

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ Γ.Ν.Α «ΛΑΙΚΟ»

Διευθυντής: Γεώργιος Παπαθεοδωρίδης



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Η σημασία της γήρανσης των ηπατοκυττάρων στη φυσική ιστορία της
χρόνιας λοίμωξης με ιό Ηπατίτιδας Β»**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Δ. ΚΑΡΑΚΟΥΣΗΣ

Ιατρός – Ειδικός Παθολόγος

Αθήνα, Απρίλιος 2023

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΥΝΑ 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 ΉΓΗΣΑΣΘΕ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, 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
ΚΙΣ ΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ,
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ, ΕΙΡΨΕΙΝ, 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 ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΞΥ
ΝΔΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ, Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, 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
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



Ημερομηνία αίτησης του υποψηφίου: 27/09/2019

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 22/11/2019

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Γεώργιος Παπαθεοδωρίδης - Καθηγητής (Επιβλέπων)

Ευάγγελος Χολόγκιτας - Καθηγητής

Αντώνιος Χατζηγεωργίου - Αναπληρωτής Καθηγητής

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 24/01/2020

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 07/04/2023

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών (ΕΚΠΑ): Καθηγητής Γεράσιμος Σιάσος

Μέλη επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Γεώργιος Παπαθεοδωρίδης, Καθηγητής

Σπήλιος Μανωλακόπουλος, Καθηγητής

Ιωάννης Βλαχογιαννάκος, Καθηγητής

Ευάγγελος Χολόγκιτας, Καθηγητής

Αιμιλία Χατζηγιάννη, Καθηγήτρια

Αντώνιος Χατζηγεωργίου, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μαρία - Μέλανη Ντόιτς, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα. (ΝΟΜΟΣ 5343/1932, Άρθρο 202, παράγραφος 2)



Στον Κύριο μου,
Στον πατέρα μου Δημήτριο και μητέρα μου Θεοδώρα,
Στην αδελφή μου Θώμη
Στη γιαγιά μου Αναστασία
Στους αγαπημένους μου ανθρώπους
Στον ανιδιοτελή επιστημονικό μόχθο για να “ψηλώσει” η ανθρωπότητα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
II. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	8
III. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	20
A. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β	21
1. Εισαγωγή.....	21
2. Επιδημιολογικό φορτίο της λοίμωξης HBV	22
3. Δομικά στοιχεία του ιού ηπατίτιδας Β	24
4. Γενετική ετερογένεια του ιού ηπατίτιδας Β.....	26
5. Κύκλος αναπαραγωγής του HBV.....	28
6. Φυσική εξέλιξη και μετάδοση της HBV λοίμωξης.....	30
7. Δείκτες του ιού της ηπατίτιδας Β.....	32
8. Τα στάδια της λοίμωξης με ιό ηπατίτιδας Β	33
9. Πρόληψη και θεραπευτικά μέσα έναντι της ηπατίτιδας Β.....	36
10. Ηπατίτιδα Β και Ηπατοκυτταρικός Καρκίνος (ΗΚΚ)	40
B. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ.....	42
1. Εισαγωγή.....	42
2. Παθοφυσιολογία της κυτταρικής γήρανσης.....	43
3. Δείκτες εντοπισμού κυτταρικής γήρανσης.....	52
4. Φλεγμονή, κυτταρική γήρανση και καρκίνος.....	54
5. Φαρμακευτική αντιμετώπιση της γήρανσης των κυττάρων	56
Γ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	58
IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
A. ΣΚΟΠΟΣ	61
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	62
Ασθενείς της μελέτης.....	62
Πρωτόκολλο παρακολούθησης ασθενών.....	64
Καταληκτικά σημεία.....	65
Εργαστηριακές μέθοδοι	66
Στατιστική ανάλυση.....	71
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	72
1. Χαρακτηριστικά ασθενών της μελέτης.....	72

2. Επίπεδα ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA (cfDNA) στον ορό των ασθενών.....	77
3. Επίπεδα 5-methyl-2'-deoxycytidine στον ορό των ασθενών	79
4. Συσχετίσεις ελεύθερου κυττάρου DNA και 5-methyl-2'-deoxycytidine με επιδημιολογικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα ασθενών	82
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	84
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	88
VI. SUMMARY.....	89
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	90

I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα σε αυτό το σημείο να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς:

- *Τον καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Γεώργιο Παπαθεοδωρίδη, τόσο για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής, όσο και για την υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της. Τον ευχαριστώ επίσης για τη μεταλαμπάδευση της πολύτιμης γνώσης του στις ιογενείς ηπατίτιδες και γενικότερα στον τομέα της ηπατολογίας.*
- *Τον καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Ευάγγελο Χολόγκιτα για την καθοδήγηση και την αρωγή του στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.*
- *Τον αναπληρωτή καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Αντώνιο Χατζηγεωργίου για τη μετάδοση της πολύτιμης εμπειρίας και της τεχνογνωσίας των εργαστηριακών μεθόδων, πάνω στις οποίες στηρίχτηκε η εκπόνηση αυτής της μελέτης.*
- *Την ομότιμη καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κα Αναστασία Τζώνου, η οποία ήταν μέντορας κατά την επιστημονική μου πορεία.*
- *Τον Dr. Παναγιώτη Λεμπέση, επόπτη ερευνητικού εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη γνώση του στις εργαστηριακές τεχνικές και πρωτόκολλα.*
- *Τους εργαστηριακούς συναδέλφους μου.*
- *Όλους τους ασθενείς και τις οικογένειες τους για τη συμμετοχή τους στη μελέτη και την άψογη συνεργασία κατά την παρακολούθηση τους.*
- *Τη μητέρα μου Θεοδώρα και την αδελφή μου Θώμη, καθώς ήταν πάντα δίπλα μου με την ανιδιοτελή αγάπη τους.*
- *Τον πατέρα μου Δημήτριο για την αισιοδοξία και τη συμπαράσταση του καθ' όλη την πορεία μου, από όταν έφυγα από την ιδιαίτερη πατρίδα μου, την πόλη των Τρικάλων Θεσσαλίας για να σπουδάσω έως και σήμερα, πλέοντας για χρόνια σε αχαρτογράφητα ύδατα.*

Π. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία Γέννησης: 04-11-1987

ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

22 Νοεμβρίου 2019 έως και σήμερα: Υποψήφιος διδάκτωρ, Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική, Γ.Ν.Α Λαϊκό, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιβλέπων: Καθηγητής Γ. Παπαθεοδωρίδης).

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

(Οκτώβριος 2020 έως και Οκτώβριο 2022): Επικουρικός Επιμελητής Β' – Ειδικός Παθολόγος στο Κέντρο Υγείας (Κ.Υ) Αμαρουσίου, Π.Φ.Υ, Αττική, με ταυτόχρονη παροχή ιατρικών υπηρεσιών στο ιατρείο της νόσου Covid-19 του Κ.Υ Αμαρουσίου

(Μάιος 2019 έως και Μάιος 2020): Επιστημονικός συνεργάτης – Ειδικός Παθολόγος, μετεκπαιδευόμενος ηπατολογίας του Ιατρείου Ήπατος και Μεταμόσχευσης Ήπατος της Πανεπιστημιακής Γαστρεντερολογικής Κλινικής, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α), Γ.Ν.Α Λαϊκό (Καθηγητής κ. Παπαθεοδωρίδης Γεώργιος)

(Μάιος 2014 μέχρι και Ιανουάριος 2019): Ειδικευόμενος ιατρός Εσωτερικής Παθολογίας στο Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο. Την ίδια περίοδο , βοηθός ιατρός θαλάμου στη

Μ.Ε.Λ, βοηθός ιατρός στο Ηπατολογικό και Υπερτασιολογικό Ιατρείο του Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο

(Ιανουάριος 2014 έως και Μάιος 2014): Ιατρός (Μ.Δ) Κλινικής Αποκατάστασης «ΑΡΩΓΗ» (Καρδίτσα)

(Οκτώβριος 2013 έως και Ιανουάριος 2014): Ιατρός (Μ.Δ) Κλινικής Αποκατάστασης «ΑΝΥΜΟΥΣ» (Λάρισα)

(Σεπτέμβριος 2012 έως και Σεπτέμβριος 2013): Υποχρεωτική Υπηρεσία Υπαίθρου, Αγροτικός Ιατρός περιφερικού ιατρείου Γεωργανάδων - Κ.Υ Φαρκαδόνας και Γενικού Νοσοκομείου Τρικάλων (Γ.Ν.Τ)

(Οκτώβριος 2011 έως και Ιούλιος 2012): Ιατρός (Μ.Δ) – Καταδρομέας Ε΄ Μοίρας Καταδρομών (Δράμα) & Κ.Ε.Ο.Α.Χ Ολύμπου (θητεία)

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Μάιος 2019 - Μάιος 2020: Μετεκπαίδευση στην Ηπατολογία, στο Ιατρείο Ήπατος και Μεταμόσχευσης Ήπατος της Πανεπιστημιακής Γαστρεντερολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α), Γ.Ν.Α Λαϊκό (Διευθυντής Καθηγητής Γεώργιος Παπαθεοδωρίδης).

Μάιος 2014 - Ιανουάριος 2019: Ολοκλήρωση Ιατρικής Ειδικότητας (βασική υποχρεωτική εκπαίδευση) στην Εσωτερική Παθολογία, Β΄ Παθολογική Κλινική, Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο (Συντονιστής Διευθυντής κ. Ευάγγελος Δημητρέλλος) και λήψη τίτλου Ιατρικής Ειδικότητας στην Εσωτερική Παθολογία (επιτυχής εξέταση 8/5/2019, Γ.Ν.Α Αλεξάνδρα – λήψη τίτλου 13/6/2019) (Ειδικός Παθολόγος)

2018: Παρακολούθηση μαθημάτων «Εισαγωγή στη Στατιστική Ανάλυση Βιο-Ιατρικών Δεδομένων με πρακτική Εφαρμογή σε Η/Υ» (SPSS) (Αθήνα 2018-2019) και λήψη Διπλώματος (Ιατρική Σχολή Αθηνών - Ε.Κ.Π.Α - Κέντρο Επιμόρφωσης και δια Βίου Μάθησης)

2017 - 2018: Ολοκλήρωση «Ετήσιου Πανελλαδικού Εκπαιδευτικού Προγράμματος στις Λοιμώξεις» και λήψη διπλώματος (Αθήνα 2017-2018) (Ελληνική Εταιρεία Λοιμώξεων - Ε.Ε.Λ)

2016 - 2017: Ολοκλήρωση 10^{ου} Σχολείου Κλινικής Ηπατολογίας και λήψη διπλώματος (μέσω γραπτών εξετάσεων) (Αθήνα – Θεσσαλονίκη, 2016 - 2017) (Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Ήπατος - Ε.Ε.Μ.Η)

2015 - 2017: Ολοκλήρωση Π.Μ.Σ - Master στα «Μεταβολικά Νοσήματα Οστών» (Εθνικό Κέντρο Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων LRMS, Γ.Ν.Α Κ.Α.Τ, Ιατρική Σχολή Αθηνών, Ε.Κ.Π.Α) και λήψη Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στα «Μεταβολικά Νοσήματα Οστών» (Αθήνα, 30/11/2017) με βαθμό «Άριστα» (Τίτλος Πτυχιακής: Χρόνια Παγκρεατίτιδα και Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών - Παρουσίαση:14/11/2017) (MSc)

2015 - 2016: Ολοκλήρωση «Μετεκπαιδευτικών Σεμιναρίων 26^η Σειρά» στη «Μελέτη της Υπέρτασης» (Αθήνα, 2015-2016) και λήψη διπλώματος (Ελληνική Εταιρεία Υπέρτασης - Ε.Ε.Υ)

2015: Λήψη πιστοποίησης BLS - AED (basic life support and automated external defibrillation) - Πιστοποιημένος Ανανήπτης

2005 - 2011: Αποφοίτηση από την Ιατρική Σχολή Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α), με βαθμό «Λίαν Καλώς» (Αθήνα, 09/08/2011) (MD)

2002 - 2005: Απολυτήριο 3^{ου} Ενιαίου Λυκείου Τρικάλων (Θετικής Κατεύθυνσης), Βαθμός «Άριστα», Δεκαεννέα και έξι δέκατα (19 & 6/10). Με βαθμό πρόσβασης 19.24, εισαγωγή μέσω Πανελληνίων Εξετάσεων (3^ο Ενιαίο Λύκειο Τρικάλων) στην Ιατρική Σχολή Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: «Άριστα» (Διπλώματα: Certificate of Proficiency in English CAMBRIDGE/ Certificate of Proficiency in English MICHIGAN/ Lower Diploma in English CAMBRIDGE/ Lower Diploma in English MICHIGAN)

Γαλλικά: «Πολύ Καλά» (Δίπλωμα: DIPLOME D' ETUDES EN LANGUE FRANCAISE - DELFE A1 έως A4)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **Karakousis ND**, Gourgoulianis KI, Kotsiou OS. The Role of Folic Acid in SARS-CoV-2 Infection: An Intriguing Linkage under Investigation. Journal of Personalized Medicine. 2023 Mar 21;13(3):561. doi: 10.3390/jpm13030561.
2. **Karakousis ND**, Chrysavgis L, Papatheodoridi A, Legaki A-I, Lembessis P, Cholongitas E, Chatzigeorgiou A, Papatheodoridis G. Significance of Circulating Cell-Free DNA Biomarkers in HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Virus Infection and Their Changes after Treatment Initiation. Pathogens. 2023 Mar 1;12(3):394. doi: 10.3390/pathogens12030394.
3. Galanakos SP, Bablekos GD, Tzavara C, **Karakousis ND**, Sigalos E. Primary Health Care: Our Experience From an Urban Primary Health Care Center in Greece. Cureus. 2023 Feb 20;15(2):e35241. doi: 10.7759/cureus.35241. eCollection 2023 Feb.
4. Kostakopoulos NA, **Karakousis ND**, Linardoutsos D, Argyropoulos V, Kouropakis P, Kastora S, Kostakopoulos AN. A Giant Hepatoid Carcinoma of the Perirenal Fat With Very High A-Fetoprotein and Vitamin B12 Levels. American Surgeon. 2023 Feb;89(2):328-330. doi: 10.1177/0003134820952824. Epub 2020 Nov 10.
5. **Karakousis ND**, Pyrgioti EE, Georgakopoulos PN, Papanas N. Vitamin B12 and Diabetic Foot: A Mini-Review. The International Journal of Lower Extremity Wounds. 2022 Nov 29;15347346221143018. doi: 10.1177/15347346221143018. Online ahead of print.

6. Kotsiou OS, **Karakousis N**, Papagiannis D, Matsiatsiou E, Avgeri D, Fradelos EC, Siachpazidou DI, Perlepe G, Miziou A, Kyritsis A, Gogou E, Vavougiou GD, Kalantzis G, Gourgoulialis KI. The comparative superiority of SARS-CoV-2 antibody response in different immunization scenarios. *Journal of Personalized Medicine*. 2022 Oct 23;12(11):1756. doi: 10.3390/jpm12111756.
7. **Karakousis ND**, Biliou S, Pyrgioti EE, Georgakopoulos PN, Liakopoulos V, Papanas N. Frailty, sarcopenia and diabetic kidney disease. *International Urology and Nephrology*. 2022 Nov 10. doi: 10.1007/s11255-022-03392-1. Online ahead of print.
8. Bellos TC, Tzelves LI, Manolitsis IS, Katsimperi SN, Berdempes MV, Skolarikos A, **Karakousis ND**. Frailty and benign prostatic hyperplasia: The thrilling underlying impact. *Archives of Italian Urology and Andrology*. 2022 Sep 27;94(3):345-349. doi: 10.4081/aiua.2022.3.345.
9. **Karakousis ND**, Kotsiou OS, Gourgoulialis KI. Bronchial asthma and sarcopenia: An upcoming potential interaction. *Journal of Personalized Medicine*. 2022 Sep 21;12(10):1556. doi: 10.3390/jpm12101556.
10. Bellos TC, Tzelves LI, Manolitsis IS, Katsimperi SN, Berdempes MV, Skolarikos A, **Karakousis ND**. Sarcopenia in urinary bladder cancer: Definition, prevalence and prognostic value in survival. *Maedica*. 2022 Jun; 17(2):427-435. doi: 10.26574/maedica.2022.17.2.427.
11. **Karakousis ND**, Pyrgioti EE, Georgakopoulos PN, Papanas N. Sarcopenia, frailty and diabetic foot: A mini narrative review. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2022 Jul 5;15347346221111420. doi: 10.1177/15347346221111420. Online ahead of print.
12. **Karakousis ND**, Chrysavgis L, Chatzigeorgiou A, Papatheodoridis G, Cholongitas E. Frailty in metabolic syndrome, focusing on nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Gastroenterology*. 2022 May-Jun; 35(3):234-242. doi: 10.20524/aog.2022.0705. Epub 2022 Mar 25.
13. Pyrgioti EE, **Karakousis ND**. B12 levels and frailty syndrome. *Journal of Frailty, Sarcopenia and Falls*. 2022 Mar 1;7(1):32-37. doi: 10.22540/JFSF-07-032. eCollection 2022 Mar.
14. **Karakousis N**, Kostakopoulos NA, Georgakopoulou VE, Pyrgioti EE, Georgakopoulos PN. A Rare Case of Dulaglutide-Associated Angioedema in a

- Male Patient. *Cureus*. 2021 Nov 30;13(11):e20041. doi: 10.7759/cureus.20041. eCollection 2021 Nov.
15. **Karakousis ND**, Kostakopoulos NA. Hyponatremia in the frail. *Journal of Frailty, Sarcopenia and Falls*. 2021 Dec 1;6(4):241-245. doi: 10.22540/JFSF-06-241. eCollection 2021 Dec.
 16. Papatheodoridi A, **Karakousis N**, Lembessis P, Chatzigeorgiou A, Papatheodoridis GV. The Significance of Circulating Cell-Free DNA Markers in Chronic Hepatitis B Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Pathogens*. 2021 Nov 22;10(11):1524. doi: 10.3390/pathogens10111524.
 17. Kostakopoulos NA, **Karakousis ND**, Moschotzopoulos D. Frailty associated urinary tract infections (FaUTIs). *Journal of Frailty, Sarcopenia and Falls*. 2021 Mar 1;6(1):9-13. doi: 10.22540/JFSF-06-009. eCollection 2021 Mar.
 18. **Karakousis ND**, Papatheodoridi A, Chatzigeorgiou A, Papatheodoridis G. Cellular senescence and hepatitis b related hepatocellular carcinoma: an intriguing link. *Liver International*. 2020 Dec;40(12):2917-2927. doi: 10.1111/liv.14659.
 19. Kostakopoulos NA, **Karakousis ND**. Frailty assessment and postoperative complications in urologic oncology operations. *Journal of Frailty, Sarcopenia and Falls*. 2020 Sep 1;5(3):57-61. doi: 10.22540/JFSF-05-057. eCollection 2020 Sep
 20. Papakonstantinou IP, **Karakousis ND**, Andreadis EA. Gastric neuroendocrine tumour, atrophic gastritis and autoimmune haemolytic anaemia: a case report and review. *Scottish Medical Journal*. 2019 Nov;64(4):154–158. doi:10.1177/0036933019867574. Epub 2019 Aug 12
 21. **Karakousis ND**, Kolonia V, Saltamavros AD, Ntellas P, Kaligeros K. Anemia associated with autoimmune liver disease in a middle-aged female. *Archives of Hellenic Medicine*. 2019 Jan-Feb;36(1):114-116.
 22. **Karakousis ND**, Kanakas CA. From pruritus to CREST syndrome in a middle aged woman. *Journal of Frailty, Sarcopenia and Falls*. 2017 Mar 1;2(1):6–8. doi: 10.22540/JFSF-02-006. eCollection 2017 Mar

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Καρακούσης Ν. Δ. Διαταραχές οστικού μεταβολισμού στη χρόνια παγκρεατική φλεγμονή. Σκελετική Υγεία. 2017 Οκτ-Δεκ, Τόμος 16^{ος} , Τεύχος 4^ο, 114-118.

ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΕΣ ΟΜΙΛΙΕΣ

Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικού Ιδρύματος Οστεοπόρωσης, με τίτλο «Κριτική παρουσίαση των οδηγιών για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης - συννοσηρότητες»: Ομιλία με θέμα «Πώς παρακολουθείται η θεραπεία και τι σημαίνει επιτυχής αντιοστεοπορωτική αγωγή». Ναύπλιο, 23-25 Φεβρουαρίου 2018.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **N. D. Karakousis**, T. Nikolopoulou, E. Karakou, K. Strigkli, E. Alafaki, M. Mpakali, N. Trakas, R. Hadjikyriakou. Evaluation of platelet distribution width in patients with hepatocellular carcinoma. 11th International Congress of Internal Medicine. Athens, Greece, July 4-6, 2021.
2. **N. D. Karakousis**, T. Nikolopoulou, E. Alafaki, E. Karakou, P. N. Georgakopoulos, M. Mpakali, N. Trakas, R. Hadjikyriakou. Diabetes and red cell distribution width: An interesting link. 11th International Congress of Internal Medicine. Athens, Greece, July 4-6, 2021.
3. **N. D. Karakousis**, N. P. Georgakopoulos, E. Pyrgiotti, P. N. Georgakopoulos. Asymptomatic bacteriuria in diabetic female patient recently treated with sodium glucose co-transporter 2 inhibitor. 11th International Congress of Internal Medicine. Athens, Greece, July 4-6, 2021.
4. O. Striligka, **N. D. Karakousis**, C. Gyftopoulou, P.- I. Kritikos, E. Alafaki, M. Mpakali, R. Hadjikyriakou. Human babesiosis transmission via tick bite in an elderly patient. 11th International Congress of Internal Medicine. Athens, Greece, July 4-6, 2021.

5. C. Georgakopoulos, P. Kouroupakis, P. Tzavara, **N. D. Karakousis**, V. Kolonia, P.-I. Kritikos, K. Iskos, O. Stefanidou, V. Mitrai, M. Martsoukou, M. Lada. Severe sepsis after dog bite. 10th International Congress of Internal Medicine. Athens, Greece, March 22-24, 2018.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **N. Δ. Καρακούσης**, Λ. Χρυσαιγής, Ά. Παπαθεοδωρίδη, Α-Ι. Λεγάκη, Π. Λεμπέσσης, Ε. Χολόγκιτας, Α. Χατζηγεωργίου, Γ. Παπαθεοδωρίδης. Αξιολόγηση επιπέδων του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA και της ολικής μεθυλίωσης του DNA ορού σε ασθενείς με HBeAg- αρνητική χρόνια λοίμωξη με ιό ηπατίτιδας Β (HBV). 42ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Αθήνα, 10-13 Νοεμβρίου 2022. (Βράβευση της εργασίας ως αναρτημένη ανακοίνωση στο 42ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας)
2. **N. Καρακούσης**, Μ. Γώγου, Μ. Δημητρίου, Σ. Γαλανάκος, Π. Γεωργακόπουλος. Η έννοια του συνδρόμου ευπάθειας και η αξιολόγηση του σε διαβητικούς ασθενείς στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας: Η ελληνική πραγματικότητα. Πανελλήνιες Εκπαιδευτικές Ημερίδες Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας «Γ. Παπαδάκης». Αθήνα, 10-14 Οκτωβρίου 2022.
3. **N. Καρακούσης**, Μ. Γώγου, Μ. Δημητρίου, Κ. Στριγκλή, Β. Κουτέρη, Α. Παππά, Χ. Ντούμος, Π. Γεωργακόπουλος. Εντερική παρασίτωση στο επίπεδο της πρωτοβάθμιας φροντίδας υγείας: Η εμπειρία του Κ.Υ Αμαρουσίου. Πανελλήνιες Εκπαιδευτικές Ημερίδες Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας «Γ. Παπαδάκης». Αθήνα, 10-14 Οκτωβρίου 2022.
4. **N. Καρακούσης**, Α. Χατζηγεωργίου. The syndrome of frailty: The modern “Achilles heel”. Ετήσιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Φυσιολογίας. Αθήνα, 15-16 Απριλίου 2022.
5. **N. Καρακούσης**, Ε. Καρακού, Τ. Νικολοπούλου, Κ. Στριγκλή, Ρ. Χατζηκυριάκου, Μ. Σονικιάν, Ν. Τράκας. Το κλάσμα αωρότητας των δικτυοερυθροκυττάρων στην παρακολούθηση της θεραπείας με ερυθροποιητίνη σε αιμοκαθαιρόμενους. 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας – Συνεχιζόμενη Εκπαίδευση στην

Παθολογία: Τι νεότερο στη διάγνωση και στη θεραπεία των νοσημάτων που αντιμετωπίζει ο Παθολόγος. Αθήνα, 3-6 Νοεμβρίου 2021.

