786-91.
47. Papatheodoridis GV, Dimou E, Papadimitropoulos V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1618-28.
48. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998;27:1670-7.
49. Qi X, Snow A, Thibault V, et al. Long-term incidence of adefovir dipivoxil (ADV) resistance in chronic hepatitis B (CHB) patients after 144 weeks of therapy. *J Hepatol* 2004;40(Suppl.1):20-21.

50. Poordad F and Chee GM. Viral resistance in hepatitis B: prevalence and management. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12:62-69.
51. Fattovich G, Brollo L, Giustina G, et al. Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. *Gut* 1991;32:294-8.
52. Realdi G, Fattovich G, Hadziyannis S, et al. Survival and prognostic factors in 366 patients with compensated cirrhosis type B: a multicenter study. *J Hepatol* 1994;21:656-66.
53. Alter M. Epidemiology and disease burden of hepatitis B and C. *Antiviral Ther* 1996 (suppl 3);1:9.
54. Gust ID. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. *Gut* 1996 (suppl 2);38:S18.
55. Okada K, Kamiyama I, Inomata M, et al. E antigen and anti-E in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N Engl J Med* 1976;294:746.
56. Hwang LY, Roggendorf M, Beasley RP, et al. Perinatal transmission of hepatitis B virus: role of maternal HBeAg and anti-HBc IgM. *J Med Virol* 1985;15:265.
57. Chang M, Chen C, Lai M, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children.



- Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* 1997;336:1855-59.
58. Τσαντούλας Δ. Ηπατίτιδα Β το 2001: αλλαγές στην επιδημιολογία και τη Δημόσια Υγεία. Στο: Ιογενής ηπατίτιδα Β και C, εκδόσεις Πασχαλίδης, 2003: 7-12.
59. Hadziyannis SJ, Vasilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:617-24.
60. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1991;11:73-83.
61. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-539.
62. Fong TL, Di Bisceglie AM, Biswas R, Waggoner JG, et al. High levels of viral replication during acute hepatitis B infection predict progression to chronicity. *J Med Virol* 1994; 43: 155-158.
63. Bertolotti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003; 38: 4-13.
64. de Franchis R, Meucci G, Vecchi M, et al. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med* 1993;118:191-4.

65. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60.
66. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari F. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25-36.
67. Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-21.
68. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6599-6603.
69. Hadziyannis SJ, Bramou T, Alexopoulou A, Makris A. Immunopathogenesis and natural course of anti-HBe positive chronic hepatitis with replicating B virus. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: William and Wilkins, 1991;673-676.
70. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284: 825-29.

71. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699.
72. Schendel D, Maget B, Falk C, Wank R. Human CD8<sup>+</sup> lymphocytes. In: *Immunology Methods Manual*, Academic Press, 1997;669-690
73. Kimura K, Ando K, Tomita E, Ohnishi H, Ishikawa T, et al. Elevated intracellular IFN- $\gamma$  levels in circulating CD8<sup>+</sup> lymphocytes in patients with fulminant hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:579-583
74. Vasilopoulos D, Rapti I, Nikolaou M, Hadziyannis E, Hadziyannis S. Cellular immune responses in hepatitis B virus e antigen negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2008;15:817-26
75. Funk M, Rosenberg D, Lok A. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Vir Hep* 2002; 9: 52-61
76. Hadziyannis S, Vasilopoulos D. Immunopathogenesis of hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B infection. *Antivir Research* 2001; 52:91-98
77. Alexopoulou A, Karayiannis P, Hadziyannis S, Aiba N, Thomas H. Emergence and selection of HBV variants in an anti-HBe positive patient persistently infected with quasi-species. *J Hepatol* 1997; 26: 748-753

- 78.Hadziyannis S, Lieberman H, Karvountzis G, Shafritz D. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 1983; 3: 656-662
- 79.Hadziyannis S, Hadziyannis A, Dourakis S, Alexopoulou A, Horsch A, Hess G. Clinical significance of quantitative anti-HBc IgM assay in acute and chronic HBV infection. *Hepatogastroenterology* 1993; 40: 588-592
- 80.Ferrari C, Penna A, Bertolotti A, Valli A, Degli Antoni A, Giuberti T, Cavalli A, Petit M-A, Fiaccadori F. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1990; 145: 3442-3449
- 81.Lohr HF, Weber W, Schlaak J, Goergen B, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Proliferative response of CD4+ T cells and hepatitis B virus clearance in chronic hepatitis with or without hepatitis B e-minus hepatitis B virus mutants. *Hepatology* 1995; 22: 61-68
- 82.Jung M-C, Spengler U, Schraut W, Hoffmann R, Zachoval R, Eisenburg J, Eichenlaub D, Rietmuller G, Paumgartner G, Ziegler-Heitbrock HWL, Will H, Pape GR. Hepatitis B virus antigen-specific

- T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1991; 13: 310-317
83. Jung M-C, Diepolder H, Spengler U, Wierenga E, Zachoval R, Hoffmann R, Eichenlaub D, Frosner G, Will H, Pape G. Activation of a heterogeneous hepatitis B (HB) core and e antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell population during seroconversion to anti-HBe and anti-HBs in hepatitis B virus infection. *J Virol* 1995; 69: 3358-3368
84. Marinos G, Torre F, Choksi S, Hussain M, Clarke B, Rowlands D, Eddleston A, Naoumov N, Williams R. Induction of T-helper cell response to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B: A major factor in activation of the host immune response to the hepatitis B virus. *Hepatology* 1995; 22: 1040-1049
85. Mizukoshi E, Sidney J, Livingston B, Ghany M, Hoofnagle J, Sette A, Rehermann B. Cellular immune responses to the hepatitis B virus polymerase. *J Immunol* 2004; 173: 5863-5871
86. Chu CM, Liaw YF. Peripheral T-cell subsets in asymptomatic hepatitis B-virus carriers. *Cell Immunol* 1986; 98: 533-537
87. Chu CM, Liaw YF, Yang CY, Sheen IS. Peripheral T-cell subsets in chronic type B hepatitis: correlation with biochemical and histological

- activities and hepatitis B e antigen status. *Cell Immunol* 1984; 86: 562-566
88. Thomas H, Brown D, Routhier G, Janossy G, Kung P, Goldstein G, Sherlock S. Inducer and suppressor T-cells in hepatitis B virus-induced liver disease. *Hepatology* 1982; 2: 202-204
89. Jung M-C, Hartmann B, Gerlach J-T, Diepolder H, Gruber R, Schraut w, Grüner N, Zachoval R, Hoffmann R, Santantonio T, Wächtler M, Pape GR. Virus-specific lymphokine production differs quantitatively but not qualitatively in acute and chronic hepatitis B infection. *Virology* 1999;261:165-172
90. Hyodo N, Tajimi M, Ugajin T, Nakamura I, Imawari M. Frequencies of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells and liver infiltrating lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology Research* 2003;27: 109-116
91. Maini M, Boni C, Lee C, Larrubia J, Reignat S, Ogg G, King A, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov N, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD8<sup>+</sup> cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269-1280

92. Maini M, Boni C, Ogg G, King A, Reignat S, Lee C, Larrubia J, Webster G, McMichael A, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertolotti A. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999; 117: 1-13