6. **Ν. Καρακούσης**, Ν. Γεωργακόπουλος, Ε. Πυργιώτη, Π. Γεωργακόπουλος. Ήπιο αγγειοίδημα μετά την τροποποίηση αντιδιαβητικής αγωγής. 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας – Συνεχιζόμενη Εκπαίδευση στην Παθολογία: Τι νεότερο στη διάγνωση και στη θεραπεία των νοσημάτων που αντιμετωπίζει ο Παθολόγος. Αθήνα, 3-6 Νοεμβρίου 2021.
7. **Ν. Καρακούσης**, Τ. Νικολοπούλου, Ε. Καράκου, Κ. Στριγκλή, Ρ. Χατζηκυριάκου, Ν. Τράκας. Οι μεταβολές αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων ως δείκτης πρόγνωσης ασθενών με νόσο COVID-19. 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας – Συνεχιζόμενη Εκπαίδευση στην Παθολογία: Τι νεότερο στη διάγνωση και στη θεραπεία των νοσημάτων που αντιμετωπίζει ο Παθολόγος. Αθήνα, 3-6 Νοεμβρίου 2021.
8. **Ν. Καρακούσης**, Τ. Νικολοπούλου, Ρ. Χατζηκυριάκου, Μ. Λαδά. Μέσος όγκος αιμοπεταλίων σε ασθενείς με HIV λοίμωξη. 9^η Πανελλήνια Συνάντηση «AIDS, Ηπατίτιδες & Αναδυόμενα Νοσήματα – Πρόληψη – Διάγνωση – Θεραπεία». Αθήνα, 23-25 Σεπτεμβρίου 2021.
9. **Ν. Καρακούσης**, Ε. Καράκου, Τ. Νικολοπούλου, Π. Γεωργακόπουλος, Ε. Αλαφάκη, Ρ. Χατζηκυριάκου, Α. Σακαγιάννη, Ν. Τράκας. Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη ως προγνωστικός παράγοντας σε ασθενείς με νόσο COVID-19. 19^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο. Αθήνα, 2-5 Ιουνίου 2021.
10. **Ν. Καρακούσης**, Ε. Πυργιώτη, Δ. Μοσχοτζόπουλος, Ν. Κωστακόπουλος. Από την επισκόπηση στη διάγνωση ψευδομοναδικής λοίμωξης. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης στην Εσωτερική Παθολογία. Αθήνα, 26-28 Φεβρουαρίου 2021.
11. **Ν. Καρακούσης**, Μ. Καπίρη, Κ. Στριγκλή, Μ. Κοντογιάννη, Ν. Καράμπελα, Ε. Δημητριάδου, Ε. Παπαρηγοράκη, Μ. Δημητρίου, Α. Βασιλειάδης, Π. Γεωργακόπουλος. Αξιολόγηση κυστίτιδας με coagulase-negative staphylococcus στην Π.Φ.Υ. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης στην Εσωτερική Παθολογία. Αθήνα, 26-28 Φεβρουαρίου 2021.
12. **Ν. Καρακούσης**, Μ. Καπίρη, Κ. Στριγκλή, Μ. Κοντογιάννη, Π. Γεωργακόπουλος, Ν. Καράμπελα, Ε. Παπαρηγοράκη, Μ. Δημητρίου, Α. Βασιλειάδης, Η. Αλιμήσης, Χ. Τσάκωνας, Ε. Δημητριάδου. Φλεβοκομβική βραδυκαρδία σε ασθενή με

- μετατραυματικό γλαύκωμα. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης στην Εσωτερική Παθολογία. Αθήνα, 26-28 Φεβρουαρίου 2021.
13. Κ. Μουσουράκης, **Ν. Δ. Καρακούσης**, Η. Παπακωνσταντίνου, Ε. Δημητρέλλος. Εξωηπατικές εκδηλώσεις χρόνιας ηπατίτιδας C σε άνδρα μέσης ηλικίας. 18^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο. Αθήνα, 11-13 Σεπτεμβρίου 2020.
14. Ν.-Μ. Τάγκου, Γ. Κονδύλης, Η. Γιαννακοδήμος, Α. Ορφανίδου, Δ. Παραστατίδου, **Ν. Καρακούσης**, Ζ. Βλακού, Ε. Αποστολοπούλου, Γ. Παπαθεοδωρίδης, Ε. Χολόγκιτας. Επιπολασμός ηπατοπνευμονικού συνδρόμου και οστεοπόρωσης σε ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση. 22^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας «Συνεχιζόμενη εκπαίδευση στην Παθολογία: Τι νεότερο στη διάγνωση και στη θεραπεία των νοσημάτων που αντιμετωπίζει ο Παθολόγος». Αθήνα, 30 Οκτωβρίου-2 Νοεμβρίου 2019.
15. Ε. Χολόγκιτας, Α. Ορφανίδου, Ε. Πετρουλάκη, Ι. Δέτση, Ξ. Κουφομιχάλη, Ε. Λαούδη, Δ. Παραστατίδου, **Ν. Καρακούσης**, Γ. Παπαθεοδωρίδης. Εμπειρία ηπατολογικού ιατρείου στην αντιμετώπιση ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C με τη χρήση των άμεσα δρώντων αντικών φαρμάκων. 7^η Πανελλήνια Συνάντηση AIDS & Ηπατίτιδες πρόληψη, διάγνωση, θεραπεία. Αθήνα, 19-21 Σεπτεμβρίου 2019.
16. Κ. Ίσκος, **Ν. Καρακούσης**, Π.-Ι. Κρητικός, Ι. Μπάντερ, Α.-Ν. Οικονόμου, Π. Κουρουπάκης, Γ. Καπέλλος, Κ. Μουσουράκης, Ε. Γεωργίου, Μ. Κοκολάκη, Κ. Μποκή, Ε. Δημητρέλλος. Καυσαλγία και οίδημα άκρων σε νεαρή γυναίκα. Πανελλήνιο Συνέδριο, 28^ο έτος Ημέρες Παθολογίας 2019 «Διλήμματα στην Κλινική Παθολογία». Αθήνα, 11-14 Απριλίου 2019.
17. **Ν. Δ. Καρακούσης**, Κ. Ίσκος, Π.-Ι. Κρητικός, Χ. Κανακάς, Α.-Ν. Οικονόμου, Γ. Καπέλλος, Φ. Κολιοφώτης, Μ. Σαραντινού, Χ. Βαλσαμίδου, Γ. Τσιόγκα, Ε. Δημητρέλλος. Σύνδρομο Fahr σε ασθενή με νόσο του Πάρκινσον. 21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας «Προάγοντας τη γνώση στην Παθολογία επί 31 χρόνια». Αθήνα, 31 Οκτωβρίου-3 Νοεμβρίου 2018.
18. **Ν. Δ. Καρακούσης**, Π.-Ι. Κρητικός, Κ. Ίσκος, Α.-Ν. Οικονόμου, Γ. Καπέλλος, Φ. Κολιοφώτης, Μ. Σαραντινού, Χ. Βαλσαμίδου, Χ. Κουφόπουλος, Μ. Μαρτσούκου, Ε. Δημητρέλλος. Αναιμία σε νεαρό ασθενή με Hookworm εντερική λοίμωξη. 21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας «Προάγοντας τη γνώση στην Παθολογία επί 31 χρόνια». Αθήνα, 31 Οκτωβρίου-3 Νοεμβρίου 2018.

19. **N. Δ. Καρακούσης**, Γ. Καπέλλος, Ε. Αρμένη, Π. Κρητικός, Κ. Ίσκος, Π. Κουρουπάκης, Β. Κολώνια, Ε. Δημητρέλλος, Κ. Καλίγερος. Ασκιακή συλλογή και αναιμία σε γυναίκα μέσης ηλικίας. 15^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο. Λάρισα, 25-27 Μαΐου 2018.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

1. **Karakousis ND**, Papatheodoridi A, Chatzigeorgiou A, Papatheodoridis G. Cellular senescence and hepatitis b related hepatocellular carcinoma: an intriguing link. *Liver International*. 2020 Dec; 40(12):2917-2927. doi: 10.1111/liv.14659.
2. **Karakousis ND**, Chrysavgis L, Papatheodoridi A, Legaki A-I, Lembessis P, Cholongitas E, Chatzigeorgiou A, Papatheodoridis G. Significance of Circulating Cell-Free DNA Biomarkers in HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Virus Infection and Their Changes after Treatment Initiation. *Pathogens*. 2023 Mar 1;12(3):394. doi: 10.3390/pathogens12030394.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΣΕ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

1. **N. Δ. Καρακούσης**, Α. Χρυσανγής, Α. Παπαθεοδωρίδη, Α-Ι. Λεγάκη, Π. Λεμπέσσης, Ε. Χολόγκιτας, Α. Χατζηγεωργίου, Γ. Παπαθεοδωρίδης. Αξιολόγηση επιπέδων του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA και της ολικής μεθυλίωσης του DNA ορού σε ασθενείς με HBeAg- αρνητική χρόνια λοίμωξη με ιό ηπατίτιδας Β (HBV). 42^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Αθήνα, 10-13 Νοεμβρίου 2022. (Βράβευση της εργασίας ως αναρτημένη ανακοίνωση στο 42^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας)

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2017 έως και 2018: Παρουσίαση μαθημάτων στους ειδικευόμενους ιατρούς της Β' Παθολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο (στο πλαίσιο εκπαιδευτικού προγράμματος της κλινικής) με τα εξής θέματα : Δευτεροπαθής Οστεοπόρωση/ Ασκιτική Συλλογή σε Κιρρωτικό Ασθενή/ Βρουκέλλωση. (διδασκτικές ώρες:3)

2015 έως και 2018: Εκπαιδευτής μαθημάτων παθολογικής ειδικότητας νοσηλευτικού προσωπικού (Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο) στα θέματα: Ασκήτης/ Κίρρωση/ Παγκρεατίτιδα/ Ca Παγκρέατος/ Κλινική εξέταση όλων των συστημάτων του ανθρώπινου σώματος και Διάγνωση/ Διαφοροδιάγνωση / Οστεοπόρωση και Κάταγμα/ Ηπατίτιδες/ Ηπατική Ανεπάρκεια/ Επείγουσα Υπέρταση. (διδασκτικές ώρες: 33)

III. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β

1. Εισαγωγή

Η λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) αποτελεί σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε πολλές χώρες του κόσμου (1). Υπολογίζεται, ότι περίπου 240 εκατομμύρια άνθρωποι είναι χρόνιοι φορείς του αντιγόνου επιφανείας (HBsAg) του ιού της ηπατίτιδας Β, με μεγάλη διαφορά στην ενδημικότητα από περιοχή σε περιοχή παγκοσμίως (2). Η χρόνια HBV λοίμωξη είναι ένα από τα συχνότερα αίτια χρόνιας ηπατικής νόσου και συνοδεύεται από υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα (3). Εκτός από την επιδείνωση της ηπατικής νόσου, όλοι οι ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη έχουν αυξημένο κίνδυνο για κίρρωση και ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου (ΗΚΚ) (4). Στην εποχή μας, η αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη χρήση αντικών φαρμάκων, τα οποία επιτυγχάνουν αναστολή του HBV πολλαπλασιασμού σχεδόν σε όλους τους ασθενείς υπό αγωγή, με συνέπεια την περαιτέρω αναστολή της εξέλιξης προς κίρρωση, τη βελτίωση των ιστολογικών αλλοιώσεων του ήπατος και τη βελτίωση της συνολικής έκβασης των ασθενών. Ωστόσο, η υπάρχουσα αγωγή, δεν επιτυγχάνει εκρίζωση του ιού και δεν εξαφανίζει τον κίνδυνο ΗΚΚ (5). Οπότε, παραμένει πραγματική πρόκληση η εκρίζωση του ιού της ηπατίτιδας Β από τον οργανισμό, κάτι που θα ήταν δυνατόν να επιτευχθεί με νέες θεραπευτικές στρατηγικές, οι οποίες θα μπορούσαν να βασιστούν σε βαθύτερη μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών δράσης και πολλαπλασιασμού του ιού.

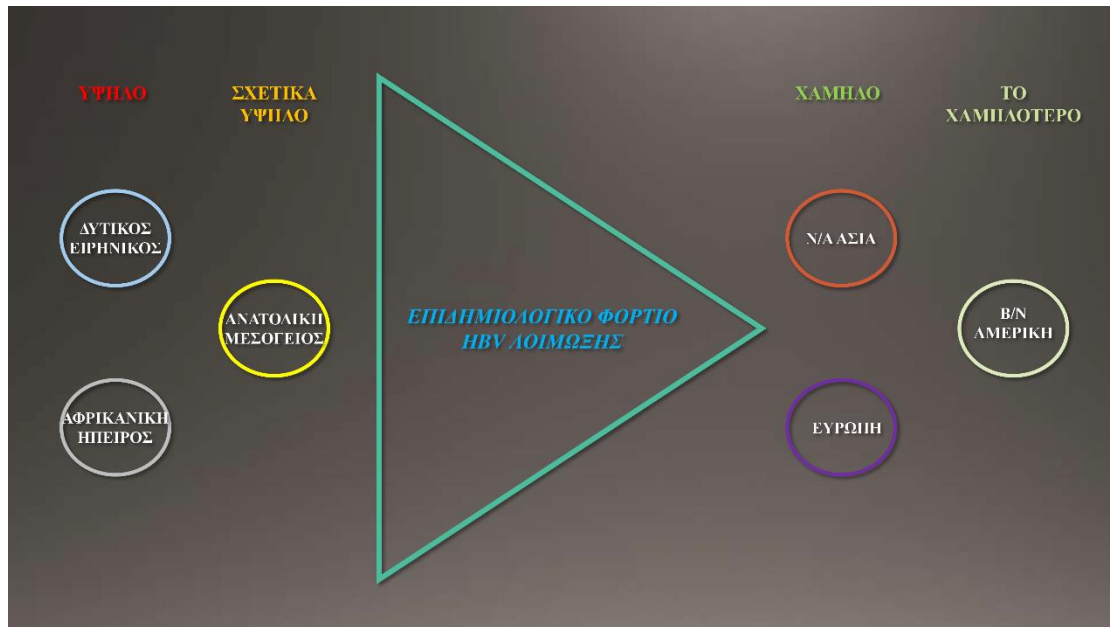
2. Επιδημιολογικό φορτίο της λοίμωξης HBV

Ο επιπολασμός της χρόνιας HBV λοίμωξης παγκοσμίως ποικίλλει. Τα μέρη, όπου ενδημεί περισσότερο η χρόνια HBV λοίμωξη, είναι οι περιοχές του δυτικού Ειρηνικού σε ποσοστό 6.2% ή 115 εκατομμύρια προσβληθέντες και οι περιοχές της Αφρικανικής ηπείρου σε ποσοστό 6.1% ή 60 εκατομμύρια προσβληθέντες από τον ιό της ηπατίτιδας Β (6). Γεωγραφικές περιοχές, επίσης, με σχετικά υψηλό επιδημιολογικό φορτίο αποτελούν αυτές της ανατολικής Μεσογείου σε ποσοστό 3.3% ή 21 εκατομμύρια προσβληθέντες. Από την άλλη πλευρά, το ικό φορτίο είναι χαμηλότερο στη Νοτιοανατολική Ασία (σε ποσοστό 2.0% ή 39 εκατομμύρια προσβληθέντες από τον ιό) και σε περιοχές της Ευρώπης (σε ποσοστό 1.6% ή 15 εκατομμύρια προσβληθέντες). Σημαντικό είναι επίσης να αναφέρουμε, ότι το χαμηλότερο επιδημιολογικό φορτίο καταγράφεται στη Βόρεια και Νότια Αμερική (ποσοστό 0.7% ή 7 εκατομμύρια προσβληθέντες από τον ιό της ηπατίτιδας Β) (6) (Εικόνα 1).

Όσον αφορά τον ελλαδικό χώρο, σε μελέτη του καθηγητή κ. Παπαθεοδωρίδη και των συνεργατών του, η οποία πραγματοποιήθηκε δια τηλεφώνου, ο επιπολασμός της χρόνιας λοίμωξης με ιό της ηπατίτιδας Β εκτιμάται να είναι της τάξης του 2,11%. Ωστόσο, στην ίδια μελέτη, παρουσιάζεται ένας περιορισμός σχετικός με το ότι μόνο το 53%, όπως αναφέρεται, είχε πραγματοποιήσει έλεγχο για τον ιό της ηπατίτιδας Β (7).

Εξαιτίας της αύξησης των μεταναστευτικών ροών τα τελευταία έτη παγκοσμίως, αλλά και ιδιαίτερα στην Ελλάδα προερχόμενων από περιοχές της υφελίου με υψηλή ενδημικότητα, ενδέχεται να επηρεαστεί ο επιπολασμός της νόσου και το επιδημιολογικό φορτίο στο μέλλον. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η συστηματική και στενή επιδημιολογική επιτήρηση του γενικού πληθυσμού.

Εικόνα 1. Επιδημιολογικό φορτίο της HBV λοίμωξης ανά τον κόσμο.



3. Δομικά στοιχεία του ιού ηπατίτιδας B

Ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV) αποτελεί έναν DNA ιό, ο οποίος αποτελεί μέλος της οικογένειας των ηπατοτρόπων ιών *hepadnavirus*. Αυτή η οικογένεια ιών μπορεί να προσβάλλει πέρα από τον άνθρωπο, πτηνά (πάπιες, χήνες), αλλά και θηλαστικά (σκίουρους, νυχτερίδες, τρωκτικά) (8). Το ιικό γονιδίωμα είναι ένα κυκλικό σχήματος μερικώς δίκλωνο DNA μεγέθους περίπου 3.2 kb (8, 9).

Στον αίμα των χρόνιων φορέων της ηπατίτιδας B, μπορούν να διακριθούν, με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, τα «σωματίδια του Dane». Τα σωματίδια αυτά έχουν διάμετρο 40-42 nm, ενώ το εξωτερικό τους περίβλημα, που είναι λιποπρωτεϊνικό περιέχει τρεις γλυκοπρωτεΐνες (ή αντιγόνα επιφανείας). Εντός αυτού του περιβλήματος, συναντάται το εσωτερικό πυρηνοκαψίδιο, το οποίο περιέχει το γονιδίωμα του ιού και μία πολυμεράση υπεύθυνη για τη σύνθεση του DNA του ιού στα μολυσμένα κύτταρα. Επιπλέον, τα προσβεβλημένα με HBV ηπατοκύτταρα παράγουν δύο ξεχωριστά λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, τα οποία είναι σφαιρικά σωματίδια με διάμετρο περίπου 20 nm και νηματοειδείς μορφές με παρόμοια διάμετρο (10).

Το γονιδίωμα του HBV αποτελείται από δύο κυκλικές αλυσίδες DNA, εκ των οποίων η θετική αλυσίδα είναι εσωτερική και όχι πλήρως κυκλική και η αρνητική αλυσίδα είναι εξωτερική και πλήρως κυκλική, ενώ επιπλέον το γονιδίωμα του ιού παρουσιάζει τέσσερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) (6)(Εικόνα 2).

Η περιοχή ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης preS-S (preS1/preS2/preS) του γονιδιώματος κωδικοποιεί τρεις πρωτεΐνες επιφανείας και συγκεκριμένα την 24-kD S πρωτεΐνη ή HBsAg, η οποία είναι και η πιο άφθονη πρωτεΐνη του ελύτρου, την M ή preS2 και την L ή preS1 πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη L ή preS1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του ιού στους υποδοχείς των κυττάρων του ξενιστή και στην απελευθέρωση του, στη συνέχεια από το μολυσμένο ηπατοκύτταρο, με στόχο την περαιτέρω μόλυνση (10).

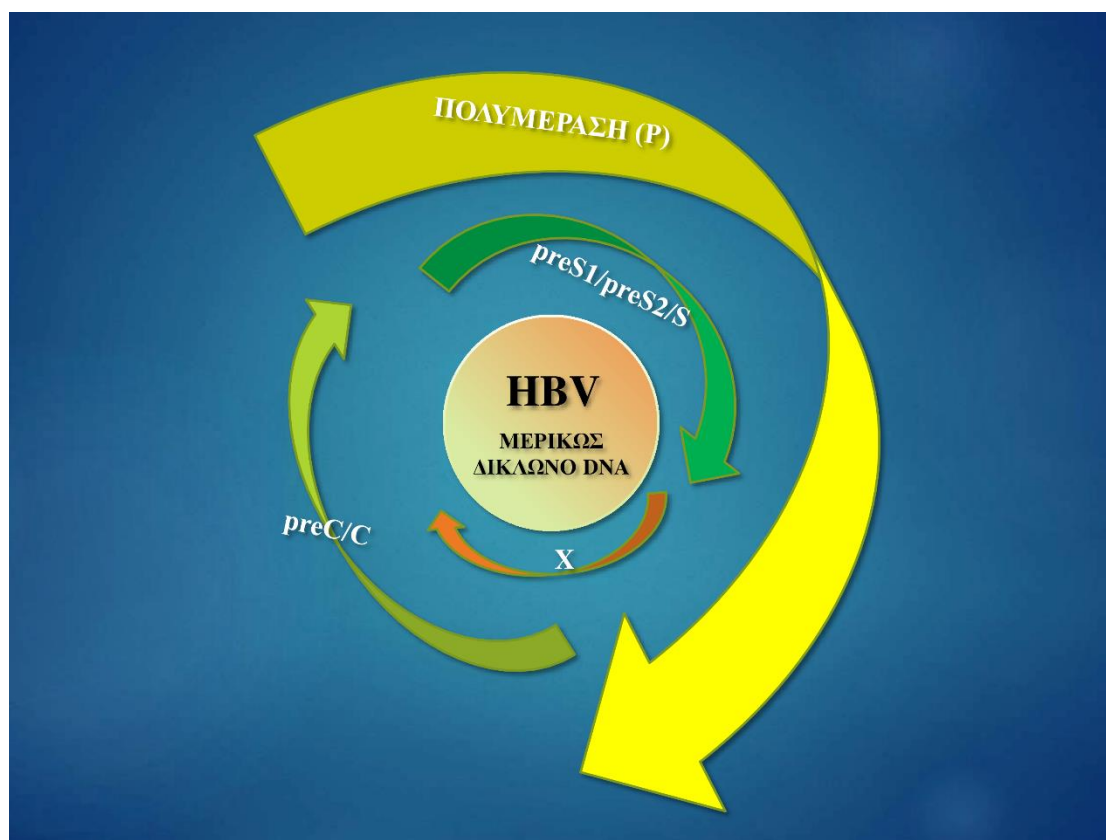
Η περιοχή preC-C κωδικοποιεί το HBcAg (πυρηνικό αντιγόνο) και το HBeAg (αντιγόνο e). Το πυρηνικό αντιγόνο (HBcAg) συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού του ιού και επιδρά στο ομοιοπολικό κλειστό κυκλικό DNA (cccDNA), το οποίο λειτουργεί ως εκμαγείο για την μεταγραφή του mRNA του ιού, ενώ μπορεί να επιφέρει και επιγενετικές διαφοροποιήσεις (10, 11). Η συγκεκριμένη

περιοχή (preC–C) δύναται επίσης να κωδικοποιήσει ένα σήμα, το οποίο δίνει τη δυνατότητα μέσω του συμπλέγματος του Golgi, να εκκριθεί στο αίμα των ασθενών, το αντιγόνο e (HBeAg), του οποίου ο βιολογικός ρόλος δεν είναι σαφής, ωστόσο στη κλινική πράξη αποτελεί δείκτη πολλαπλασιασμού του ιού (10, 12).

Η περιοχή ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης P είναι ειδική για την πολυμεράση του ιού. Η πολυμεράση αποτελεί ένα ένζυμο στο οποίο αποδίδονται πολλές λειτουργίες, οι οποίες σχετίζονται με τη σύνθεση του DNA και την ενθυλάκωση του RNA (10).

Η περιοχή ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης X κωδικοποιεί την πρωτεΐνη X (HBx). Η πρωτεΐνη X ρυθμίζει μεταδοτικά σήματα του άξονα κυττάρου-ξενιστή, ενώ η δράση της απαιτείται για τον πολλαπλασιασμό και τη διασπορά του ιού, με δυσμενείς συνέπειες για τον ασθενή (10).

Εικόνα 2. Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) του HBV.



4. Γενετική ετερογένεια του ιού ηπατίτιδας Β

Ο HBV, και συγκεκριμένα το γονιδίωμα του, διαθέτει την ικανότητα να παρουσιάζει μεταλλάξεις, οι οποίες σχετίζονται με την εμφάνιση γονοτύπων, υποτύπων, διαφόρων μεταλλαγμένων στελεχών (mutants) και παραλλαγών/ποικιλιών (variants). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην απουσία ελέγχου της δραστηριότητας της ανάστροφης μεταγραφάσης του και στην πίεση που ασκούν διάφοροι εξωτερικοί παράγοντες στον ιό (13).

Σύμφωνα, με τη γενετική απόκλιση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Β, έχουν απομονωθεί τουλάχιστον 10 γονότυποι (Α-Ι) και αρκετοί υπότυποι, οι οποίοι διαφέρουν ανάλογα με τη γεωγραφική κατανομή, ενώ διαφαίνεται να σχετίζονται με διαφορετική κλινική έκβαση, ως προς την εξέλιξη της ηπατικής βλάβης και το θεραπευτικό αποτέλεσμα (13). Συγκεκριμένα, ο γονότυπος Α είναι ο επικρατούν γονότυπος στην Αφρική, Ευρώπη, Ινδία και Αμερική. Οι γονότυποι Β και C συναντώνται πιο συχνά στην περιοχή της Ασίας και του Ειρηνικού Ωκεανού. Ο γονότυπος D επικρατεί σε περιοχές, όπως η περιοχή της Μεσογείου, ενώ είναι συχνή η παρουσία του σε Αφρική, Ευρώπη και Ινδία. Ο γονότυπος Ε περιορίζεται σε περιοχές, όπως η Δυτική και Κεντρική Αφρική και η Σαουδική Αραβία, ενώ ο γονότυπος F επικρατεί στη Κεντρική και Νότια Αμερική. Ο γονότυπος G αποτελεί επικρατούντα γονότυπο σε Γαλλία, Γερμανία και Αμερική, ενώ ο γονότυπος Η εντοπίζεται σε Κεντρική Αμερική και Μεξικό. Τέλος, οι γονότυποι Ι και Ι εντοπίζονται ο πρώτος στην περιοχή του Βιετνάμ και του Λάος και ο δεύτερος στην Ιαπωνία (13, 14)(Πίνακας 1).

Οι γονότυποι Α και Β φαίνεται να σχετίζονται με μικρότερο κίνδυνο εξέλιξης σε κίρρωση και ΗΚΚ κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου με ηπατίτιδα Β, σε σχέση με τους C, D και F γονότυπους (13, 14). Στους γονότυπους C και D παρουσιάζονται με μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεις στις περιοχές του pre-S και του βασικού πυρηνικού εκκινητή (basal core promoter, BCP), όπως η παρουσία των BCP A1762T/G1764A μεταλλαγών/ποικιλιών (variants), οι οποίες σχετίζονται με αυξημένη εμφάνιση ΗΚΚ. Επίσης, μεταλλάξεις που αφορούν το γονίδιο X, μπορεί να έχουν δυσμενή πρόγνωση και εξέλιξη σε ΗΚΚ (13-15).

Πίνακας 1. Γεωγραφική κατανομή των γονοτύπων του ιού ηπατίτιδας Β.

ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ HBV	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ
A	Αφρική, Ευρώπη, Ινδία, Αμερική
B	Ασία, Ειρηνικός Ωκεανός
C	Ασία, Ειρηνικός Ωκεανός
D	Μεσόγειος, Αφρική, Ευρώπη, Ινδία
E	Δυτική - Κεντρική Αφρική, Σαουδική Αραβία
F	Κεντρική - Νότια Αμερική
G	Γαλλία, Γερμανία, Αμερική
H	Κεντρική Αμερική, Μεξικό
I	Βιετνάμ, Λάος
J	Ιαπωνία

5. Κύκλος αναπαραγωγής του HBV

Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού της ηπατίτιδας Β, κατά την προσβολή των ανθρώπινων ηπατοκυττάρων από τον ιό, περιλαμβάνει μια σειρά από στάδια. Αυτά τα στάδια είναι τα ακόλουθα: 1) Προσκόλληση στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, 2) Διείσδυση και απελευθέρωση ιικού πυρηνοκαψιδίου, 3) Μεταγραφή/ Μετάφραση, 4) Ενθυλάκωση, 5) Ωρίμανση, 6) Έξοδος νέων ιικών σωματιδίων (16)(Εικόνα 3).

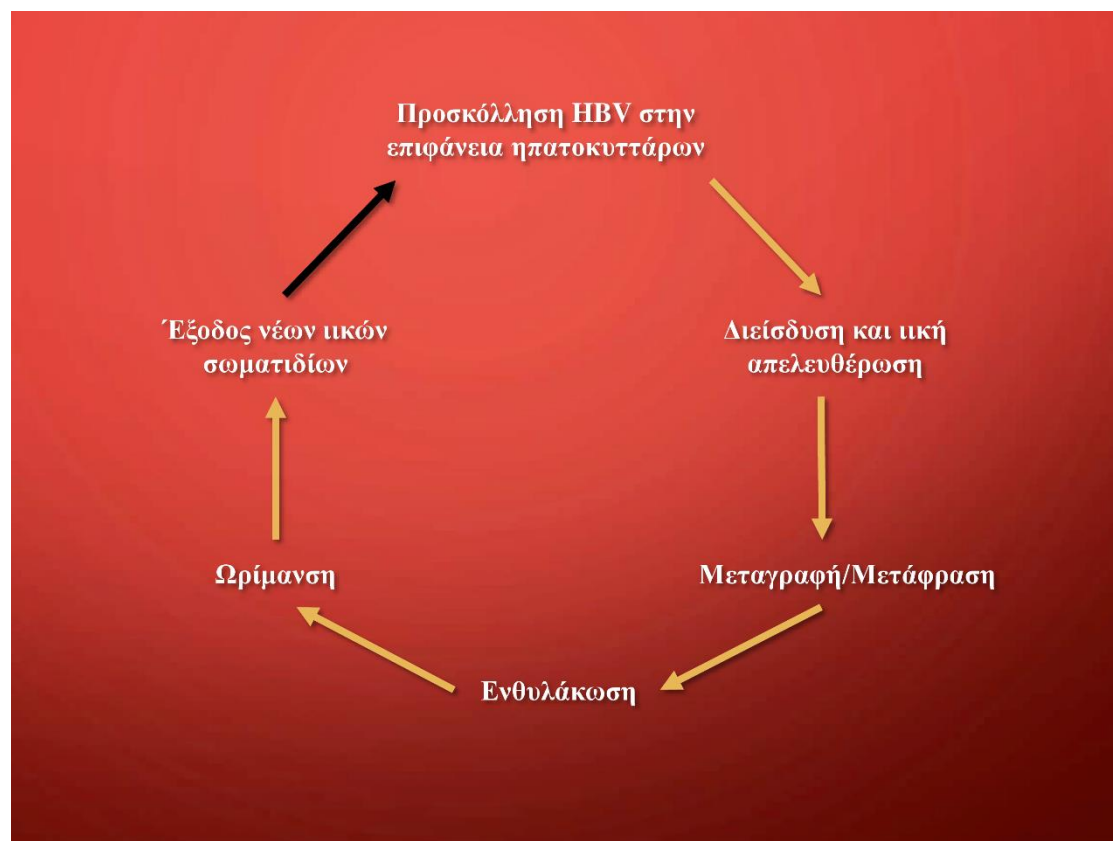
Η προσκόλληση των ιικών σωματιδίων της ηπατίτιδας Β στα ηπατοκύτταρα γίνεται με τη βοήθεια ενός ειδικού υποδοχέα και συγκεκριμένα του πολυπεπτιδίου συμμεταφοράς νατρίου - ταυροχολικού οξέως (sodium taurocholate cotransporting polypeptide - NTCP) και εν συνεχεία ο ιός διεισδύει στο ηπατοκύτταρο (16, 17).

Μετά την διείσδυση του ιού στο ηπατοκύτταρο, το ιικό πυρηνοκαψίδιο, το οποίο περιέχει το μερικώς δίκλωνο χαλαρό κυκλικό DNA (relaxed circular DNA - rcDNA), απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί, με τη χρήση από τον ίδιο τον ιό της ηπατίτιδας Β, πρωτεϊνών επιδιόρθωσης DNA του ξενιστή (DNA repair proteins), μετατρέπεται σε ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (covalently closed circular DNA - cccDNA), το οποίο και αποτελεί το σταθερό μεταγραφικό εκμαγείο για τα HBV mRNAs (17).

Το ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (cccDNA), οργανώνεται σε ένα μινι-χρωμόσωμα, το οποίο αποτελείται από ιστονικές και μη ιστονικές πρωτεΐνες και μεταγράφεται μέσω της κυτταρικής πολυμεράσης II για να παραχθούν τα ιικά RNAs (18). Τα μεταγραφικά προϊόντα του HBV περιλαμβάνουν ιικά RNAs, τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές μορφές πρωτεϊνών του αντιγόνου επιφανείας (HBsAg) και κωδικοποιούν την HBx πρωτεΐνη, ενώ επίσης περιλαμβάνουν και δύο RNAs, γνωστά ως προπυρηνικό RNA (precore RNA – pcRNA) και προγονιδιωματικό RNA (pregenomic RNA – pgRNA) (17, 18). Το pcRNA αποτελεί μήνυμα για τη μετάφραση του e αντιγόνου (HBeAg), ενώ το pgRNA κωδικοποιεί πρωτεΐνες του πυρήνα (HBc) και την πολυμεράση του ιού (reverse transcriptase). Ένα μικρό τμήμα του pgRNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την αντίστροφη μεταγραφή (18). Αυτό το μικρό τμήμα pgRNA στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου ηπατοκυττάρου, ενθυλακώνεται με την πολυμεράση του ιού σε ανώριμα πυρηνοκαψίδια και ξεκινά η αντίστροφη

μεταγραφή, για να παραχθεί το μερικώς δίκλωνο χαλαρό κυκλικό DNA (rcDNA) και εν τέλει το ώριμα πυρηνοκαψίδια (18). Τα ώριμα πυρηνοκαψίδια, είτε επανεισάγονται στον πυρήνα του κυττάρου και ανεφοδιάζουν τη δεξαμενή του ομοιοπολικά κλειστού κυκλικού DNA (cccDNA), είτε εκκρίνονται ως λοιμώδη ιικά σωματίδια στην κυκλοφορία, με στόχο την περαιτέρω εξάπλωση της ιογενούς αυτής λοίμωξης (17, 18).

Εικόνα 3. Ο κύκλος αναπαραγωγής του HBV μετά τη μόλυνση.

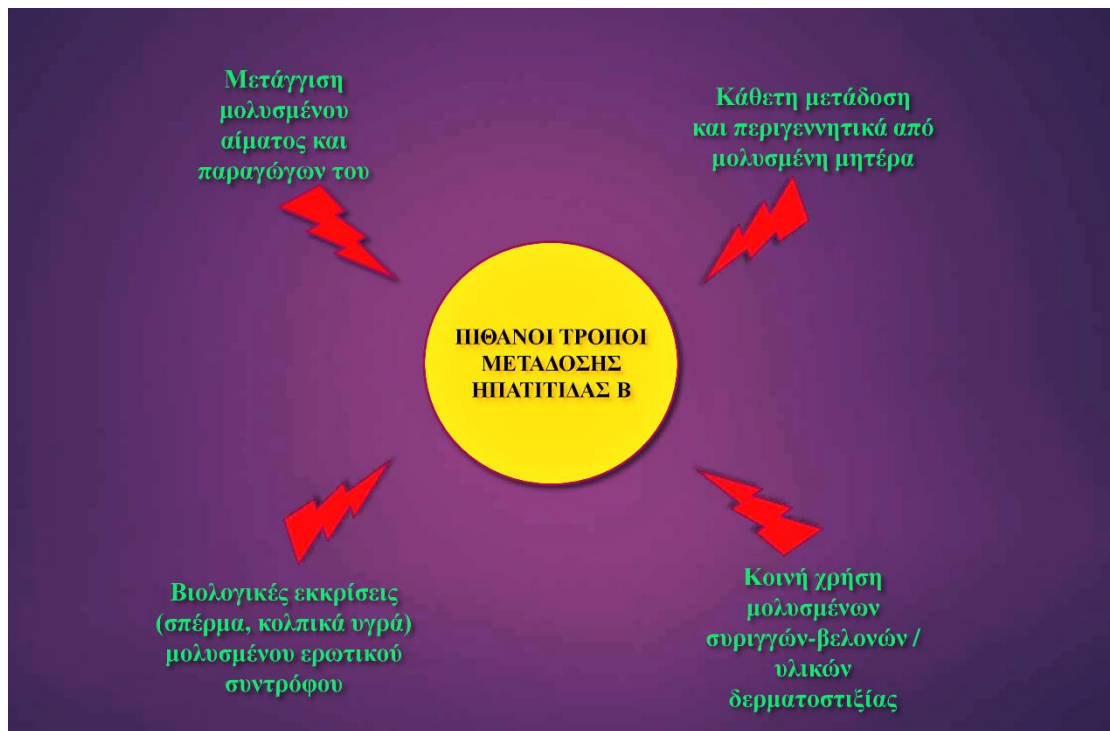


6. Φυσική εξέλιξη και μετάδοση της HBV λοίμωξης

Η φυσική εξέλιξη και η πορεία της λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας B δύναται να ποικίλλει. Έτσι, η λοίμωξη από το συγκεκριμένο ιό μπορεί να κυμαίνεται από ασυμπτωματική μέχρι κεραυνοβόλο ηπατίτιδα κατά τη φάση της οξείας λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας B και από τη χρόνια ανενεργό λοίμωξη (φορείς) μέχρι τη χρόνια ηπατίτιδα με πιθανή εξέλιξη σε κίρρωση και ΗΚΚ (13, 19, 20). Το υψηλότερο ποσοστό μετάπτωσης σε χρόνια λοίμωξη με τον ιό της B φαίνεται να καταγράφεται σε άτομα, τα οποία έχουν μολυνθεί σε ηλικία μικρότερη των 6 ετών, με τη χρονιότητα να αναπτύσσεται σε ποσοστό 80-90% σε παιδιά με μόλυνση τον πρώτο χρόνο της ζωής τους και 30-50% με ηλικία μόλυνσης μέχρι πριν τα πρώτα 6 έτη της ζωής τους. Εν αντιθέσει, στους υγιείς ενήλικες, οι οποίοι μολύνθηκαν, μόνο σε ένα ποσοστό 5% μεταπίπτουν σε χρονιότητα (21).

Η μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας B επίσης ποικίλλει. Πραγματοποιείται με έκθεση ενός υγιούς ατόμου σε μολυσματικά βιολογικά υγρά, τα οποία συνήθως είναι το αίμα και τα παράγωγά του, καθώς και βιολογικές εκκρίσεις, όπως το σπέρμα κατά τη σεξουαλική επαφή. Κύρια οδός μετάδοσης παραμένει η κάθετη μετάδοση (vertical transmission) από τη μητέρα στο νεογνό, κατά την περιγεννητική περίοδο (22). Σε φτωχότερες χώρες, η πιθανότητα ανεπαρκούς αποστείρωσης υγειονομικών υλικών ή η μετάγγιση παραγώγων αίματος, τα οποία ενδέχεται να είναι μολυσμένα με τον ιό της ηπατίτιδας B, αποτελούν ένα εξίσου σοβαρό μονοπάτι μετάδοσης. Επιπλέον, η ευρεία χρήση ενδοφλεβίων ουσιών ανά τον κόσμο, φαίνεται πως αποτελεί ένα συχνό τρόπο διάδοσης του ιού της B μέσω μολυσμένης σύριγγας/βελόνας, ενώ και η δερματοστιξία με χρήση μολυσμένων υλικών με τον ιό φαίνεται να φέρει μερίδιο ευθύνης στη διασπορά του ιού (22-24) (Εικόνα 4).

Εικόνα 4. Πιθανοί τρόποι μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας Β.



7. Δείκτες του ιού της ηπατίτιδας Β

Ο έλεγχος για την ανίχνευση της παρουσίας και της δραστηριότητας του ιού της ηπατίτιδας Β αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο, τόσο για τη διάγνωση, όσο και για τη θεραπευτική διαχείριση της συγκεκριμένης λοίμωξης. Υπάρχουν ορολογικοί και μοριακοί δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην καθημερινή κλινική πρακτική, αλλά και νεότεροι δείκτες με ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον (25, 26). Τέτοιοι δείκτες αποτελούν οι εξής:

- *HBsAg (Αυστραλιανό αντιγόνο)*: Δείκτης οξείας, αλλά και χρόνιας λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας Β.
- *Ποσοτική μέτρηση του HBsAg*: Δείκτης που μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε τη φάση της λοίμωξης, να εντοπίσουμε ασθενείς που είναι πιθανόν να ανταποκριθούν σε χορήγηση συγκεκριμένης θεραπείας (ιντερφερόνη) και να εκτιμήσουμε τη πιθανότητα επανενεργοποίησης του ιού.
- *Anti-HBs*: Δείκτης ανοσίας, είτε φυσικής, είτε παθητικής μέσω εμβολιασμού.
- *Anti-HBc*: Δείκτης έκθεσης στο ιό της ηπατίτιδας Β. Διακρίνεται σε IgM και IgG.
- *HBeAg*: Δείκτης μολυσματικότητας, συσχετιζόμενος με υψηλά επίπεδα DNA του ιού στον ορό των ασθενών.
- *Anti-HBe*: Δείκτης συσχετιζόμενος είτε με χαμηλά είτε με υψηλά επίπεδα DNA του ιού, στον ορό των ασθενών.
- *HBV DNA*: Δείκτης που εντοπίζει την ενεργό λοίμωξη και χρησιμοποιείται για προσδιορισμό της φάσης της λοίμωξης και της ανάγκης για θεραπευτική παρέμβαση με τη χρήση αντικών σκευασμάτων.
- *HBV γονότυποι*: Μέσα από τον προσδιορισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών, χαρακτηρίζεται ο γονότυπος του ιού.

Στους νεότερους δείκτες συμπεριλαμβάνονται η μέτρηση του ιικού cccDNA, των επιπέδων του κυκλοφορούντος HBV RNA και του HBcrAg (Hepatitis B core-related antigen) και μπορεί να έχουν εφαρμογή, τόσο σε πειραματικό επίπεδο, όσο και στην αξιολόγηση της θεραπευτικής στρατηγικής έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β στο μέλλον (25, 26).

8. Τα στάδια της λοίμωξης με ιό ηπατίτιδας B

Η χρόνια λοίμωξη με τον HBV αποτελεί μία δυναμική κατάσταση, η οποία αντανακλά την αλληλεπίδραση του ιικού πολλαπλασιασμού με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Αποτελείται από 5 μείζονα στάδια - φάσεις (23, 25) (Πίνακας 2). Κάθε στάδιο - φάση αποτελείται από χαρακτηριστικές εργαστηριακές τιμές δεικτών όπως της ALT, του HBsAg, του HBeAg, του HBV DNA, αλλά και της ιστολογίας του ηπατικού ιστού έναντι του ιού της ηπατίτιδας B. Κανένα από αυτά τα στάδια – φάσεις δεν είναι αυστηρά σταθερό, μόνιμο ή και διαδοχικό, με συνέπεια να δύναται να πραγματοποιηθούν μεταβολές μεταξύ των διαφόρων σταδίων – φάσεων (27-29).

Αυτά τα στάδια – φάσεις είναι τα εξής:

I. Η αρχική φάση αποτελεί μία φάση υψηλού ιικού πολλαπλασιασμού, αλλά με μειωμένη φλεγμονώδη δραστηριότητα και είναι σήμερα γνωστή ως «HBeAg-θετική χρόνια λοίμωξη», ενώ παλιότερα ήταν γνωστή ως «φάση ανοσολογικής ανοχής». Αυτή η αρχική φάση χαρακτηρίζεται από θετικό HBeAg, πολύ υψηλά επίπεδα DNA του ιού στον ορό των ασθενών, σταθερά φυσιολογική τιμή της ALT, ήπια ή ανύπαρκτη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και ίνωση στο ήπαρ και μειωμένη παραγωγή IL-10 και άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-6, IL-8 και ο TNF-α. Το ανοσολογικό σύστημα, σε αυτό το στάδιο, δύναται περαιτέρω να ενεργοποιηθεί από αλλαγές ή ωρίμανση των υποομάδων της ανοσιακής απόκρισης. Αυτή η φάση είναι ιδιαίτερα μολυσματική, εξαιτίας των υψηλών επιπέδων HBV DNA (23, 25).

II. Η φάση της «HBeAg-θετικής χρόνιας ηπατίτιδας B» χαρακτηρίζεται από θετικό HBeAg και περιλαμβάνει υψηλά επίπεδα του HBV DNA και υψηλά επίπεδα των τιμών της ALT. Ως προς τις ιστολογικές βλάβες, υπάρχουν διακυμάνσεις στην εικόνα από μέτρια ως σοβαρή νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και επιταχυνόμενη ίνωση. Το αποτέλεσμα και η συνέχεια αυτής της φάσης ποικίλει και παρουσιάζει διακυμάνσεις. Οι περισσότεροι ασθενείς θα επιτύχουν ορομετατροπή του HBeAg και μείωση των επιπέδων του HBV DNA στον ορό τους, μπαίνοντας στη φάση της «HBeAg-αρνητικής χρόνιας λοίμωξης», ωστόσο κάποιοι δε θα τα καταφέρουν και θα εισέλθουν στη φάση της «HBeAg-αρνητικής χρόνιας ηπατίτιδας B» για πολλά χρόνια (23, 25).

III. Η φάση της «HBeAg-αρνητικής χρόνιας λοίμωξης», παλαιότερα γνωστή με τον χαρακτηρισμό ως φάση «ανενεργού φορέα», χαρακτηρίζεται από την παρουσία του anti-HBe στον ορό των ασθενών και περιλαμβάνει μη ανιχνεύσιμα ή χαμηλά επίπεδα HBV DNA και φυσιολογικά επίπεδα της ALT. Μερικοί ασθενείς, ωστόσο, σε αυτήν τη φάση μπορεί να έχουν στον ορό τους επίπεδα HBV DNA > 2.000 IU/ml, συνήθως όμως λιγότερα από 20.000 IU/ml, συνοδευόμενα από φυσιολογικές τιμές της ALT, χαμηλή νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα του ηπατικού ιστού και ήπια ίνωση. Αυτοί οι ασθενείς έχουν μικρό κίνδυνο εξέλιξης σε κίρρωση ή ΗΚΚ, εάν παραμείνουν σε αυτή τη φάση – στάδιο. Συνήθως, αυτοί οι ασθενείς μπορεί να έχουν στον ορό τους χαμηλά επίπεδα HBsAg (<1.000 IU/ml)(25).

IV. Η φάση της «HBeAg-αρνητικής χρόνιας ηπατίτιδας Β» χαρακτηρίζεται από την απώλεια του HBeAg στον ορό των ασθενών, με ανιχνεύσιμο συνήθως anti-HBe και εμμένοντα ή κυμαινόμενα μέτρια προς υψηλά επίπεδα στον ορό του HBV DNA, καθώς και με διακύμανση ή σταθερά αυξημένα επίπεδα της ALT. Η ηπατική ιστολογία παρουσιάζει νεκροφλεγμονή και ίνωση. Σε αυτές τις περιπτώσεις ασθενών παρουσιάζονται μεταλλάξεις στις «precore» ή στις «basic core promoter» περιοχές(25).

V. Η «HBsAg-αρνητική» φάση χαρακτηρίζεται από μη ανιχνεύσιμο στον ορό HBsAg και θετικά anti-HBc, με ή χωρίς ανιχνεύσιμα anti-HBs. Αυτή η φάση είναι γνωστή και ως «κρυπτική λοίμωξη με ιό ηπατίτιδας Β». Ασθενείς σε αυτή τη φάση έχουν φυσιολογικές τιμές της ALT και συνήθως, αλλά όχι πάντα, μη ανιχνεύσιμα επίπεδα HBV DNA στον ορό τους. Σε ασθενείς, όπου η κίρρωση έχει αναπτυχθεί πριν την απώλεια του αντιγόνου HBsAg, ο κίνδυνος για ΗΚΚ εξακολουθεί να ελλοχεύει και είναι απαραίτητη η συνέχιση της παρακολούθησής τους. Η ανοσοκαταστολή μπορεί να οδηγήσει σε επανενεργοποίηση της HBV λοίμωξης (25).

Πίνακας 2. Στάδια - φάσεις της χρόνιας HBV μόλυνσης.

ΗBeAg-θετική χρόνια λοίμωξη Β	ΗBeAg-θετική χρόνια ηπατίτιδα Β	ΗBeAg-αρνητική χρόνια λοίμωξη Β	ΗBeAg-αρνητική χρόνια ηπατίτιδα Β
ΗBeAg : (+)	ΗBeAg: (+)	ΗBeAg : (-)	ΗBeAg : (-)
HBV DNA : ↑↑↑↑	HBV DNA : ↑↑↑	HBV DNA : (-) / ↑	HBV DNA : ↑↑ / ↑↑↑
ALT: Φυσιολογική	ALT: ↑↑↑	ALT: Φυσιολογική	ALT: ↑↑
Νεκροφλεγμονή: (-) / Ήπια	Νεκροφλεγμονή: Μέτρια – Σοβαρή	Νεκροφλεγμονή: Χαμηλή	Νεκροφλεγμονή / Ύψωση:
Ύψωση: (-) / Ήπια	Ύψωση: Επιταχυνόμενη	Ύψωση: Μειωμένη	Μέτρια - Σοβαρή

9. Πρόληψη και θεραπευτικά μέσα έναντι της ηπατίτιδας B

Όπως σε όλες τις παθήσεις η πρόληψη αποτελεί τον κύριο υγειονομικό στόχο, το ίδιο ισχύει και στη λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας B. Η πρόληψη επιτυγχάνεται με τη χρήση εμβολίου. Αποτελεσματικά εμβόλια υπάρχουν από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, όπου τα αποκαλούμενα ως προερχόμενα από το πλάσμα ασθενών (plasma-derived) εμβόλια έκαναν την εμφάνισή τους και στη συνέχεια αντικαταστάθηκαν από τα εμβόλια του ανασυνδυασμένου DNA (DNA-recombinant) περίπου στα μέσα αυτής της ίδιας δεκαετίας (30). Ο εμβολιασμός έχει αποδειχτεί ότι είναι ιδιαίτερα επιτυχής στη μείωση του επιδημιολογικού φορτίου του ιού, του ποσοστού των φορέων του και του ποσοστού ανάπτυξης κίρρωσης, ΗΚΚ και θνητότητας σχετιζόμενης με τον ιό σε όλες τις χώρες που έχει εφαρμοστεί (30, 31). Ο εμβολιασμός παρέχει προστασία έναντι όλων των γονοτύπων του ιού, ενώ έως τώρα διαφαίνεται ότι μεταλλάξεις του ιού δεν διαφεύγουν της ανοσίας που προκαλεί το υπάρχον εμβολιαστικό σχήμα (30). Το σύνθητες εμβολιαστικό σχήμα που προτείνεται σε άτομα που δεν έχουν εμβολιαστεί έναντι του ιού, αφορά μία αλληλουχία τριών δόσεων στους 0, 1 και 6 μήνες (32). Ο προστατευτικός τίτλος αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας B αφορά επίπεδα anti-HBs ≥ 10 mIU/mL, ενώ ο τίτλος αντισωμάτων φαίνεται πως μειώνεται με το πέρασμα του χρόνου από τον αρχικό εμβολιασμό. Η ανάγκη χορήγησης αναμνηστικής δόσης εμβολίου, ωστόσο, μπορεί να αφορά συγκεκριμένους πληθυσμούς (33).

Σε περίπτωση λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας B, θεραπεία εκρίζωσης του ιού στην παρούσα φάση δεν υφίσταται. Ωστόσο, στόχος της υπάρχουσας θεραπευτικής προσέγγισης έναντι του ιού αποτελεί η βελτίωση της επιβίωσης και της ποιότητας ζωής, προλαμβάνοντας την εξέλιξη της νόσου σε κίρρωση και ΗΚΚ. Η πρόκληση μακροχρόνιας καταστολής του πολλαπλασιασμού του ιού της ηπατίτιδας B αποτελεί το κύριο καταληκτικό σημείο της τρέχουσας θεραπευτικής στρατηγικής, ενώ η απώλεια του αντιγόνου επιφανείας (HBsAg) αποτελεί με τη σειρά της επιθυμητό αποτέλεσμα (25, 34).

Η τυπική ένδειξη για θεραπευτική αντιμετώπιση της χρόνιας ηπατίτιδας B περιλαμβάνει επίπεδα HBV DNA > 2.000 IU/ml, αυξημένα επίπεδα ALT και τουλάχιστον μέτριες ηπατικές ιστολογικές αλλοιώσεις, ενώ όλοι οι κίρρωτικοί ασθενείς με ανιχνεύσιμο HBV DNA πρέπει να θεραπεύονται (25). Επιπλέον, ενδείξεις

θεραπευτικής εφαρμογής αποτελούν η πρόληψη της μετάδοσης από τη μητέρα στο παιδί σε έγκυες γυναίκες με υψηλή ιαμμία και η πρόληψη της επανενεργοποίησης του ιού της ηπατίτιδας Β σε ασθενείς που χρήζουν χημειοθεραπείας και ανοσοκατασταλτικής αγωγής (25).

Τα φάρμακα που διαθέτει το υπάρχον θεραπευτικό οπλοστάσιο για την ηπατίτιδα Β είναι η πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-άλφα (peg-IFNa) με υποδόρια χορήγηση και τα νουκλεοσιδικά και νουκλεοτιδικά ανάλογα (NA), τα οποία αποτελούν αντικά φάρμακα χορηγούμενα από το στόμα και τα οποία παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας ως προς την ιική καταστολή και αναστολή της εξέλιξης σε κίρρωση και ΗΚΚ (35-38).

Η peg-IFNa έχει ανοσοτροποποιητική δράση, ενεργοποιώντας ποικίλα γονίδια του ξενιστή, αλλά και μονοπάτια ανοσολογικής απάντησης έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β. Στα πλεονεκτήματά της θεραπευτικής αυτής προσέγγισης συμπεριλαμβάνονται η περιορισμένη διάρκεια θεραπείας (12 μήνες) και η απουσία ανθεκτικών στελεχών του ιού έναντι του φαρμάκου. Στα μειονεκτήματα του θεραπευτικού αυτού σχήματος, ωστόσο, συμπεριλαμβάνονται συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες, ανάμεσα στις οποίες είναι ο πυρετός, η κεφαλαλγία, η κόπωση, η γριπώδης συνδρομή, η ευερεθιστότητα, η κατάθλιψη και η έξαρση διαταραχών αυτοανοσίας, ενώ αντενδείκνυται σε ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση λόγω αυξημένου κινδύνου σοβαρών παρενεργειών (39, 40).

Τα NAs αναπτύχθηκαν για να αναστέλλουν απευθείας τη λειτουργία της HBV πολυμεράσης μέσω της ανταγωνιστικής πρόσδεσής τους στην αλυσίδα του HBV DNA διακόπτοντας πρόωρα την ιική αντιγραφή (39). Στα νουκλεοσιδικά ανάλογα ανήκουν η λαμβουδίνη (LAM), η τελμπιβουδίνη (TBV) και η εντεκαβίρη (ETV), ενώ στα νουκλεοτιδικά ανάλογα ανήκουν η αντεφοβίρη (ADV), η τενοφοβίρη δισοπροξιλική φουμαρική (TDF) και η τενοφοβίρη αλαφεναμίδη (TAF). Τα NAs είναι πιο ισχυρά αντικά από την peg-IFNa, γεγονός που, σε συνδυασμό με τον τρόπο χορήγησής τους και το προφίλ ασφαλείας και ανοχής τους, τα καθιστά ως πρώτη θεραπευτική επιλογή (25, 36, 38, 41). Βέβαια, εφόσον η θεραπεία με NA δεν προσφέρει εκρίζωση του ιού και σπάνια καταλήγει σε απώλεια του HBsAg, η μακροχρόνια χορήγησή τους είναι συνήθης στους περισσότερους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, με στόχο τη σταθερή

ική καταστολή και τη μείωση του κινδύνου για δυσμενή εξέλιξη σε κίρρωση και μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ΗΚΚ (25, 42).

Ένα από τα σοβαρά προβλήματα της μακροχρόνιας χορήγησης ΝΑ, ωστόσο, αποτελεί η εμφάνιση μεταλλάξεων του ιού που οδηγούν σε αντοχή στα συγκεκριμένα φάρμακα. Με γνώμονα τις μεταλλάξεις του ιού, ως ΝΑ πρώτης εκλογής θεωρούνται η ETV, η TDF και TAF, ως τα ισχυρότερα αντικά φάρμακα έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β, τα οποία έχουν υψηλό γενετικό φραγμό για ική αντοχή (high genetic barrier to resistance), σε αντίθεση με τις LAM, ADV και TBV που έχουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής λόγω ανάδυσης μεταλλάξεων του ιού κατά τη μακροχρόνια χορήγησή τους, δηλαδή έχουν χαμηλό γενετικό φραγμό για ική αντοχή (low genetic barrier to resistance) (25) (Πίνακας 3).

Σχετικά με την ασφαλή διακοπή της χορήγησης των ΝΑs, δεν υπάρχει στην παρούσα φάση παγκόσμια ομοφωνία. Ωστόσο, η κάθαρση του HBsAg στον ορό των ασθενών, με ή χωρίς την παρουσία anti-HBs, η σταθερή ορομετατροπή του HBeAg σε μη-κίρρωτικούς ασθενείς με HBeAg-θετική χρόνια ηπατίτιδα Β ταυτόχρονα με μη ανιχνεύσιμο HBV DNA όντας τουλάχιστον ένα χρόνο υπό θεραπεία και η μακροχρόνια ική καταστολή (≥ 3 έτη) σε επιλεγμένους μη-κίρρωτικούς HBeAg-αρνητικούς ασθενείς υπό θεραπεία θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδείξεις για πιθανή διακοπή των ΝΑs, σε συνδυασμό με στενή κλινική και εργαστηριακή (επίπεδα ALT, HBV DNA) παρακολούθηση αυτών των ασθενών μετά τη διακοπή των ΝΑ (25).

Τελευταία, πραγματοποιείται επιστημονική έρευνα για την ανεύρεση νέων θεραπευτικών μονοπατιών, μέσω διαφόρων παραγόντων με στόχο μία πιθανή πλήρη εκρίζωση του ιού από άτομα που έχουν μολυνθεί (34).

Πίνακας 3. Διαχωρισμός νουκλεοσ(τ)ιδικών αναλόγων (NA) με βάση το γενετικό τους φραγμό για ιική αντοχή σε μακροχρόνια χορήγηση τους.

Υψηλός γενετικός φραγμός για ιική αντοχή	Χαμηλός γενετικός φραγμός για ιική αντοχή
ETV	LAM
TDF	ADV
TAF	TBV

10. Ηπατίτιδα Β και Ηπατοκυτταρικός Καρκίνος (ΗΚΚ)

Υπολογίζεται ότι ένα ποσοστό από το σύνολο των φορέων του ιού της ηπατίτιδας Β παγκοσμίως θα αναπτύξει ΗΚΚ. Στις ενδημικές περιοχές για ηπατίτιδα Β, η χρόνια ηπατίτιδα Β αποτελεί τον πρωταρχικό κίνδυνο για ανάπτυξη ΗΚΚ (43).

Η οφειλόμενη στον ιό της ηπατίτιδας Β ογκογένεση σχετίζεται με τη φλεγμονή και την ηπατική αναγέννηση, τις γονιδιακές μεταλλάξεις του ιού και τις ιολογικές μεταλλαγμένες ογκοπρωτεΐνες (43). Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τον ΗΚΚ περιλαμβάνουν τη Wnt/b-catenin σηματοδότηση, το p14ARF/p53 μονοπάτι, τη TGF- α (transforming growth factor alpha) σηματοδότηση, τη MAPK (Ras/mitogen-activated protein kinase) σηματοδότηση και τα mTOR (phosphatase and tensin homolog/Akt and mammalian target of rapamycin) σηματοδοτικά μονοπάτια (43).

Στους ογκογενετικούς παράγοντες της ηπατίτιδας Β για ανάπτυξη ΗΚΚ περιλαμβάνονται:

A. Η μακροχρόνια λοίμωξη και τα υψηλά επίπεδα ιικού πολλαπλασιασμού. Η μακρά περίοδος λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας Β, δίνει την ευκαιρία σε ποικίλους ιολογικούς και μη παράγοντες κινδύνου, να προωθήσουν την ογκογένεση στο ήπαρ. Επίσης, η οροθετικότητα του ΗBeAg και τα αυξημένα επίπεδα του ιού στον ορό των ασθενών (που αποτυπώνεται με τη μέτρηση των επιπέδων του HBV DNA στον ορό), φαίνεται να προδιαθέτουν θετικά την εμφάνιση ΗΚΚ (44-47).

B. Ο γονότυπος της ηπατίτιδας Β. Ανάμεσα στο γονότυπο Β και C, ο γονότυπος C είναι πιο πιθανό να οδηγήσει σε σοβαρή ηπατική νόσο, κίρρωση και ΗΚΚ σε σχέση με γονότυπο Β. Αντίστοιχα, στους γονότυπους Α και D, φαίνεται πως ο γονότυπος D σχετίζεται με σοβαρότερη νόσηση και εμφάνιση ΗΚΚ (44-47).

Γ. Η ενσωμάτωση του ιού της ηπατίτιδας Β. Ο HBV πολλαπλασιάζεται μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το προγονιδιωματικό RNA (pgRNA) και σε αντίθεση με τους ρετροϊούς, η ενσωμάτωση του χρωμοσωμικού DNA δεν είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιού της ηπατίτιδας Β. Η ενσωμάτωση του DNA του ιού της ηπατίτιδας Β στο DNA των ηπατοκυττάρων του ξενιστή, πιθανόν συνεισφέρει στην ογκογένεση, καθώς το ενσωματωμένο DNA δύναται να προκαλέσει χρωμοσωμική αστάθεια και να επιτρέψει τη συνεχή έκφραση

ικών ογκοπρωτεϊνών, όπως οι HBx και οι συντετμημένες (truncated) preS2/S πρωτεΐνες (44-47).

Δ. Μεταλλάξεις του ιού της ηπατίτιδας Β. Η ανάστροφη μεταγραφάση δε διαθέτει διορθωτική δραστηριότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια της χρόνιας λοίμωξης με τον ιό, ιδιαίτερα υπό την πίεση της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή και της θεραπείας με φάρμακα έναντι του ιού. Πολλές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τον ΗΚΚ φαίνεται να πραγματοποιούνται στην περιοχή BCP (basal core promoter)/preC (μεταλλάξεις T1762, A1764, C1653T, T1753V), στο γονίδιο που επηρεάζει την έκφραση και δραστηριότητα της HBx πρωτεΐνης και στην περιοχή preS (μεταλλάξεις που επηρεάζουν τις πρωτεΐνες του “φακέλου” του ιού της ηπατίτιδας Β) και μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό μετασχηματισμό και μεταμόρφωση, μέσω πρόκλησης στρες του ενδοπλασματικού δικτύου – ER stress) (44-47).

Ε. Η HBx πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει σημαντικά στον πολλαπλασιασμό του ιού της ηπατίτιδας Β και φαίνεται πως σχετίζεται στενά με την ογκογενετική ικανότητα του ιού. Η HBx πρωτεΐνη προκαλεί χρωμοσωμική αστάθεια συνδεδεμένη με ποικίλες κυτταρικές πρωτεΐνες (Crm1, p53, DDB1, HBXIP, hBubR1), ενώ προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δύναται να εμποδίσει την κυτταρική απόπτωση. Επιπλέον, έχει καταγραφεί ότι δύναται να προωθεί την αγγειογένεση του ΗΚΚ (44-48).

ΣΤ. Οι πρωτεΐνες PreS/S. Οι μεταλλάξεις αυτών των πρωτεϊνών φαίνεται πως θα μπορούσαν να προκαλέσουν ER stress, με τη συσσώρευσή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων, με συνέπεια να οδηγήσουν σε φλεγμονή, ηπατοκυτταρικό πολλαπλασιασμό, χρωμοσωμική αστάθεια, ενώ αυτές οι μεταλλάξεις διαφαίνεται να ενεργοποιούν την έκφραση της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (TERT-telomerase reverse transcriptase) (44-47).

B. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

1. Εισαγωγή

Η κυτταρική γήρανση προσδιορίστηκε, για πρώτη φορά, το 1961 από τους Hayflick και Moorhead. Αποτελεί τη διακοπή του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου - κυτταρικής διαίρεσης (cell cycle arrest) ως απάντηση σε μία ποικιλία εξωκυττάρων ή ενδοκυττάρων παραγόντων και ερεθισμάτων ή βλάβης του DNA του κυττάρου. Τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται συνήθως από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, προφλεγμονώδες φαινότυπο και μείωση του μήκους των τελομερών (49).

Φυσιολογικά, η γήρανση δύναται να συμμετέχει στην εμβρυική ανάπτυξη, ενώ τα γηρασμένα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά και μπορούν να επικοινωνήσουν με κύτταρα στο γειτονικό τους περιβάλλον, μεταφέροντας πληροφορίες και ασκώντας επιρροή στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον τους (49, 50). Επιπλέον, τα ίδια τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν την ανοσιακή απόκριση του οργανισμού (με την προσέλκυση ανοσοκυττάρων), η οποία συμβάλλει στην εξάλειψη και στον καθαρισμό τους και η διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων (49).

Ωστόσο, η διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, φαίνεται να εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως στη μη αλκοολική λιπώδη διήθηση του ήπατος, στη παχυσαρκία, στο σακχαρώδη διαβήτη, στην πνευμονική υπέρταση, σε λοιμώξεις, σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, αλλά και στην ογκογένεση (49, 51).

2. Παθοφυσιολογία της κυτταρικής γήρανσης

Κυτταρικές αποκρίσεις, εξαρτώμενες από τον τύπο των κυττάρων, τα οποία υφίστανται διάφορα βλαπτικά ερεθίσματα, αποτελούν η απόπτωση, η αυτοφαγία, η νέκρωση και η γήρανση (52, 53).

Η γήρανση («senescence»), προερχόμενη από το λατινικό όρο «senex», που αφορά την προχωρημένη ηλικία) αποτελεί ένα κυτταρικό πρόγραμμα, το οποίο προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στη φάση G1 του κύκλου, και χαρακτηρίζεται από τυπικές φαινοτυπικές, μορφολογικές και επιγενετικές μεταβολές, όπως μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, τροποποίηση ιστονών, μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA, αυξημένη αυτοφαγία και έκφραση και έκκριση ενός προφλεγμονώδους συνόλου μεσολαβητών (52, 54, 55).

Με βάση την κινητική των κυττάρων, η γήρανση διακρίνεται σε οξεία γήρανση (παροδική), η οποία είναι κομμάτι φυσιολογικών βιολογικών διαδικασιών, όπως της εμβρυικής ανάπτυξης, της επούλωσης πληγών και γενικότερα της επιδιόρθωσης των ιστών, με ταυτόχρονο καθαρισμό και απομάκρυνση των γηρασμένων κυττάρων που προκύπτουν μέσω ανοσολογικών μηχανισμών και σε χρόνια γήρανση (εμμένουσα), η οποία έχει επιβλαβείς συνέπειες εντός των ιστών-οργάνων και μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις (52).

Η διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης αποτελεί εκείνη την απάντηση, η οποία δύναται να περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των δυσλειτουργικών κυττάρων και μπορεί να είναι συνέπεια του στρες που πυροδοτείται από μία σειρά ερεθισμάτων (52, 54).

Πιο συγκεκριμένα, τα ερεθίσματα, τα οποία μπορούν να πυροδοτήσουν την κυτταρική γήρανση (πρώιμη γήρανση – premature senescence), πέρα από τη γήρανση που σχετίζεται με το φυσιολογικό πέρας της ηλικίας του ανθρώπου (αναπαραγωγική γήρανση – replicative senescence) και τα οποία σχετίζονται με τρώση στο κυτταρικό DNA είναι ενδογενή, όπως η φθορά των τελομερών, η οξειδωτική βλάβη, η δυσλειτουργία των μιτοχondρίων, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων με συνέπεια τον υπερπολλαπλασιασμό των κυττάρων και εξωγενή, όπως η ακτινοβολία και τα κυτταροτοξικά φάρμακα (56, 57).

Μείωση μήκους τελομερών

Το μήκος των τελομερών αποτελεί έναν ακριβή προγνωστικό δείκτη της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων. Ο κύριος ρόλος των τελομερών είναι η προστασία των χρωμοσωμάτων από εκφυλισμό και χρωμοσωμική απώλεια (52). Μείωση του μήκους πραγματοποιείται σε κάθε κυτταρική διαίρεση, ωστόσο αντισταθμίζεται από τη δράση της τελομεράσης. Το μήκος των τελομερών μειώνεται επίσης με το οξειδωτικό στρες και την πάροδο της ηλικίας (52).

Η κυτταρική γήρανση πυροδοτείται κυρίως όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της μείωσης του μήκους τους και της επανορθωτικής δράσης της τελομεράσης (52).

Οξειδωτικό στρες

Είναι γνωστό ότι ο φαινότυπος της γήρανσης μπορεί να επαχθεί από το στρες που προκαλούν τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species), τα οποία είναι φυσικά υποπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού του οξυγόνου (52). Η κύρια πηγή των ROS είναι τα μιτοχόνδρια, οι κυτταρικές μεμβράνες και το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER).

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου τόσο ενδογενούς, όσο και εξωγενούς προέλευσης, προκαλούν και διατηρούν τον φαινότυπο της γήρανσης μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει την απάντηση στη βλάβη του DNA, την επιγενετική ρύθμιση και την ενεργοποίηση μονοπατιών καταστολής της καρκινογένεσης (52).

Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια, τα οποία συσσωρεύονται σε γηρασμένα κύτταρα, δείχνουν αυξημένες συγκεντρώσεις ROS και αυξημένο ποσοστό γηρασμένων κυττάρων στους ίδιους ιστούς, οδηγώντας σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (52).

Ακτινοβολία

Η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει οξείδωση των DNA βάσεων και να προκαλέσει με τη σειρά της βλάβη του DNA (58).

Κυτταροτοξικά φάρμακα

Οι χημικοί παράγοντες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία του καρκίνου, μπορούν να προκαλέσουν μια ποικιλία αλλοιώσεων DNA, μέσω προσκόλλησης αλκυλομάδων σε βάσεις DNA, εισαγωγής ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ βάσεων του ίδιου κλώνου DNA ή διαφορετικών κλώνων DNA και παγίδευσης ομοιοπολικών συμπλεγμάτων τοποϊσομεράσης-DNA (58).

Απόκριση στη DNA βλάβη (DDR-DNA damage response)

Ο αντικειμενικός και κύριος σκοπός κάθε έμβιας οντότητας είναι η μεταφορά του γενετικού της υλικού, αμετάβλητου και ανέπαφου στην επόμενη γενιά. Λόγω της ύπαρξης, όπως ήδη αναφέρθηκε, ενδογενών και εξωγενών παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να προσβάλλουν το DNA ενός οργανισμού, ο κάθε οργανισμός έχει αναπτύξει μονοπάτια εντοπισμού της DNA βλάβης, σηματοδότησης και επιδιόρθωσής της, μία διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται ως «απόκριση στη DNA βλάβη» (DDR – DNA damage response) (59).

Η ποικιλομορφία των βλαβών του DNA απαιτεί πολλαπλούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Οι περισσότερες βλάβες αντιμετωπίζονται από καταλυτικές δράσεις, οι οποίες ρυθμίζονται από πολλαπλές πρωτεΐνες (59). Έτσι, στους κυριότερους μηχανισμούς της DDR, έχουμε το μηχανισμό «επιδιόρθωσης της αναντιστοιχίας» (MMR - mismatch repair), όπου εντοπίζει αναντιστοιχίες DNA και εισαγωγές ή απαλοιφές βρόχων (loops), που προκύπτουν από την αντιγραφή του DNA, το μηχανισμό «επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης» (BER – base excision repair), όπου βλάβη σε μία βάση αναγνωρίζεται από ένα ένζυμο DNA γλυκοζυλάσης και εν συνεχεία απομακρύνει αυτή τη βάση, το μηχανισμό «επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου» (NER - nucleotide excision repair), όπου αναγνωρίζονται βλάβες που διαταράσσουν τη διπλή έλικα του DNA, τους μηχανισμούς «μη ομόλογης τελικής ένωσης» (NHEJ - non-

homologous end-joining) και «ομόλογου ανασυνδυασμού» (HR - homologous recombination), οι οποίοι συμβάλλουν στην επιδιόρθωση των θραύσεων του διπλού κλώνου DNA (DSBs) και τα σηματοδοτικά μονοπάτια των κινασών ATM (ataxia-telangiectasia mutated) και ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) που στρατολογούνται από την παρουσία των θραύσεων του διπλού κλώνου DNA (DSBs) και του μονόκλωνου DNA επικαλυμένου με την πρωτεΐνη αντιγραφής A (RPA-coated ssDNA) (59, 60).

Καθώς, λοιπόν, η απόκριση στη DNA βλάβη (DDR), οδηγεί σε παύση τον κυτταρικό κύκλο, ενορχηστρώνοντας παράλληλα τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, από τη μία πλευρά μία λανθασμένη επιδιόρθωση μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις και πιθανή ανάπτυξη καρκίνου, ενώ από την άλλη, εάν η βλάβη δε μπορεί να αντιμετωπιστεί και είναι εμμένουσα, τα κύτταρα είτε οδηγούνται σε απόπτωση ή νέκρωση, είτε μπορούν να εισέλθουν σε ένα μη αναστρέψιμο καθεστώς μόνιμης διακοπής του πολλαπλασιασμού τους, που αποτελεί την κυτταρική γήρανση (61, 62).

Η κυτταρική απόπτωση διαφαίνεται πως σχετίζεται με την απελευθέρωση του «ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA» (cell-free DNA / cfDNA) στο περιφερικό αίμα των ανθρώπων, το οποίο αποτελεί ένα θραύσμα DNA διπλής έλικας στην κυκλοφορία του αίματος, τόσο υγιών ατόμων (σε μικρή ποσότητα), όσο και ατόμων που μπορεί να πάσχουν από καρκίνο, φλεγμονώδεις καταστάσεις, αυτοανοσία (σε μεγαλύτερη ποσότητα), ενώ και η συνεισφορά της κυτταρικής νέκρωσης στο κυκλοφορούν cfDNA είναι σημαντική (63, 64). Όσον αφορά στη γήρανση, διαφαίνεται πως και αυτή σχετίζεται με ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στο κυκλοφορούν cfDNA, με ποσοτική αύξηση της συγκέντρωσής του σε άτομα αυξημένης ηλικίας (65, 66).

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού θανάτου, ο οποίος περιλαμβάνει την απόπτωση και τη νέκρωση, δύναται να απελευθερωθούν στην κυκλοφορία του αίματος «νουκλεοσώματα» (nucleosomes), τα οποία είναι συμπλέγματα DNA και πρωτεϊνών ιστόνης και αποτελούν βασική μονάδα συσκευασίας (packaging) του DNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, έτσι ώστε το DNA να χωρέσει σε έναν μικρού μεγέθους κυτταρικό πυρήνα, διατηρώντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα του κυττάρου για έλεγχο και ρύθμιση της πρόσβασης στο γενετικό υλικό και συμμετοχή σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες (67-69).

Τα νουκλεοσώματα μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα σε διάφορες μορφές καρκίνου, αλλά και σε αυτοάνοσες ασθένειες και οξείες καταστάσεις, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο, το τραύμα και κατά τη διάρκεια της σήψης και βαριάς λοίμωξης (68). Ωστόσο, κατά τη γήρανση διαφαίνεται πως υπάρχει μείωση στα επίπεδα των πρωτεϊνών ιστόνης και μείωση στην πληρότητα (occupancy) των νουκλεοσωμάτων, έως και 50%, στο ανθρώπινο γονιδίωμα και ως συνέπεια νουκλεοσωμική απώλεια (70, 71).

Ως προς την κυτταρική γήρανση, η σταθερή, μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από την ενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών μονοπατιών και συγκεκριμένα των p53/p21^{CIP1} και p16^{INK4a}/Rb (56).

p53/p21^{CIP1} και κυτταρική γήρανση

Η βλάβη του DNA, από τα στρεσογόνα κυτταρικά ερεθίσματα, οδηγεί σε αυξημένη εναπόθεση των γH2Ax (φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2Ax) και 53BP1 (p53-συνδεδεμένη πρωτεΐνη 1) στη χρωματίνη, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν ένα καταρράκτη κινασών, που περιλαμβάνει πρώτα τις ATM (ataxia-telangiectasia mutated) και ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) και έπειτα τις CHK1 (Checkpoint kinase 1) και CHK2 (Checkpoint kinase 2) και τελικά καταλήγει στην ενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (54). Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 επάγει την μεταγραφή του εξαρτώμενου από κυκλίνη αναστολέα της κινάσης p21^{CIP1}. Με τη σειρά του, ο p21^{CIP1} μπλοκάρει τη δραστηριότητα των CDK4/6 (Cyclin-dependent kinase 4/6), οδηγώντας σε υποφωσφορλίωση του Rb (retinoblastoma protein – πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος), αναστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή των E2F γονιδίων στόχων που είναι σημαντικά για τη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου (54, 72).

INK4/ARF και κυτταρική γήρανση

Τρεις ογκοκατασταλτικοί παράγοντες κωδικοποιούνται από τη θέση (locus) INK4/ARF, οι οποίοι είναι οι ARF, p14^{ARF} στους ανθρώπους και p19^{Arf} στα ποντίκια, και p16^{INK4a}, τα οποία κωδικοποιούνται από το CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase

Inhibitor 2A) γονίδιο και p15^{INK4b} που κωδικοποιείται από το CDKN2B (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B) γονίδιο(56). Τόσο το p16^{INK4a}, όσο και το p19^{ARF} διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της παύσης του κυτταρικού κύκλου. Το p16^{INK4a} εκλεκτικά αναστέλλει τις CDK4 (Cyclin Dependent Kinase 4) and CDK6 (Cyclin Dependent Kinase 6), ενώ μεταλλάξεις του p16^{INK4a}, οι οποίες έχουν ως επίπτωση την απώλεια της λειτουργικότητάς του, συνδέονται με ογκογένεση (56).

Επιπλέον, η επαγωγή του ARF, προϊόντος της θέσης (locus) INK4/ARF, απομονώνει τη λιγάση ουβικουτίνης MDM2, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (54).

Σε φυσιολογικά κύτταρα, η έκφραση της θέσης (locus) INK4/ARF ελέγχεται από τα κατασταλτικά συμπλέγματα Polycomb, όπως τα PRC1 (polycomb repressive complex 1) και PRC2 (polycomb repressive complex 2). Η αποδιοργάνωση των συστατικών των PRC1 ή PRC2, όπως των CBX7, BMI1, ή EZH2 και η απορρέουσα απώλεια του κατασταλτικού χαρακτήρα της ιστόνης H3K27 και/ή του PRC1, είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει το p16^{INK4a} και να προκληθεί κυτταρική γήρανση (56).

Το p16^{INK4a} αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των CDK4 (Cyclin Dependent Kinase 4) and CDK6 (Cyclin Dependent Kinase 6), αποτρέπει τη φωσφορυλίωση του ρετινοβλαστώματος (Rb), επιτρέποντας στο ρετινοβλάστωμα να συνδεθεί με το μεταγραφικό παράγοντα E2F, αποτρέποντας έτσι τη μεταγραφή των E2F1 γονιδίων στόχων που είναι σημαντικά για τη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου, σταματώντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο (73).

Χαρακτηριστικά του γηρασμένου κυττάρου

Τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από μόνιμη διακοπή του κύκλου τους, ενώ συνήθως εμφανίζουν και αλλαγή στο μέγεθός τους, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση, με συχνό το διπλασιασμό του όγκου τους και επιπέδωση της μορφολογίας τους (74). Στη γηρασμένα κύτταρα χαρακτηριστική είναι η αυξημένη έκφραση της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης (SA-Bgal, senescence-associated β-galactosidase), λόγω αυξημένου λυσοσωμικού περιεχομένου τους, ενώ μερικά γηρασμένα κύτταρα περιέχουν σχετιζόμενες με γήρανση εστίες ετεροχρωματίνης (SAHF - senescence-associated heterochromatin foci), κυτταρολογικά ανιχνεύσιμες

που περιλαμβάνουν και πιθανώς οδηγούν σε σίγαση συγκεκριμένα γονίδια πολλαπλασιασμού (56, 74). Με τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, τα κύτταρα που γηράσκουν δύναται να εμφανίσουν επίσης τροποποιημένα μοτίβα DNA μεθυλίωσης, η οποία γενικά καταλύεται από μία οικογένεια DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs) και είναι ήδη γνωστό, από μελέτες που αφορούν επιγενετικές κυτταρικές αλλαγές, πως τόσο με τη γήρανση που σχετίζεται με την άνοδο της ηλικίας (αναπαραγωγική γήρανση – replicative senescence), όσο και με την επαγόμενη από ερεθίσματα γήρανση (premature senescence), είναι δυνατόν να παρατηρηθεί καθολική (global) υπομεθυλίωση του DNA, αλλά και διακριτές περιοχές υπερμεθυλίωσης, ενώ τα μοτίβα της μεθυλίωσης του DNA των κυττάρων, μπορούν να γίνουν ανιχνεύσιμα ακόμη και στο πλάσμα του ανθρώπου, με την ανάλυση του κυκλοφορούντος cfDNA, μέσω της «υγρής βιοψίας» (liquid biopsy) (57, 71, 75-78).

Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με γήρανση (SASP - Senescence-associated secretory phenotype)

Ένα τελικό σημαντικό χαρακτηριστικό πολλών γηρασμένων κυττάρων είναι ο εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με γήρανση (SASP - Senescence-associated secretory phenotype). Ο SASP αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό κυτοκινών, χυμοκινών, αυξητικών παραγόντων και πρωτεασών (74).

Ο SASP είναι μία ιδιότητα των γηρασμένων κυττάρων, όπου η έλευση της γήρανσης τους οφείλεται ή συνοδεύεται από γονιδιακές βλάβες και διαταραχές, όπως βλάβη του DNA, δυσλειτουργία των τελομερών, οξειδωτικό στρες και άλλα ερεθίσματα σχετικά με τη γήρανση (74).

Τα περισσότερα συστατικά του SASP υφίστανται θετική ρύθμιση από τις πρωτεΐνες της «DNA damage response», ATM, NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1) και CHK2, οι οποίες ενεργοποιούν το SASP, μόνο μετά από εμμένουσα DDR. Για αυτό το λόγο, η DDR, η οποία ενεργοποιείται αμέσως μετά τη βλάβη του DNA, δεν επάγει τον SASP, καθώς η επαγωγή γίνεται με αργό ρυθμό(74). Θετική ρύθμιση του SASP προκαλούν επίσης και οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB (Nuclear Factor κB) και C/EBP-β (CCAAT Enhancer Binding Protein Beta). Εν αντιθέσει, το

ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 επηρεάζει αρνητικά το SASP και συγκεκριμένα το περιορίζει (56, 74).

Η επίδραση του SASP στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον μπορεί να είναι επωφελής ή επιζήμια, με τη δράση του να είναι πλειοτροπική. Ο SASP διαφαίνεται ότι μπορεί να οδηγήσει μη κακοήγη γειτονικά κύτταρα να υποστούν γήρανση, κάτι που υποδεικνύει ότι τα γηρασμένα κύτταρα ενισχύουν έτσι την αντινεοπλασματική τους απόκριση, περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των γειτονικών κυττάρων που εκτίθενται σε όμοιους με αυτά στρεσογόνους παράγοντες (56). Αντίθετα, ο SASP έχει μία σημαντική προφλεγμονώδη φύση, η οποία φλεγμονή είναι γνωστό ότι συμβάλλει τα μέγιστα στην πρόοδο και εμφάνιση κακοήθειας (56). Επιπλέον, η σχέση του SASP με την ανοσιακή απάντηση θεωρείται πολύπλοκη, καθώς από τη μία φαίνεται να μπορεί να στρατολογήσει το ανοσοποιητικό σύστημα για να καθαρίσει-εξαλείψει τα γηρασμένα κύτταρα, από την άλλη όμως μπορεί και διαθέτει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (56) (Εικόνα 8).

Τα γηρασμένα κύτταρα δεν εκκρίνουν μόνο φλεγμονώδεις πρωτεΐνες, αλλά και «εξωκυττάρια οχήματα-σωματίδια» (extracellular vesicles – EVs). Τα EVs περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, τα οποία εκκρίνονται από κύτταρα στον εξωκυττάριο χώρο και τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην «κύτταρο με κύτταρο επικοινωνία» (cell-to-cell communication) στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον(79, 80). Τα EVs μας δίνουν ιδιαίτερες πληροφορίες για τα κύτταρα προέλευσής τους και τη σύνθεση του κυττάρου τη στιγμή της παραγωγής τους, ενώ τα γηρασμένα κύτταρα φαίνεται πως παρουσιάζουν πιθανότατα έναν αυξημένο ρυθμό έκκρισης EVs, με τα σχετιζόμενα με τη γήρανση EVs (senescence-associated EVs) να αποτελούν ένα νέο παράγοντα του SASP (81, 82).

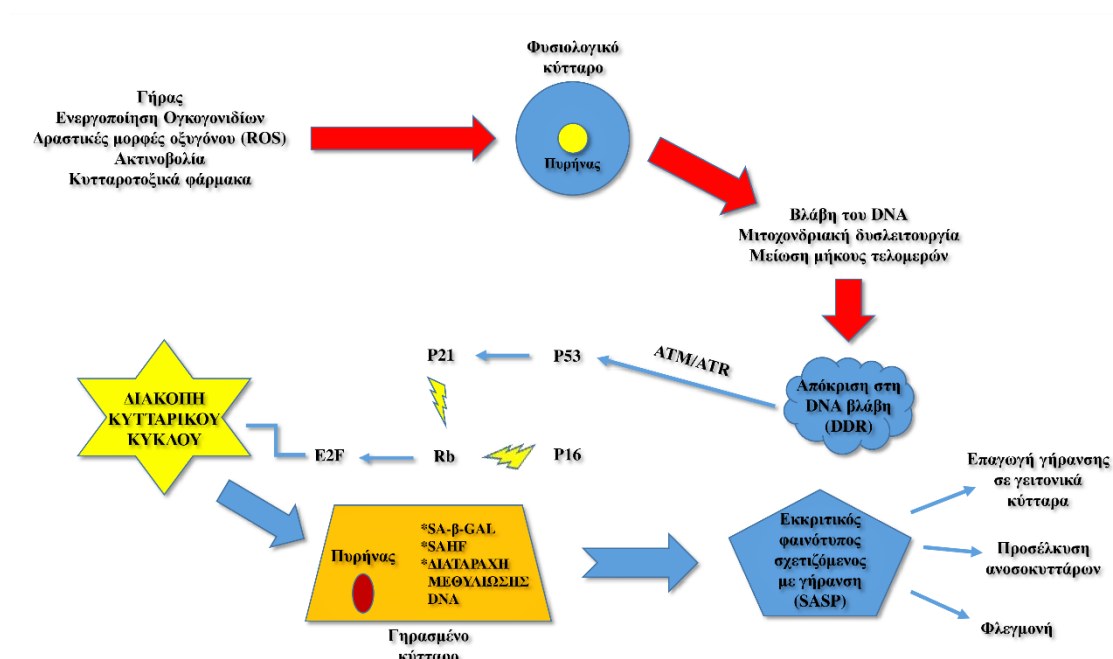
Οι τρεις κύριοι υπότυποι των EVs είναι τα «μικρο-οχήματα» (microvesicles - MVs), τα «εξωσώματα» (exosomes) και τα «αποπτωτικά σώματα» (apoptotic bodies) (80).

Τα εξωσώματα αποτελούν τα μικρότερα και περισσότερο μελετημένα EVs και χαρακτηρίζονται από το ιδιαίτερο μέγεθός τους (50–150 nm) και την ενδοσωματική τους προέλευση (81), ενώ διαφαίνεται πως συμμετέχουν στα πολύπλοκα δίκτυα του μηχανισμού της κυτταρικής γήρανσης, συμβάλλοντας στη γήρανση (83).

Ωστόσο, τα εξωσώματα διαφαίνεται πως ανιχνεύονται και σε καρκινικό μικροπεριβάλλον και πως διαδραματίζουν ρόλο στο να διευκολύνουν την καρκινογένεση, ρυθμίζοντας την αγγειογένεση, την ανοσία και τις μεταστάσεις(84).

Η πορεία ενός κυττάρου προς τη γήρανση και η επίδραση της διαδικασίας αυτής στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου απεικονίζεται ανά στάδιο στην εικόνα 5.

Εικόνα 5. Η διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης και η επίδραση των γηρασμένων κυττάρων στο μικροπεριβάλλον τους.



3. Δείκτες εντοπισμού κυτταρικής γήρανσης

Πολλαπλές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των γηρασμένων κυττάρων. Ωστόσο, λόγω της ετερογένειας των γηρασμένων κυττάρων, όσο και της έλλειψης συγκεκριμένων ειδικών βιοδεικτών, η χρήση ενός συνδυασμού διαφορετικών τεχνικών διαφαίνεται ως η λύση, στην παρούσα φάση, για τον εντοπισμό αυτών των κυττάρων και τη μελέτη της διαδικασίας της γήρανσης (50, 52, 85, 86).

Τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένο λυσοσωμικό περιεχόμενο. Ο πιο δημοφιλής δείκτης κυτταρικής γήρανσης είναι η σχετιζόμενη με γήρανση β-γαλακτοσιδάση (SA-β-gal), κυρίως για την αναπαραγωγική γήρανση (86). Η ανίχνευση σε διαφορετικά κύτταρα (μέσω χρώσης σε pH:6) αυξημένης δραστηριότητας και έκφρασης του λυσοσωμικού ενζύμου της SA-β-gal, δύναται να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης, ο οποίος αναδεικνύει το αυξημένο λυσοσωμικό περιεχόμενο των κυττάρων, άρα και την παρουσία γηρασμένων κυττάρων (50, 86). Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει ο εντοπισμός της λιποφουσκίνης από γηρασμένα λυσοσώματα, αναδεικνύοντας το υψηλό λυσοσωμικό περιεχόμενο των κυττάρων, μέσω της Sudan Black B (SBB) βαφής ή του αναλόγου της GL13 (50).

Η παρουσία της ιστόνης γ-H2AX, η οποία αποτελεί τη φωσφορυλιωμένη μορφή της ιστόνης H2AX, δύναται να μετρηθεί με τη χρήση ανοσοχρωματισμού στους περισσότερους ιστούς, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* και μπορεί να αναδείξει συνεχή και μη επιδιορθωμένη βλάβη του DNA, καθώς εμφανίζεται σε παρουσία βλαβών του δίκλωνου DNA (double-stranded DNA breaks - DSBs) και σε καταστάσεις μείωσης του μήκους των τελομερών, ενώ επιπλέον, η μέτρηση του επιπέδων του φωσφορυλιωμένου p53, το οποίο αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην DDR, μπορεί να μας δώσει στοιχεία για την πιθανή παρουσία γηρασμένων και κατεστραμμένων κυττάρων (50, 86). Το ίδιο μπορεί να συμβεί με την ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων, όπως είναι η μεθυλίωση του DNA των κυττάρων και των ιστονών, η οποία μπορεί να μας δώσει σημαντικές πληροφορίες για την παρουσία της γήρανσης κυττάρων (86).

Η μείωση του μήκους των τελομερών φαίνεται ότι συνδέεται με τις σχετιζόμενες με γήρανση εστίες ετεροχρωματινής (SAHF - senescence-associated heterochromatin

foci). Αυτές οι εστίες αποτελούν περιοχές ετεροχρωματίνης, οι οποίες σχετίζονται με μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και συσσωρεύονται σε γηρασμένα κύτταρα, αναδεικνύοντας την παρουσία τους. Ωστόσο, δεν παρουσιάζονται σε όλα τα κύτταρα και ιστούς και ούτε σε όλους τους τύπους γήρανσης (50, 86).

Ένας ακόμη τρόπος για να διαπιστώσουμε εάν τα κύτταρα έχουν εξέλθει του κυτταρικού τους κύκλου, αποτελεί η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των αναστολέων των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών (Cyclin-dependent kinases inhibitors - CDKIs) και συγκεκριμένα των p16 και p21 (50).

Επιπλέον, ο εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με γήρανση (SASP) περιλαμβάνει ένα σύνολο κυτοκινών όπως οι ιντερλευκίνες IL-1a, IL-6 και IL-8, χυμοκινών όπως η CCL2 και μεταλλοπρωτεασών όπως οι MMP-1 και MMP-3 που μπορούν να μετρηθούν είτε με τη χρήση ανοσοχρωματισμού, είτε με την μέθοδο της ELISA και να δώσουν ιδιαίτερα στοιχεία για την παρουσία της κυτταρικής γήρανσης (50).

Το αυξημένο μέγεθος και το ακανόνιστο σχήμα των γηρασμένων κυττάρων μπορεί εύκολα να γίνει αντιληπτό με τη χρήση απλού οπτικού μικροσκοπίου. Ο ανοσοφθορισμός με τη χρήση βιμεντίνης, ακτίνης και άλλων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών μπορεί να μας δώσει αρκετές πληροφορίες σχετικά με το κυτταρικό σχήμα και ως συνέπεια την παρουσία γηρασμένων κυττάρων (50).

Σημαντικό, ωστόσο, είναι να αναφέρουμε πως τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται μία προσπάθεια για την ανεύρεση δεικτών σχετικών με την ανίχνευση επιγενετικών μεταβολών, οι οποίοι δύνανται να προέρχονται από τον ορό του αίματος των υπό μελέτη ασθενών με μία τεχνική, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως «υγρή βιοψία» (liquid biopsy) και η οποία συναντά πρόσφορο έδαφος και σε άλλες καταστάσεις, όπως αυτή της ανίχνευσης και πρόγνωσης του καρκίνου. Ανάμεσα στους υπό μελέτη και χρήση δείκτες, μέσω της «υγρής βιοψίας», οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται με την παρουσία επιγενετικών μεταβολών, είναι το ελεύθερο κυττάρου κυκλοφορούν DNA στο πλάσμα (plasma cell free DNA - cfDNA) και το μοτίβο της μεθυλίωσης του (66, 87, 88).

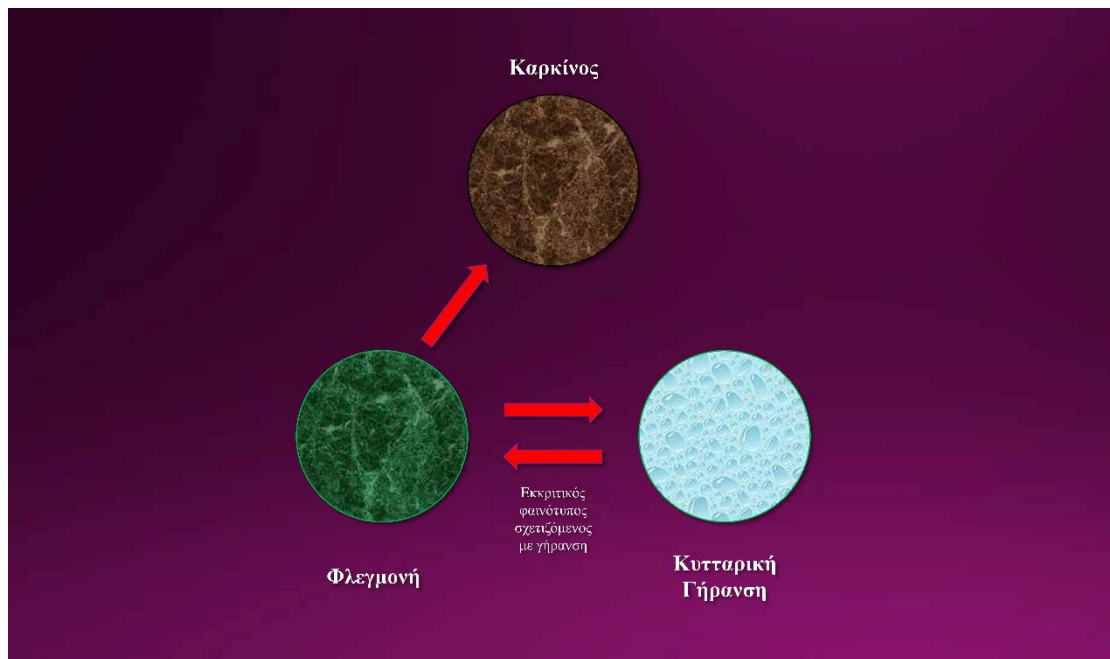
4. Φλεγμονή, κυτταρική γήρανση και καρκίνος

Η παρουσία της φλεγμονής (inflammation), η οποία έχει την τάση να αυξάνεται με την άνοδο της ηλικίας (inflammaging), ανήκει στους παράγοντες εκείνους, οι οποίοι μπορούν να πυροδοτήσουν και να επάγουν τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, πέραν του οξειδωτικού στρες, της βλάβης των τελομερών, της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων, της βλάβης του DNA, των επιγενετικών μεταβολών και της ενεργοποίησης διαφόρων ογκογονιδίων (52, 89). Η χρόνια εμμένουσα φλεγμονή φαίνεται επίσης να σχετίζεται με πολλές φυσιολογικές, αλλά και παθοφυσιολογικές διαδικασίες και ασθένειες που συνδέονται με το γήρας (52, 89).

Την ίδια στιγμή όμως, η φλεγμονή και οι λοιμώξεις, αποτελούν περίπου το 25% των παραγόντων που οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου (90, 91). Η χρόνια φλεγμονή εξαιτίας εμμένουσας λοίμωξης λόγω μικροβίων και ιών ή της συνεχούς έκθεσης σε μη λοιμώδεις παράγοντες, όπως το κάπνισμα μπορεί να έχει δυσμενή πρόγνωση, ενώ οι καρκίνοι, οι οποίοι σχετίζονται με την φλεγμονή, χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεταλλαξιόγόνων αλλοιώσεων του DNA (90, 92).

Έτσι λοιπόν, η φλεγμονή διαδραματίζει έναν διττό ρόλο, δηλαδή διαθέτει μια «φωτεινή» και μία «σκοτεινή» όψη, καθώς ενώ από τη μία πλευρά οι διάφορες φλεγμονώδεις αντιδράσεις διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην εξουδετέρωση κυττάρων, τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου, από την άλλη η παρουσία ενός φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος, με την έκκριση μυριάδων χυμοκινών, κυτοκινών και άλλων παραγόντων μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη κακοήθειας (93). Η επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης, η οποία αποτελεί εμπόδιο στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην καρκινική ανάπτυξη, παρόλο που οδηγεί σε περαιτέρω αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων (SASP), οι οποίοι συμβάλλουν τόσο στη διατήρηση της γήρανσης, όσο και στην ενεργοποίηση ενός ανοσολογικού μηχανισμού καθαρισμού των γηρασμένων κυττάρων, προωθεί την παρουσία της φλεγμονής στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον, η οποία συμβάλλει στην ευόδωση πολλαπλών όψεων καρκινικής ανάπτυξης, όπως αγγειογένεσης, πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων και μετάστασης, ενώ η συσσώρευση και η παραμονή γηρασμένων κυττάρων δύναται να έχει παρόμοιες δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (56, 74, 93, 94) (Εικόνα 6).

Εικόνα 6. Η συσχέτιση φλεγμονής, κυτταρικής γήρανσης και καρκίνου.

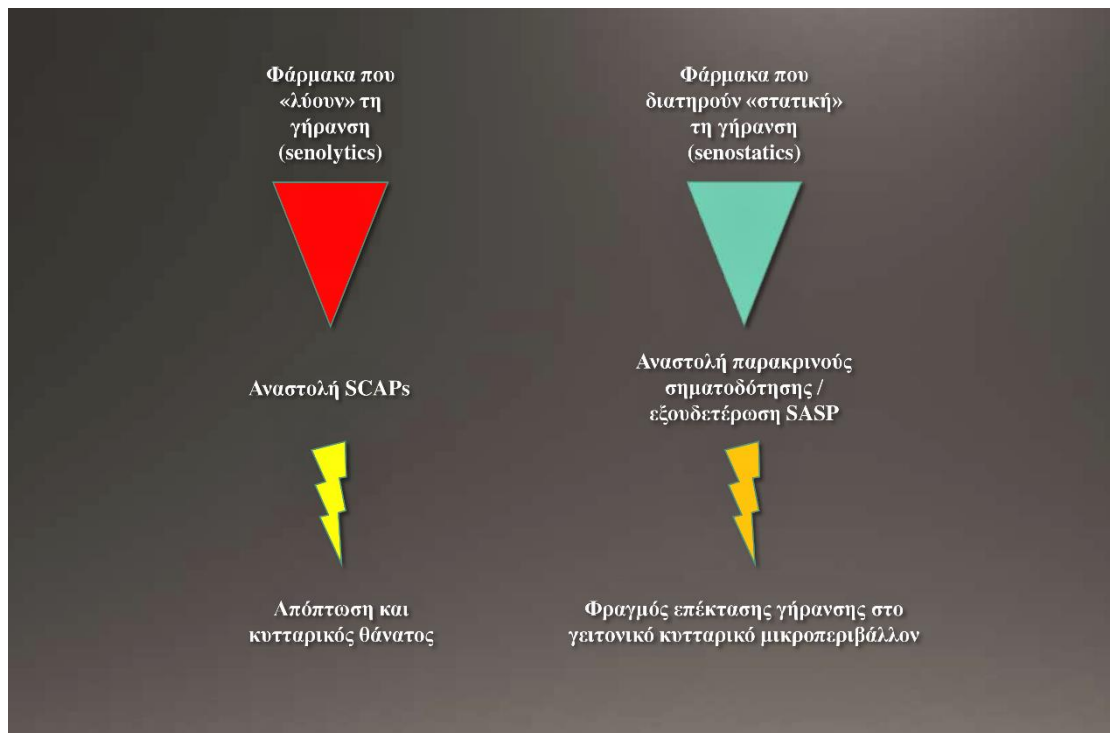


5. Φαρμακευτική αντιμετώπιση της γήρανσης των κυττάρων

Τα γηρασμένα κύτταρα, πέραν από τις αποκρίσεις τους σε στρεσογόνους παράγοντες, χαρακτηρίζονται και από την ενεργοποίηση πολλαπλών αντι-αποπτωτικών μονοπατιών (senescent cell anti-apoptotic pathways – SCAPs), με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους και δυσμενείς συνέπειες (95, 96). Τα τελευταία χρόνια ένας αυξανόμενος αριθμός φαρμάκων μελετάται και φαίνεται να αναστέλλει αυτά τα μονοπάτια, με κύριο στόχο να προκαλείται απόπτωση και θάνατος των γηρασμένων κυττάρων (97-99). Αυτά τα φάρμακα αποτελούν τα λεγόμενα φάρμακα που «λύουν» τη γήρανση (senolytics) και τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερη ποικιλομορφία ως προς την ειδικότητα που έχουν στα διάφορα είδη των κυττάρων που επιδρούν (97, 99) (Εικόνα 7). Ανάμεσα σε αυτά τα υπό μελέτη φάρμακα, τα οποία προκαλούν απόπτωση των γηρασμένων κυττάρων, περιλαμβάνονται μόρια όπως η δασατινίμη (dasatinib), η κουερσετίνη (quercetin) και η φισετίνη (fisetin) (100).

Στον αντίποδα των φαρμάκων που «λύουν» τη γήρανση, «σκοτώνοντας» και «καθαρίζοντας» τα γηρασμένα κύτταρα, βρίσκονται τα φάρμακα που διατηρούν «στατική» τη γήρανση (senostatics) και τα οποία δεν «σκοτώνουν» τα γηρασμένα κύτταρα, αλλά εμποδίζουν και καταστέλλουν την παρακρινική σηματοδότηση που προέρχεται από αυτά τα κύτταρα, εξουδετερώνοντας τη δράση του SASP, με συνέπεια να θέτουν ένα φραγμό στην επέκταση της γήρανσης στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον και στα γειτονικά κύτταρα (bystander effect) (97-99) (Εικόνα 7). Αναστολείς του μονοπατιού του μηχανιστικού στόχου της ραπαμυκίνης (mTOR) και άλλες υπό μελέτη παρεμβάσεις, φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη διατήρηση της «στατικής» γήρανσης, ωστόσο περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προς αυτήν την κατεύθυνση (97).

Εικόνα 7. Κατηγορίες και δράσεις φαρμάκων έναντι της κυτταρικής γήρανσης.



Γ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Η χρόνια ηπατική βλάβη (chronic liver injury - CLI) αποτελεί μία πολύπλοκη παθολογική διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από προοδευτική καταστροφή και αναγέννηση των ηπατικών παρεγχυματικών κυττάρων, ως συνέπεια ποικίλων παραγόντων κινδύνου, όπως είναι η κατάχρηση αλκοόλ, η τοξικότητα φαρμάκων, οι γενετικές μεταβολικές διαταραχές και φυσικά μία ιογενής ηπατική λοίμωξη (101). Όταν η βλάβη των ηπατοκυττάρων είναι ήπια, τότε το ήπαρ δύναται να αναγεννηθεί. Ωστόσο, όταν η βλάβη είναι ανεπανόρθωτη, τότε τα ηπατοκύτταρα οδηγούνται στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης ή σε διάφορες μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση και η νέκρωση (101).

Ως προς τον HBV, όπως διαφαίνεται από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, η πρωτεΐνη HBx του ιού αποτελεί τον κύριο σύνδεσμο της αλληλεπίδρασης μεταξύ της κυτταρικής γήρανσης και του HBV, καθώς μπορεί είτε να συμβάλλει στην ευόδωση της ηπατοκυτταρικής γήρανσης, είτε να διαδραματίζει αρνητικό ρόλο στην εγκατάστασή της (102-106).

Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη HBx, αν και μπορεί να αναστείλει τη δραστηριότητα του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, μπλοκάροντας την κυτταρική απόπτωση, από την άλλη πλευρά δύναται να συμβάλλει και στην ευόδωση της κυτταρικής γήρανσης, με την αυξημένη έκφραση των p16(INK4a) και p21(Waf1/Cip1) και τη μειωμένη φωσφορυλίωση του Rb (103, 104). Μάλιστα, παρατηρήθηκε πως οι μεταλλάξεις της C-τερματικής περιοχής της πρωτεΐνης HBx, αν και μπορούν από τη μία πλευρά να πυροδοτήσουν την κυτταρική γήρανση στην κυτταρική σειρά MRC5 και στη κακοήθη σειρά ηπατοκυττάρων Huh7 και SK-Hep1, μπορούν από την άλλη πλευρά, να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό της HepG2 κακοήθους σειράς ηπατοκυττάρων (104).

Επιπλέον, η πρωτεΐνη HBx φαίνεται πως δύναται να υπερκεράσει την πρόιμη γήρανση που προκαλείται από στρεσογόνους παράγοντες και μέσω της DNA μεθυλίωσης να καταστείλει την έκφραση του p16(INK4a), ενώ επιπλέον μπορεί να επηρεάσει

αρνητικά τα επίπεδα των p16 και p21 και να οδηγήσει σε απενεργοποίηση του Rb στην HepG2 κακοήθη σειρά ηπατοκυττάρων (105, 106).

Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες, οι οποίες παρουσιάζουν την πιθανή αλληλεπίδραση ανάμεσα στον HBV και την κυτταρική γήρανση, όπου η πρωτεΐνη HBx δεν διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο (107-109).

Πιο ειδικά, παρατηρήθηκε σε περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας B και C, μεθυλίωση στην περιοχή του υποκινητή (promoter) της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (TERT), κάτι το οποίο υποδεικνύει, σε αυτή την περίπτωση, ένα ρόλο του HBV που δεν προωθεί την ανάπτυξη της κυτταρικής γήρανσης (107), ενώ σε άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε στη χρόνια ηπατίτιδα B, διακοπή του ηπατοκυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και επιταχυνόμενη ηπατοκυτταρική γήρανση (108). Επιπροσθέτως, διαφαίνεται πως διαγραφές (deletions) στις περιοχές pre-S1 και pre-S2 του HBsAg, προάγουν την εμφάνιση οξειδωτικού στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων (109).

IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να εκτιμηθεί η γήρανση των ηπατοκυττάρων σε καλά χαρακτηρισμένους ασθενείς που βρίσκονται σε διάφορες φάσεις HBeAg-αρνητικής χρόνιας HBV λοίμωξης, καθώς και οι πιθανές μεταβολές της γήρανσης των ηπατοκυττάρων σε ασθενείς που λαμβάνουν αντική θεραπεία για HBeAg-αρνητική χρόνια ηπατίτιδα Β.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 61 Καυκάσιοι ασθενείς με ΗΒεΑg-αρνητική χρόνια ΗΒV λοίμωξη ή χρόνια ηπατίτιδα Β, οι οποίοι παρακολουθούνταν στενά στο Εξωτερικό Ηπατολογικό Ιατρείο της Πανεπιστημιακής Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό» για τουλάχιστον ένα χρόνο πριν οριστικοποιηθεί η τελική διάγνωση για τη φάση της ΗΒV λοίμωξης. Η ένταξη των ασθενών στην μελέτη πραγματοποιήθηκε, εφόσον πληρούσαν τα κάτωθι κριτήρια:

Κριτήρια εισόδου

- ΗΒεΑg-αρνητική χρόνια ΗΒV λοίμωξη ή χρόνια ηπατίτιδα Β, με ή χωρίς κίρρωση
- Παρακολούθηση τουλάχιστον 12 μηνών, υπό ή χωρίς αντική θεραπεία
- Διαθέσιμα δύο φυλαγμένα δείγματα ορού/πλάσματος (ένα στην αρχή και ένα στους 12 μήνες παρακολούθησης)
- Γραπτή συγκατάθεση για συμμετοχή τους σε αυτή τη μελέτη

Κριτήρια αποκλεισμού

- Μη αντιροπούμενη κίρρωση
- ΗΚΚ
- Συλλοίμωξη με ιό ηπατίτιδας D ή C ή/και με τον ιό της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV)
- Κατάχρηση αλκοόλ
- Άλλο δυνητικό αίτιο ηπατικής βλάβης
- Μεταμόσχευση ήπατος

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διακήρυξη του Helsinki (Declaration of Helsinki) και έλαβε έγκριση από την επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και το επιστημονικό συμβούλιο του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό».

Πρωτόκολλο παρακολούθησης ασθενών

Όλοι οι ασθενείς της μελέτης παρακολούθηθηκαν σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες που ήταν σχετικές με το νόσημά τους. Σε όλους τους ασθενείς υπήρχε λεπτομερής παρακολούθηση για τουλάχιστον 12 μήνες και παράλληλη καταγραφή των επιδημιολογικών και κλινικών χαρακτηριστικών τους, καθώς και των χαρακτηριστικών των θεραπειών τους και της διάρκειας παρακολούθησής τους.

Τόσο η φυσική εξέταση, όσο και ο εργαστηριακός έλεγχος που αφορούσε αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους, πραγματοποιούνταν τουλάχιστον κάθε 3 με 6 μήνες μαζί με τη μέτρηση των επιπέδων του HBV DNA ορού κάθε 6 με 12 μήνες, ανάλογα με τη φάση της ιαμίας και με τη χρήση από του στόματος αντικής θεραπείας. Η παρακολούθηση για τον αποκλεισμό ανάπτυξης ΗΚΚ βασιζόταν σε υπερηχογράφημα ανά 6 μήνες. Κανείς από τους ασθενείς της μελέτης δεν ελάμβανε κάποιο είδος αντικής θεραπείας κατά την έναρξη της παρακολούθησής του.

Τα δημογραφικά δεδομένα όπως η ηλικία, το φύλο, το ύψος, το βάρος, η χρήση αλκοόλ, το κάπνισμα, η χρόνια ή η περιστασιακή χρήση φαρμακευτικών ουσιών, αλλά και οι εξετάσεις της ηπατικής βιοχημείας (ALT, AST, γGT, αλκαλική φωσφατάση, χολερυθρίνη) και ο λοιπός εργαστηριακός έλεγχος, πραγματοποιούνταν σε τακτική βάση, κατά την πρώτη επίσκεψη σε όλους τους ασθενείς της μελέτης μας, αλλά και προ της έναρξης φαρμακευτικής αγωγής και τουλάχιστον 6 μήνες μετά την έναρξη από του στόματος φαρμακευτικής αγωγής, σε άτομα με χρόνια ηπατίτιδα Β. Στους 17 από τους 31 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β για τους οποίους είχαμε ορούς και μετά θεραπείας (τουλάχιστον 6 μήνες μετά την έναρξη από του στόματος αγωγής) παρατηρήθηκε πλήρης ιολογική και βιοχημική ύφεση υπό μονοθεραπεία με νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα (εντεκαβίρη ή τενοφοβίρη δισοπροξίλη).

Καταληκτικά σημεία

Το πρωταρχικό καταληκτικό σημείο της μελέτης αποτελεί η εκτίμηση της γήρανσης των ηπατοκυττάρων σε καλά χαρακτηρισμένους ασθενείς που βρίσκονται σε διάφορες φάσεις HBeAg-αρνητικής χρόνιας HBV λοίμωξης.

Δευτερογενές καταληκτικό σημείο της μελέτης αποτελεί η εκτίμηση των πιθανών μεταβολών της γήρανσης των ηπατοκυττάρων σε ασθενείς που λαμβάνουν από του στόματος αντική θεραπεία για HBeAg-αρνητική χρόνια ηπατίτιδα B.

Σημαντικοί ορισμοί σχετιζόμενοι με τα καταληκτικά σημεία

- **Χρόνια HBV λοίμωξη:** θετικό HBsAg για τουλάχιστον 6 μήνες.
- **HBeAg-αρνητική χρόνια HBV λοίμωξη:** χρόνια HBV λοίμωξη με αρνητικό HBeAg, επίμονα φυσιολογική ALT για τουλάχιστον 12 μήνες (τουλάχιστον 4 ανά 3μηνο μετρήσεις) και HBV DNA ορού <2000 IU/mL.
- **HBeAg-αρνητική χρόνια ηπατίτιδα B:** αρνητικό HBeAg, HBV DNA ορού >2000 IU/mL και αυξημένη ALT σε 2 τουλάχιστον ανά μήνα προσδιορισμούς, με ή χωρίς επιβεβαίωση παρουσίας ιστολογικών αλλοιώσεων χρόνιας ηπατίτιδας B, εφόσον έχουν αποκλεισθεί άλλα αίτια ηπατικής βλάβης.
- **Αντιρροπούμενη κίρρωση:** α) ίνωση σταδίου 5 ή 6 κατά Ishak ή σταδίου F4 κατά Metavir ή β) ηπατική ακαμψία >14 kPa σε αξιόπιστη ελαστογραφία ήπατος ή γ) συμβατά κλινικοεργαστηριακά σημεία (σπληνομεγαλία χωρίς άλλη αιτία, αιμοπετάλια <120.000/mm³, όζοι και/ή σπληνομεγαλία και/ή διάταση πυλαίας φλέβας σε υπερηχογράφημα, κίρσοι οισοφάγου), πάντα χωρίς παρουσία σημείων μη αντιρροπούμενης κίρρωσης
- **Μη αντιρροπούμενη κίρρωση:** ασκίτης ή κίρσοραγία ή ηπατική εγκεφαλοπάθεια ή ίκτερος μη αποφρακτικής αιτιολογίας (χολερυθρίνη >3 mg/dl)
- **ΗΚΚ:** εστιακή βλάβη ήπατος που πληρεί τα διεθνώς αποδεκτά κριτήρια διάγνωσης ΗΚΚ (110).

Εργαστηριακές μέθοδοι

Όλοι οι οροί που χρησιμοποιήθηκαν για τα παρακάτω πρωτόκολλα υπέστησαν φυγοκέντρωση στα 1500× g για 15 λεπτά, ενώ το στρώμα ορού που προέκυψε από κάθε δείγμα μετά την φυγοκέντρωση αποθηκεύτηκε σε νέα σωληνάρια πολυπροπυλενίου 2 ml, ελεύθερα RNase/DNase και σε βαθιά κατάψυξη στους -80°C, μέχρι να πραγματοποιηθεί η περαιτέρω ανάλυσή.

Πρωτόκολλο απομόνωσης και ποσοτικοποίησης του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA (cfDNA)

Ένα ειδικό kit με την ονομασία «Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Cat. No 55100Dx)» (Norgen Biotek. Corporation, CANADA), χρησιμοποιήθηκε για να απομονωθεί το ελεύθερο κυττάρου κυκλοφορούν DNA (cfDNA) από 200 µL ορού των δειγμάτων μας. Για κάθε δείγμα, η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του απομονωμένου cfDNA διενεργήθηκε με τη χρήση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμέρασης πραγματικού χρόνου (real time qPCR) για το γονίδιο glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, γνωστό και ως GAPDH (housekeeping gene) (111, 112).

Οι σχετικοί εκκινητές (primers) της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι: GAPDHf(πρόσθιος): 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3 και GAPDHr(ανάστροφος): 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTC-3. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν ως διπλότυπα (duplicates), ενώ η τελική τιμή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέση τιμή των δύο μετρήσεων (111, 112).

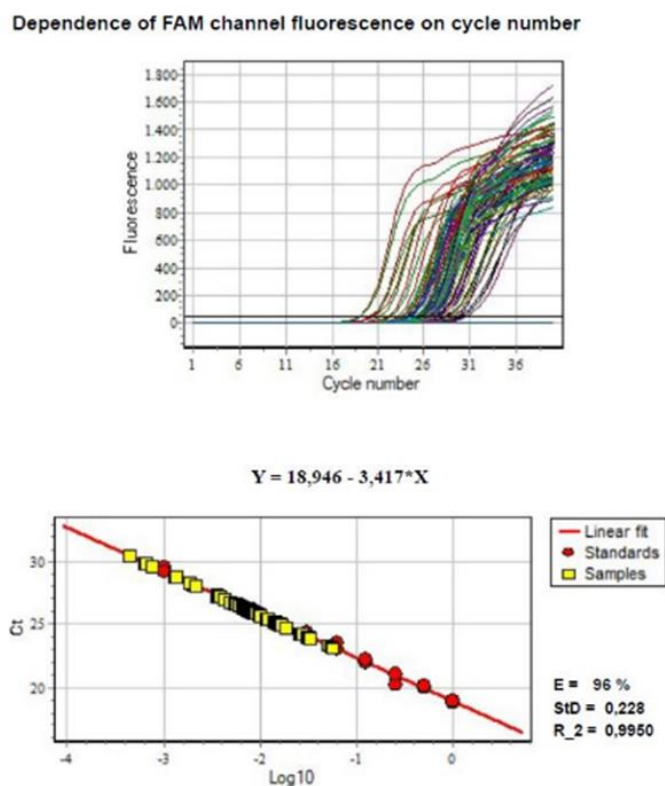
Το master mix το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία της real time qPCR ήταν το «iTaQ™ Universal SYBR Green® Supermix» (BIORAD cat no. 172-5124).

Για την απόκτηση πρότυπης καμπύλης (standard curve) των συγκεντρώσεων του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA, χρησιμοποιήθηκε ως DNA ελέγχου

(control DNA) το «TaqMan Control Genomic DNA» (Applied Biosystems™ cat no. 4312660) (human) (113).

Η συσκευή SaCycler-96 (Sacace Biotechnologies) με 40 κύκλους ενίσχυσης και κάτω από σταθερές συνθήκες (95 °C στα 4 min, 95 °C στα 15 sec, 60 °C στα 30 sec) χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR. Η συλλογή δεδομένων και η ανάλυση (Εικόνα 8) κατέστη εφικτή στους 65 °C – 95 °C για 30 sec, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και controls (Non Template Controls – NTCs) με κύριο στόχο τη διασφάλιση αποφυγής επιμολύνσεων της μεθόδου.

Εικόνα 8. Ανάλυση πρότυπης καμπύλης της «PCR plate» ασθενών της μελέτης.



Πρωτόκολλο καταγραφής της ολικής DNA μεθυλίωσης (Global DNA Methylation)

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων της ολικής μεθυλίωσης του DNA (global DNA methylation) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ELISA και συγκεκριμένα ένα ειδικό kit το «DNA Methylation Elisa Kit» (Item No. 589324) (Cayman CHEMICAL, Ann Arbor, MI, USA) (111).

Με τη χρήση αυτού του kit και ακολουθώντας τις οδηγίες του, επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής μεθυλίωσης του DNA σε 25 μ L ορού των δειγμάτων μας, τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν αντίστοιχα με τη μέτρηση των κυκλοφορούντων επιπέδων της «5-methyl-2'-deoxycytidine» στον ορό των ασθενών μας (111).

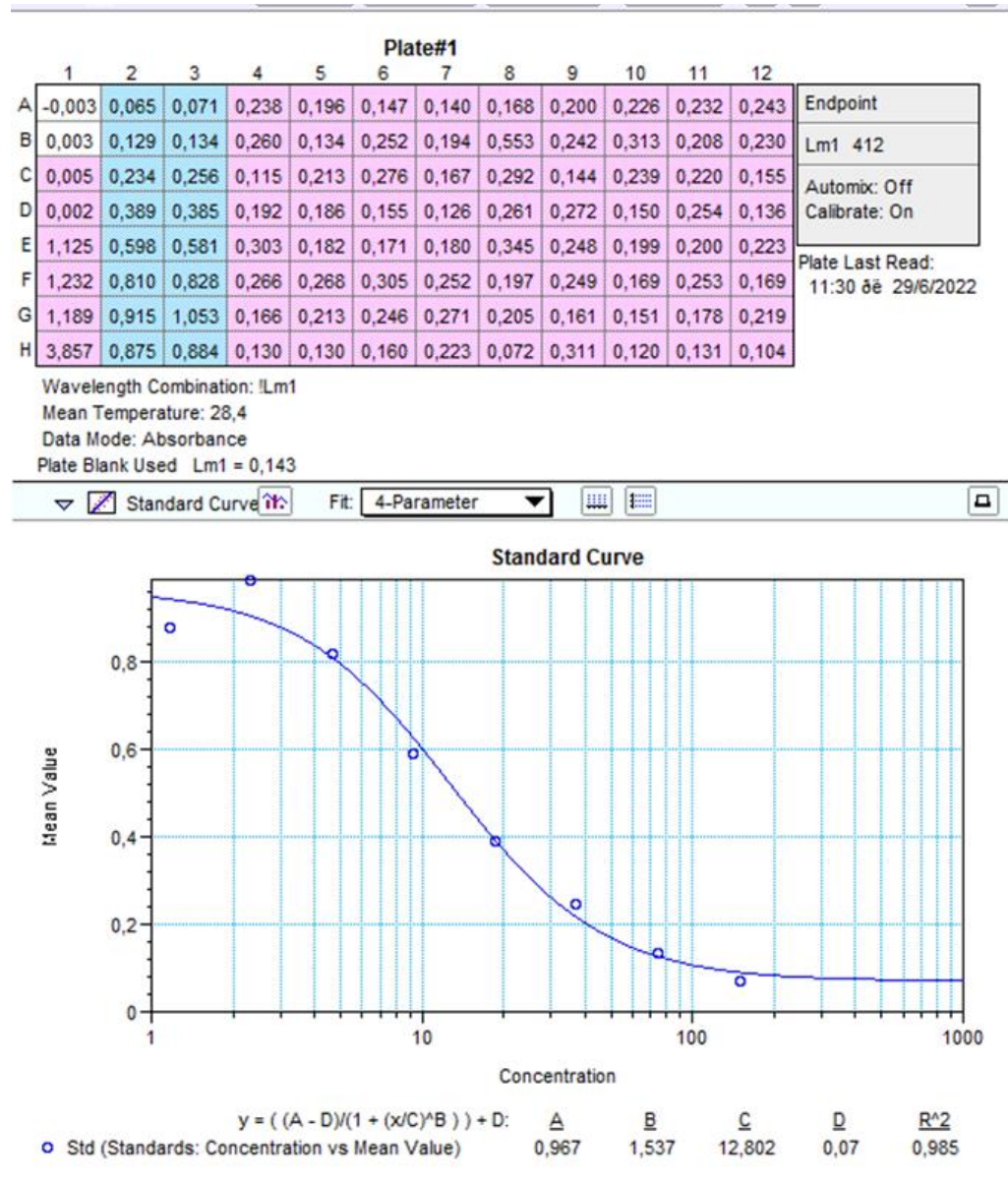
Πιο αναλυτικά, στους ορούς των ασθενών δύναται να υπάρχει μία ποσότητα της «5-methyl-2'-deoxycytidine». Η λογική αυτού του kit βασίζεται στον ανταγωνισμό της σύνδεσης ανάμεσα στην «5-methyl-2'-deoxycytidine» και στην «5-methyl-2'-deoxycytidine-acetylcholinesterase (AChE) (Ανιχνευτής/Tracer)» ως προς μία συγκεκριμένη ποσότητα ενός αντισώματος και συγκεκριμένα του «5-methyl-2'-deoxycytidine ELISA Monoclonal Antibody» όταν βρεθούν όλα μαζί, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο γνωστό ως «antibody-5-methyl-2'-deoxycytidine complex». Εξαιτίας του γεγονότος ότι η συγκέντρωση του «5-methyl-2'-deoxycytidine Tracer» παραμένει σταθερή, ενώ η συγκέντρωση της «5-methyl-2'-deoxycytidine» ποικίλλει, το ποσό του «5-methyl-2'-deoxycytidine Tracer» που είναι ικανό να «δεθεί» (bind) με το «5-methyl-2'-deoxycytidine ELISA Monoclonal Antibody» είναι αντιστρόφως ανάλογο με τη συγκέντρωση της «5-methyl-2'-deoxycytidine» ανά ορό που μελετάμε, σε κάθε θέση (well) της πλάκας (plate) και αυτό αποτελεί μία συσχέτιση που μπορεί να μας δώσει την τιμή της συγκέντρωσης της «5-methyl-2'-deoxycytidine» ανά ασθενή της μελέτης μας.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της «5-methyl-2'-deoxycytidine» σε κάθε ορό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου ELISA σε μία 96-θέσεων πλάκα (Goat Anti-Mouse IgG Coated ELISA plate), η οποία μετά τη στρώση της και με βάση το πρωτόκολλο, επώαστηκε για 18 ώρες στους 4°C, πριν τα τελικά βήματα πλύσης και τοποθέτησης ειδικού αντιδραστηρίου (Ellman's Reagent – υπόστρωμα στον

ανιχνευτή/Tracer) και η ανάγνωσή της διενεργήθηκε σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, της τάξης των 412 nm.

Εν συνεχεία, μετά την απόκτηση της αρχικής έκθεσης (report) των αποτελεσμάτων με τη χρήση της ELISA (Εικόνα 9) και μέσω ειδικών υπολογισμών και βημάτων που παρατίθενται σε ένα υπολογιστικό φύλλο (spreadsheet) του σχετικού kit (www.caymanchem.com/analysis/elisa), μας δόθηκε η δυνατότητα της απόδοσης πρότυπης καμπύλης (standard curve) με τη χρήση 8 standards (bulk standards) και εν τέλει του υπολογισμού της ποσότητας της «5-Methyl-2'-deoxycytidine» ανά ορό ασθενούς.

Εικόνα 9. Πρωταρχικά αποτελέσματα της «Elisa plate» ασθενών με ταυτόχρονη αποτύπωση πρότυπης καμπύλης.



Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS Statistics για Windows (έκδοση 28.0, IBM Corp Armonk, NY, 2021) και Graph Pad Prism (GraphPad Software 8, Inc., San Diego, CA, USA). Όλες οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάστηκαν με τις μέσες τιμές τους \pm σταθερή απόκλιση (SD) ή τις διάμεσες τιμές [όρια 25^ο, 75^ο τεταρτημόριο: IQR], ανάλογα με την κατανομή της κάθε μεταβλητής, που αξιολογήθηκε μέσω της εφαρμογής του «Shapiro-Wilk test». Η σύγκριση παραμετρικών και μη παραμετρικών ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή των «Student's t-test» και του «non-parametric Mann-Whitney test», αντίστοιχα. Η σύγκριση παραμετρικών και μη παραμετρικών ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δύο συσχετιζόμενων ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των «paired t-test» ή του «Wilcoxon signed rank test», αντίστοιχα. Έγινε χρήση των μέγιστων διαθέσιμων δεδομένων της κάθε παραμέτρου για τα αναφερόμενα στατιστικά τεστ. Η μέθοδος «ROUT», για την ανίχνευση στατιστικά ακραίων τιμών (outliers), εφαρμόστηκε για τις αναλύσεις κάθε ποσοτικής μεταβλητής και όσον αφορά την έκθεση της DNA μεθυλίωσης, μία τέτοια ακραία τιμή ανευρέθηκε και ως συνέπεια αποκλείστηκε. Οι συσχετίσεις μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών αξιολογήθηκαν μέσω του «Spearman's correlation» και εκφράστηκαν από το «Spearman's coefficient (r)». Οι κατηγορικές μεταβλητές συνοψίστηκαν ως συχνότητες και ποσοστά και οι συσχετίσεις τους προσδιορίστηκαν με τη χρήση του «διορθωμένου chi-squared» ή του «two-sided Fisher's exact test». Ως στατιστική σημαντικότητα χαρακτηρίστηκε η τιμή $p < 0,05$.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Χαρακτηριστικά ασθενών της μελέτης

Από τους 61 Καυκάσιους ασθενείς με χρόνια ΗΒεΑg-αρνητική HBV λοίμωξη ή ηπατίτιδα Β που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, οι 30 ήταν χρόνιοι φορείς και οι 31 ήταν ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, από τους οποίους 7 είχαν αντιτροπούμενη κίρρωση.

Από αυτούς του ασθενείς, υπήρχαν αποθηκευμένοι 78 δείγματα ορών: 30 δείγματα ορών φορέων (χρόνια HBV λοίμωξη), 31 δείγματα ορών ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία και 17 δείγματα ορών ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β (προερχόμενοι από τους αρχικούς 31 ασθενείς αυτής της ομάδας) μετά τη λήψη από του στόματος θεραπείας έναντι του ιού, με στόχο να αποτυπωθεί η εικόνα των υπό μελέτη βιοδεικτών, πριν και μετά την έναρξη αντυκικής θεραπείας.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των 61 ασθενών της μελέτης μας αποτυπώνονται στον Πίνακα 4. Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία είχαν σημαντικά μεγαλύτερη μέση ηλικία σε σχέση με τους φορείς (49 vs 42 έτη, $p=0.033$) και είχαν σημαντικά αυξημένα μέσα επίπεδα των HBV-DNA [314.000 vs 229 IU/mL], ALT [95 vs 20 IU/L], AST [50 vs 18 IU/L] (σε όλα, $p<0.001$), γ GT (27 vs 17 IU/L, $p=0.001$) και ALP (94 vs 72 IU/L, $p=0.015$) σε σχέση με τους φορείς του HBV. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις στον ορό των υπό μελέτη ασθενών μας των ολικών πρωτεϊνών, της λευκωματίνης, όσο και των αιμοπεταλίων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών ομάδων μας. Ως προς τις λοιπές δημογραφικές και συμπεριφορικές παραμέτρους και πιο ειδικά το φύλο, την κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο βασικών ομάδων της μελέτης μας, ενώ ως προς τις συννοσηρότητες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η δυσλιπιδαιμία ή άλλες χρόνιες νόσοι, επίσης δεν καταγράφηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 4: Κύρια χαρακτηριστικά των χρονίων φορέων του HBV (n=30) και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β (ΧΗΒ), χωρίς θεραπεία (n=31) της μελέτης μας.

	Φορείς (n=30)	ΧΗΒ (n=31)	P τιμή
Ηλικία, έτη	42±11	49±13	0.033
Φύλο, άρρεν (%)	18 (60)	17 (55)	0.684
Αλκοόλ, n (%)			0.510
Καθόλου χρήση	21 (70)	24 (77)	
Ήπια χρήση	9 (30)	7 (23)	
Κάπνισμα, n (%)			0.334
Όχι	21 (70)	25 (81)	
Ναι	9 (30)	6 (19)	
Σακχαρώδης διαβήτης			
τύπου 2, n (%)			0.981
Όχι	29 (96.7)	30 (96.8)	
Ναι	1 (3.3)	1 (3.2)	
Δυσλιπιδαιμία, n (%)			0.534
Όχι	28 (93.3)	30 (96.8)	
Ναι	2 (6.7)	1 (3.2)	
Άλλες συννοσηρό-			
τητες, n (%)			0.413
Όχι	24 (80)	22 (71)	
Ναι	6 (20)	9 (29)	
HBVDNA, IU/mL	229 [556]	314.000 [3,49x10 ⁶]	<0.001
ALT, IU/L	20 [13]	95 [102]	<0.001

AST, IU/L	18 [6]	50 [71]	<0.001
ALP, IU/L	72 [50]	94 [75]	0.015
γGT, IU/L	17 [14]	27 [32]	0.001
Λευκωματίνη, g/L	44±4	42±3	0.090
Ολική Πρωτεΐνη, g/L	71.5±4	72±4	0.660
Αιμοπετάλια, x10 ⁹ /L	204 [72]	176 [81]	0.169

Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± σταθερή απόκλιση (SD) ή διάμεσες τιμές [interquartile range]. HBV DNA: DNA του ιού της ηπατίτιδας Β (ποσοτική μέτρηση του ιικού φορτίου), ALT: αλανινική αμινοτρανσφεράση, AST: ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, ALP: αλκαλική φωσφατάση, γGT: γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση.

Επιπλέον στον Πίνακα 5 συνοψίζεται το βασικό εργαστηριακό προφίλ των 17 ατόμων με χρόνια ηπατίτιδα Β, που εν συνεχεία έλαβαν από του στόματος αντική αγωγή. Μετά τη λήψη αγωγής, αυτοί οι ασθενείς παρουσίασαν μη ανιχνεύσιμο HBV DNA και είχαν επιτύχει σημαντικά χαμηλότερες τιμές και εντός φυσιολογικών ορίων ALT, AST και γGT, καθώς και χαμηλότερα επίπεδα ALP συγκριτικά με τις τιμές προ θεραπείας.

Πίνακας 5: Κύρια χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης μας με χρόνια ηπατίτιδα Β (ΧΗΒ) (n=17) (πριν vs μετά τη χορήγηση θεραπείας).

	ΧΗΒ (πριν)¹	ΧΗΒ (μετά)²	P τιμή
ALT, IU/L	71 [100]	25 [12]	<0.001
AST, IU/L	50 [59]	24 [8]	0.001
ALP, IU/L	96 [107]	73 [18]	0.008
γGT, IU/L	30 [28]	16 [4]	0.002
Λευκωματίνη, g/L	42±3	41.5±3	0.668
Ολική Πρωτεΐνη, g/L	72±4	72±3	0.609
Αιμοπετάλια, x10 ⁹ /L	194 [79]	170 [85]	0.776

Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± σταθερή απόκλιση (SD) ή διάμεσες τιμές [interquartile range-IQR]. HBV DNA: DNA του ιού της ηπατίτιδας Β (ποσοτική μέτρηση του ιικού φορτίου), ALT: αλανινική αμινοτρανσφεράση, AST: ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, ALP: αλκαλική φωσφατάση, γGT: γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση.¹ Ασθενείς με Χρόνια Ηπατίτιδα Β πριν τη χορήγηση από του στόματος θεραπείας, ²Ασθενείς με Χρόνια Ηπατίτιδα Β μετά τη χορήγηση από του στόματος θεραπείας.

Τα αποτελέσματα που αφορούσαν το ελεύθερο κυττάρου κυκλοφορούν DNA αποκτήθηκαν από τους 61 αρχικούς ορούς των ασθενών της μελέτης, καθώς και από 17 ορούς των 17 ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β που έλαβαν από του στόματος θεραπεία στη συνέχεια. Όσον αφορά την ανάλυση μας σχετικά με την ολική DNA μεθυλίωση, τα αποτελέσματά μας προήλθαν από 54 εκ των 61 αρχικών ορών (27 οροί φορέων, 27 οροί ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία, με 5 από αυτούς να

ανήκουν σε ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση) και από 16 εκ των 17 ορών που ανήκαν στους 17 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β που έλαβαν αγωγή από του στόματος.

2. Επίπεδα ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA (cfDNA) στον ορό των ασθενών

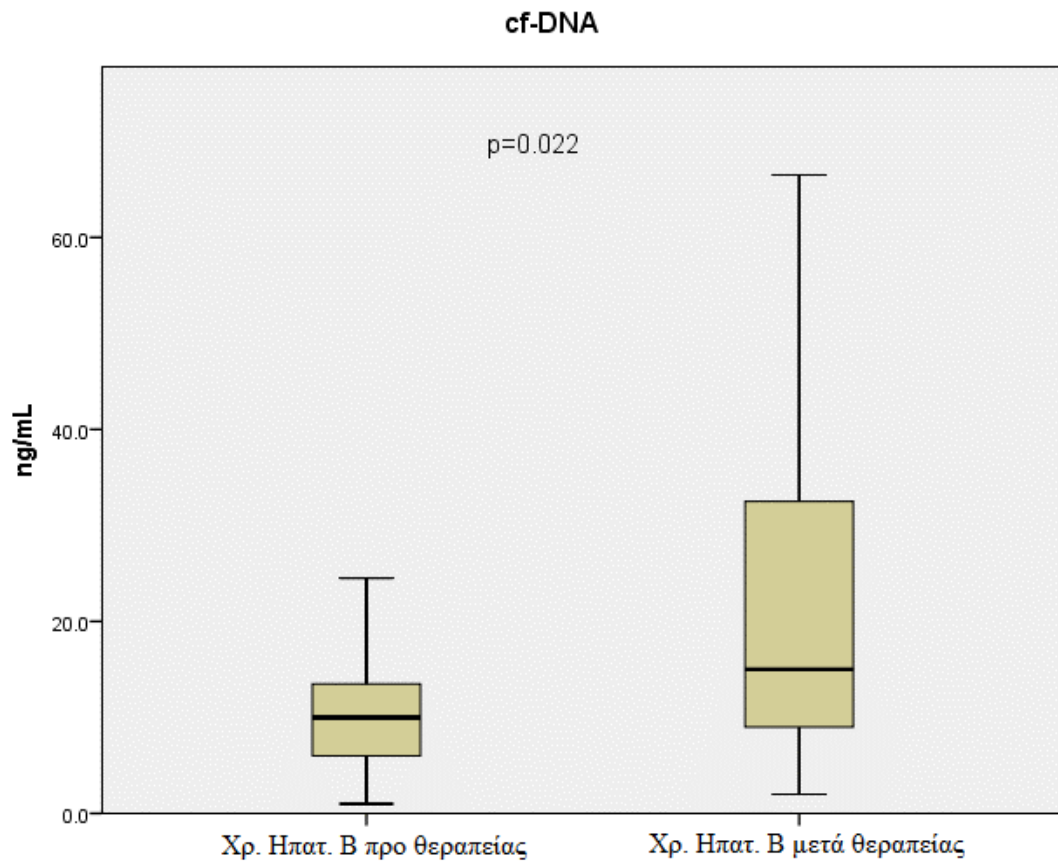
Ως προς το ελεύθερο κυττάρου κυκλοφορούν DNA, η συγκέντρωση του μεταξύ των φορέων και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (11.3 vs 13.0 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.559$).

Ωστόσο, στους 17 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β φαίνεται πως η εφαρμογή της αντικής αγωγής είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα του cfDNA. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση μετά τη χορήγηση από του στόματος θεραπείας στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε σχέση με πριν την εφαρμογή αγωγής (15 vs 10 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.022$), όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 10.

Σημαντικό, ωστόσο, να αναφέρουμε ότι δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά, όσον αφορά τα επίπεδα του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA ανάμεσα σε 7 κίρρωτικούς (με αντιρροπούμενη κίρρωση) και 24 μη κίρρωτικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (8 vs 13 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.199$).

Επιπλέον, καμία αξιοσημείωτη διαφορά δεν παρατηρήθηκε όσον αφορά τα επίπεδα του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA μεταξύ των φορέων και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά τη λήψη από του στόματος θεραπείας (11.3 vs. 15 ng/mL, αντίστοιχα, $p = 0.173$).

Εικόνα 10. Τα επίπεδα της συγκέντρωσης του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA (Cell-free DNA, ng/μL) στον ορό των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β (πριν vs μετά θεραπεία, αριθμός ασθενών n=17).



3. Επίπεδα 5-methyl-2'-deoxycytidine στον ορό των ασθενών

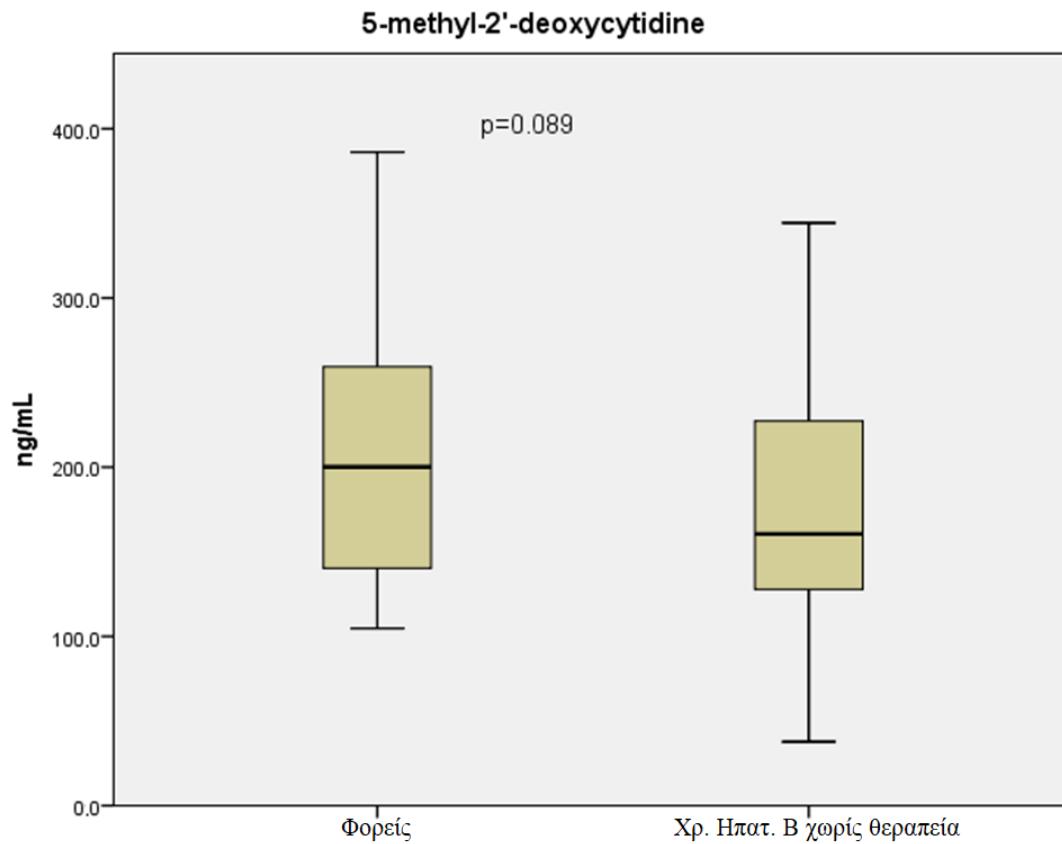
Σχετικά με τα κυκλοφορούντα επίπεδα της «5-methyl-2'-deoxycytidine», ως δείκτη της ολικής μεθυλίωσης του DNA στους ασθενείς, αναδείχθηκε μία σημαντική τάση σχετιζόμενη με υψηλότερα μέσα επίπεδα στους φορείς της μελέτης, συγκριτικά με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία (211 vs 176 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.089$), όπως αποτυπώνεται και στην εικόνα 11.

Επιπλέον, τάση αυξημένων κυκλοφορούντων επιπέδων της «5-methyl-2'-deoxycytidine» παρουσιάστηκε και στους ορούς των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά της χορήγηση από του στόματος αντικής αγωγής, σε σχέση με τους ορούς των αντίστοιχων ασθενών πριν τη λήψη θεραπείας (215 vs 173 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.079$). Αυτή η εξέλιξη αποτυπώνεται στην εικόνα 12.

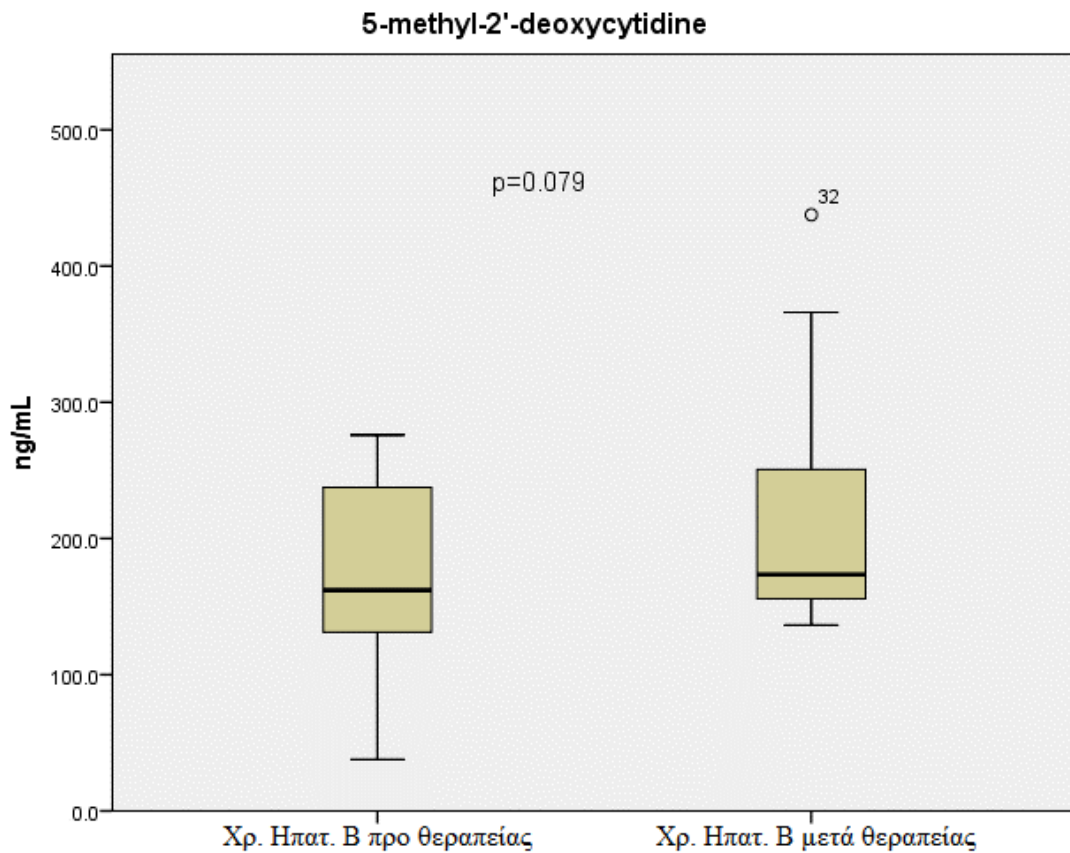
Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά, όσον αφορά τις τιμές των κυκλοφορούντων επιπέδων της «5-methyl-2'-deoxycytidine» ανάμεσα σε 5 κίρρωτικούς (με αντιρροπούμενη κίρρωση) και 22 μη κίρρωτικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (204 vs 169 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.336$).

Ως προς τις τιμές των κυκλοφορούντων επιπέδων της «5-methyl-2'-deoxycytidine» ανάμεσα στους φορείς και ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά την έναρξη από του στόματος αγωγής, δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη διαφοροποίηση (211 vs. 214.8 ng/mL, αντίστοιχα, $p = 0.886$).

Εικόνα 11. Τα επίπεδα της συγκέντρωσης της «5-methyl-2'-deoxycytidine» (ng/mL) στον ορό των ασθενών μεταξύ των χρονίων φορέων του HBV και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς λήψη από του στόματος αγωγής (αριθμός ασθενών, n=54).



Εικόνα 12. Τα επίπεδα της συγκέντρωσης της «5-methyl-2'-deoxycytidine» (ng/mL) στον ορό των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β (πριν vs μετά την από του στόματος χορήγησης θεραπείας, αριθμός ασθενών n=16).



4. Συσχετίσεις ελεύθερου κυττάρου DNA και 5-methyl-2'-deoxycytidine με επιδημιολογικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα ασθενών

Δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα του cfDNA και της DNA μεθυλίωσης σε σχέση με επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, εκτός από σημαντικά αυξημένα επίπεδα της «5-methyl-2'-deoxycytidine» στους άντρες ασθενείς σε σχέση με τις γυναίκες ασθενείς της μελέτης μας ($p = 0.001$), όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Ως προς τα επίπεδα του cfDNA δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις με τιμές εργαστηριακών παραμέτρων σε καμία ομάδα ασθενών της μελέτης. Παρατηρήθηκε, ωστόσο, μόνο μία τάση για συσχέτιση στους ορούς των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β προ λήψης αγωγής, μεταξύ των επιπέδων της DNA μεθυλίωσης του ορού με τις τιμές των ALT ($r = 0.318$, $p = 0.10$), AST ($r = 0.372$, $p = 0.06$), γ GT ($r = 0.330$, $p = 0.09$) και ALP ($r = 0.403$, $p = 0.05$).

Πίνακας 6. Συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA και της 5-methyl-2'-deoxycytidine με κλινικά και βιοχημικά στοιχεία των 61 ασθενών της μελέτης.

	cf-DNA		5-methyl-2'- deoxycytidine	
Ηλικία, έτη	$r = -0.030$	$p = 0.816$	$r = -0.018$	$p = 0.896$
Φύλο,				
Αρρεν	13.0 [16.0]	$p = 0.688$	216.3 [126.6]	$p = \mathbf{0.001}$
Θήλυ	11.3 [15.5]		135.0 [85.2]	
Αλκοόλ,				
Καθόλου χρήση	13.0 [16.8]	$p = 0.099$	183.3 [114.1]	$p = 0.479$
Ήπια χρήση	8.5 [12.3]		189.5 [148.0]	

Κάπνισμα,				
Όχι	13.3 [18.3]	$p = 0.110$	168.8 [116.8]	$p = 0.221$
Ναι	9.5 [9.5]		192.1 [126.6]	
HBVDNA (IU/mL)	$r = 0.143$	$p = 0.274$	$r = -0.134$	$p = 0.333$
ALT (IU/L)	$r = 0.113$	$p = 0.385$	$r = -0.057$	$p = 0.680$
AST (IU/L)	$r = 0.083$	$p = 0.525$	$r = -0.072$	$p = 0.606$
ALP (IU/L)	$r = 0.022$	$p = 0.869$	$r = -0.061$	$p = 0.671$
γ GT (IU/L)	$r = 0.033$	$p = 0.804$	$r = 0.088$	$p = 0.532$
Ολική Πρωτεΐνη (g/L)	$r = 0.023$	$p = 0.894$	$r = -0.034$	$p = 0.854$
Λευκωματίνη (g/L)	$r = -0.088$	$p = 0.615$	$r = 0.012$	$p = 0.948$
Αιμοπετάλια ($\times 10^9/L$)	$r = 0.155$	$p = 0.238$	$r = -0.040$	$p = 0.775$

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη αποτελεί μία προσπάθεια αξιολόγησης, με τη χρήση της «υγρής βιοψίας», των επιπέδων του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA και της ολικής DNA μεθυλίωσης, μέσω των επιπέδων της «5-methyl-2'-deoxycytidine» σε HBeAg-αρνητικούς ασθενείς φορείς του ιού της ηπατίτιδας Β και σε HBeAg-αρνητικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία, αλλά και μετά τη χορήγηση από του στόματος αγωγής (114, 115).

Είναι ήδη γνωστό ότι ασθενείς HBeAg-αρνητικοί με χρόνια ηπατίτιδα Β παρουσιάζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό του ιού και ικό φορτίο, αυξημένους δείκτες ηπατοκυτταρικής βλάβης (ALT/AST) και αυξημένη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα που μπορεί να επιτείνει την ίνωση του ήπατος, ενώ αντίστοιχα ασθενείς HBeAg-αρνητικοί φορείς του ιού έχουν χαμηλό ή καθόλου ικό πολλαπλασιασμό, φυσιολογικές ALT/AST και απουσία εξελισσόμενης νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας (25).

Είναι γνωστό, επίσης, πως η φλεγμονή γενικότερα έχει δυσμενείς επιδράσεις και σχετίζεται με την πρόκληση βλάβης στο DNA ενός οργανισμού, την εμφάνιση μεταλλάξεων, αλλά και την εξέλιξη σε καρκίνο (116), ενώ τα κύτταρα τα οποία είναι υποψήφια για κακοήθη εξαλλαγή δύνανται να εξουδετερωθούν, είτε μέσω της κυτταρικής απόπτωσης, είτε μέσω της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης (117, 118).

Όσον αφορά το ελεύθερο κυττάρου κυκλοφορούν DNA προέρχεται κυρίως από τα κύτταρα που υφίστανται απόπτωση (63), ενώ έχει καταγραφεί πως η βλάβη του DNA μπορεί να ενεργοποιήσει μηχανισμούς που οδηγούν στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest) και να σηματοδοτήσει μονοπάτια όπως η απόπτωση και η κυτταρική γήρανση (119). Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει πως η αυξημένη βλάβη του DNA των ηπατοκυττάρων που ενδεχομένως προκαλεί η αυξημένη φλεγμονώδης δραστηριότητα του ιού στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία συγκριτικά με τους φορείς, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεγαλύτερο βαθμό τα ηπατοκύτταρα των ασθενών αυτών, είτε σε απόπτωση, κάτι το οποίο θα μπορούσε να συνδυάζεται με αυξημένα επίπεδα ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA, ως προϊόν κυτταρικής απόπτωσης, είτε στην ενεργοποίηση της κυτταρικής γήρανσης με απώτερο σκοπό, σε κάθε περίπτωση, την αποφυγή της εμφάνισης ΗΚΚ (63, 117, 118,

120). Στη μελέτη αυτή ωστόσο, δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA μεταξύ των φορέων του ιού και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία. Καθώς η κυτταρική γήρανση μπορεί να έχει έναν ανταγωνιστικό ρόλο έναντι της κυτταρικής απόπτωσης και δεδομένης της ανάδειξης στη μελέτη μας απουσίας υψηλότερων επιπέδων ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA, που είναι και προϊόν κυτταρικής απόπτωσης (63), στους ορούς των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία συγκριτικά με τους φορείς, φαίνεται πως η παρουσία κυτταρικής γήρανσης στα μολυσμένα με τον ιό και με DNA βλάβη ηπατοκύτταρα των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία, θα μπορούσε να είναι πιο πιθανή.

Επιπλέον, στη μελέτη αυτή αναδείχθηκε μία τάση για αυξημένα επίπεδα της «5-methyl-2'-deoxycytidine», άρα και αυξημένη ολική DNA μεθυλίωση, στους φορείς του ιού σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία. Έχει ήδη καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία πως η ολική DNA υπομεθυλίωση σχετίζεται με κυτταρική γήρανση, ενώ παράλληλα είναι γνωστό πως η πρωτεΐνη HBx διαφαίνεται να προάγει την ολική υπομεθυλίωση του DNA (121, 122), δεδομένα ενδεχομένως που ενισχύουν την πιθανότητα ύπαρξης κυτταρικής γήρανσης στα ηπατοκύτταρα των ασθενών μας με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία.

Το εύρημα της μελέτης αυτής, όπου αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, αποτέλεσε η σημαντική αύξηση των επιπέδων του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά τη λήψη από του στόματος αγωγής, σε σχέση με πριν την έναρξή της. Η θεραπεία με νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα που αποτελούν τις κύριες θεραπευτικές επιλογές στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και έλαβαν και οι ασθενείς της μελέτης μας, έχει αναδειχθεί πως γενικότερα επηρεάζει τη δομική ακεραιότητα του DNA, με συνέπεια να οδηγεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που σταματούν τον κυτταρικό κύκλο (123). Επιπλέον, αυτοί οι θεραπευτικοί παράγοντες ενεργοποιούν μηχανισμούς που ξεκινούν τη διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης, κατάσταση που θα μπορούσε να δικαιολογήσει και τα υψηλότερα επίπεδα του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA, ως προϊόν απόπτωσης, μετά την χορήγηση των νουκλεοσ(τ)ιδικών αναλόγων στους ασθενείς μας με χρόνια ηπατίτιδα Β (63, 123).

Είναι σημαντικό να αναλύσουμε και την ανεύρεση της τάσης αύξησης των κυκλοφορούντων επιπέδων της «5-methyl-2'-deoxycytidine», δείκτη της ολικής DNA μεθυλίωσης, στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά τη λήψη από του στόματος αγωγής, σε σχέση με πριν την έναρξή της. Η μεθυλίωση του DNA έχει αναδειχθεί ότι σχετίζεται με μεταγραφική καταστολή (77, 124), ενώ τα νουκλεοσιδικά ανάλογα εμποδίζουν την ιική μεταγραφή, παρεμβαίνοντας στον ενδογενή μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων (125). Ως συνέπεια, η τάση αύξησης των επιπέδων της «5-methyl-2'-deoxycytidine» στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά τη λήψη νουκλεοσιδικών αναλόγων, μπορεί να οφείλεται στην καταστολή της ιικής αντιγραφής.

Επιπλέον, όπως ήδη έχει αναφερθεί δεν παρατηρήθηκε κάποια ουσιαστική και σημαντική διαφορά στα επίπεδα του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA και της «5-methyl-2'-deoxycytidine» ανάμεσα σε φορείς και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά την λήψη από του στόματος θεραπείας, ένα εύρημα το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι βιοχημικοί παράμετροι, οι οποίοι σχετίζονται με τη αποτύπωση της φλεγμονής είναι παρόμοιοι σε αυτές τις δύο υπό μελέτη ομάδες και το ικό φορτίο είναι χαμηλό (25).

Περιορισμοί της μελέτης

Η συγκεκριμένη μελέτη, ωστόσο, έχει κάποιους συγκεκριμένους περιορισμούς. Ανάμεσα σε αυτούς είναι ότι αποτελεί μία μελέτη προερχόμενη από μόνο ένα κέντρο αναφοράς, η σχετικά μικρή διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών μας και επίσης ο αριθμός των ατόμων της μελέτης, ειδικά όσον αφορά τους ασθενείς μετά τη λήψη από του στόματος αγωγής, ο οποίος είναι σχετικά περιορισμένος. Επιπλέον, πρόκειται για μελέτη σε Καυκάσιους ασθενείς, οπότε τα συμπεράσματα μας δε θα μπορούσαν να γενικευτούν σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β με προέλευση από την ευρύτερη περιοχή της Ασίας. Ωστόσο, αυτή η μελέτη θα μπορούσε να αποτελέσει το εφαλτήριο για περαιτέρω πολυκεντρικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, έτσι ώστε να αναδειχθούν περισσότερα δεδομένα πάνω σε αυτό το ενδιαφέρον επιστημονικό ζήτημα.

E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τόσο τα επίπεδα του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA, όσο και της «5-methyl-2'-deoxycytidine», που αποτελεί δείκτη της ολικής DNA μεθυλίωσης και τα οποία μελετήθηκαν μέσω της «υγρής βιοψίας» θα μπορούσαν να:

- Αποτελέσουν ενδεχομένως χρήσιμους βιοδείκτες για την παρακολούθηση της δραστηριότητας του ιού της ηπατίτιδας B στα ηπατοκύτταρα των ασθενών και σε επίπεδο επιγενετικής.
- Αποτελέσουν δείκτες παρακολούθησης της αντικής θεραπείας που εφαρμόζεται σε HBeAg-αρνητικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B.

Πιο συγκεκριμένα, με αυτή τη μελέτη αναδείχθηκαν τα εξής:

- Υπάρχουν ενδείξεις παρουσίας αυξημένης γήρανσης των ηπατοκυττάρων στους HBeAg-αρνητικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B χωρίς λήψη από του στόματος αγωγής σε σχέση με τους φορείς του ιού.
- Η χορήγηση νουκλεοσ(τ)ιδικών αναλόγων στους HBeAg-αρνητικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B είναι πιθανόν να ενισχύει το μηχανισμό της κυτταρικής απόπτωσης και συγκεκριμένα της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων.
- Η αυξημένη ολική μεθυλίωση που αναδείχθηκε στους HBeAg-αρνητικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B μετά τη χορήγηση νουκλεοσ(τ)ιδικών αναλόγων θα μπορούσε να είναι ενδεικτική της καταστολής της ιικής αντιγραφής του ιού της ηπατίτιδας B.

Ωστόσο, περαιτέρω επιστημονική έρευνα απαιτείται για την επικύρωση αυτών των αποτελεσμάτων.

V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπόβαθρο: Η χρόνια λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας Β αποτελεί ένα σοβαρό ιατρικό ζήτημα παγκοσμίως. Το ελεύθερο κυττάρου κυκλοφορούν DNA (cfDNA) και η ολική DNA μεθυλίωση, η οποία εκφράζεται με τα κυκλοφορούντα επίπεδα της 5-methyl-2'-deoxycytidine, εφαρμόζοντας την μέθοδο της υγρής βιοψίας, φαίνεται πως σχετίζονται ως τώρα με επιγενετικές μεταβολές και γήρανση. Αυτή η μελέτη στοχεύει στη διερεύνηση των επιπέδων του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA και των επιπέδων της 5-methyl-2'-deoxycytidine στους ορούς ΗΒεΑg-αρνητικών φορέων και ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β, χωρίς θεραπεία, αλλά και μετά την εφαρμογή της.

Μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκαν οροί από ένα σύνολο 61 ασθενών, μεταξύ των οποίων φορείς και ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, χωρίς και μετά την εφαρμογή από του στόματος θεραπείας, με αντικειμενικό σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA και των επιπέδων της 5-methyl-2'-deoxycytidine.

Αποτελέσματα: Η συγκέντρωση του ελεύθερου κυττάρου κυκλοφορούντος DNA αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά μετά τη χορήγηση θεραπείας στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε σχέση με προ θεραπείας (15 vs 10 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.022$). Μία σημαντική τάση αυξημένων κυκλοφορούντων επιπέδων της 5-methyl-2'-deoxycytidine παρατηρήθηκε στους φορείς σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς θεραπεία (211 vs 176 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.089$), ενώ επιπλέον αυξημένη τάση των κυκλοφορούντων επιπέδων της 5-methyl-2'-deoxycytidine παρατηρήθηκε στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά τη χορήγηση θεραπείας σε σχέση με πριν τη λήψη θεραπείας (215 vs 173 ng/mL, αντίστοιχα, $p=0.079$).

Συμπεράσματα: Τόσο το ελεύθερο κυττάρου κυκλοφορούν DNA, όσο και τα κυκλοφορούντα επίπεδα της 5-methyl-2'-deoxycytidine, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της δραστηριότητας του ιού της ηπατίτιδας Β στα ηπατοκύτταρα σε επίπεδο επιγενετικής και της απάντησης στη θεραπεία των ΗΒεΑg-αρνητικών ασθενών, αλλά περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προς αυτήν την κατεύθυνση.

VI. SUMMARY

Background: Chronic hepatitis B (CHB) virus infection is a serious medical issue, worldwide. Circulating cell-free DNA (cfDNA) and global DNA methylation, which is expressed as circulating levels of 5-methyl-2'-deoxycytidine, applying the liquid biopsy approach, seem to be linked to epigenetic changes and senescence. This study aims to investigate the levels of circulating cfDNA and 5-methyl-2'-deoxycytidine in HBeAg-negative carriers and CHB infected patients' serums, without and after treatment administration.

Methods: Serum samples from a total of 61 patients, including carriers and CHB patients without and after treatment, were studied in order to quantify the levels of circulating cf-DNA and 5-methyl-2'-deoxycytidine.

Results: Circulating cfDNA concentration was significantly increased following the administration of oral antiviral treatment in CHB patients compared to pre-treatment levels (15 vs 10 ng/mL, respectively, $p=0.022$). A trend was demonstrated towards higher mean levels of circulating 5-methyl-2'-deoxycytidine in carriers as compared to CHB patients without treatment (211 vs 176 ng/mL, respectively, $p=0.089$) and additionally, a tendency for increased 5-methyl-2'-deoxycytidine levels in patients after in comparison to before treatment for CHB (215 vs 173 ng/mL, respectively, $p=0.079$).

Conclusions: Both circulating cf-DNA and circulating levels of 5-methyl-2'-deoxycytidine might be used as markers in order to monitor disease activity in hepatocytes based on epigenetics and response to treatment of chronic HBeAg-negative patients, but further studies are needed towards that direction.

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hatzakis A, Wait S, Bruix J, Buti M, Carballo M, Cavaleri M, et al. The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference*. *J Viral Hepat.* 2011;18 Suppl 1:1-16.
2. Vlachogiannakos J, Papatheodoridis GV. Hepatitis B: Who and when to treat? *Liver Int.* 2018;38 Suppl 1:71-8.
3. Lampertico P, Maini M, Papatheodoridis G. Optimal management of hepatitis B virus infection - EASL Special Conference. *J Hepatol.* 2015;63(5):1238-53.
4. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: natural history and treatment. *Semin Liver Dis.* 2006;26(2):130-41.
5. Papatheodoridis G, Dalekos G, Sypsa V, Yurdaydin C, Buti M, Goulis J, et al. PAGE-B predicts the risk of developing hepatocellular carcinoma in Caucasians with chronic hepatitis B on 5-year antiviral therapy. *J Hepatol.* 2016;64(4):800-6.
6. Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, Janssen HLA, Lau DTY, Locarnini SA, et al. Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4:18035.
7. Papatheodoridis G, Sypsa V, Kantzanou M, Nikolakopoulos I, Hatzakis A. Estimating the treatment cascade of chronic hepatitis B and C in Greece using a telephone survey. *J Viral Hepat.* 2015;22(4):409-15.
8. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015;479-480:672-86.
9. Wei L, Ploss A. Hepatitis B virus cccDNA is formed through distinct repair processes of each strand. *Nat Commun.* 2021;12(1):1591.
10. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004;350(11):1118-29.
11. Guo YH, Li YN, Zhao JR, Zhang J, Yan Z. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics.* 2011;6(6):720-6.
12. Kim H, Lee SA, Do SY, Kim BJ. Precore/core region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J Gastroenterol.* 2016;22(17):4287-96.
13. Lin CL, Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(3):249-55.

14. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(5):a021436.
15. Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, Li X, Li J, Lu MJ. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2016;22(1):126-44.
16. Karayiannis P. Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatol Int.* 2017;11(6):500-8.
17. Tu T, Budzinska MA, Vondran FWR, Shackel NA, Urban S. Hepatitis B Virus DNA Integration Occurs Early in the Viral Life Cycle in an In Vitro Infection Model via Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide-Dependent Uptake of Enveloped Virus Particles. *J Virol.* 2018;92(11).
18. Imam H, Khan M, Gokhale NS, McIntyre ABR, Kim GW, Jang JY, et al. N6-methyladenosine modification of hepatitis B virus RNA differentially regulates the viral life cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(35):8829-34.
19. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.* 2008;48(2):335-52.
20. Stevens CE, Toy P, Kamili S, Taylor PE, Tong MJ, Xia GL, et al. Eradicating hepatitis B virus: The critical role of preventing perinatal transmission. *Biologicals.* 2017;50:3-19.
21. Gomes C, Wong RJ, Gish RG. Global Perspective on Hepatitis B Virus Infections in the Era of Effective Vaccines. *Clin Liver Dis.* 2019;23(3):383-99.
22. Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2).
23. Gish RG, Given BD, Lai CL, Locarnini SA, Lau JY, Lewis DL, et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Res.* 2015;121:47-58.
24. Gish RG, Sollano JD, Jr., Lapasaran A, Ong JP. Chronic hepatitis B virus in the Philippines. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016;31(5):945-52.
25. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, European Association for the Study of the L. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67(2):370-98.

26. Coffin CS, Zhou K, Terrault NA. New and Old Biomarkers for Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology*. 2019;156(2):355-68 e3.
27. Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, Yuen MF. Chronic hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2018;392(10161):2313-24.
28. Smalls DJ, Kiger RE, Norris LB, Bennett CL, Love BL. Hepatitis B Virus Reactivation: Risk Factors and Current Management Strategies. *Pharmacotherapy*. 2019;39(12):1190-203.
29. Mani H, Kleiner DE. Liver biopsy findings in chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2009;49(5 Suppl):S61-71.
30. Romano L, Paladini S, Galli C, Raimondo G, Pollicino T, Zanetti AR. Hepatitis B vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(1):53-7.
31. Qin Y, Liao P. Hepatitis B virus vaccine breakthrough infection: surveillance of S gene mutants of HBV. *Acta Virol*. 2018;62(2):115-21.
32. World Health O. Hepatitis B vaccines: WHO position paper, July 2017 - Recommendations. *Vaccine*. 2019;37(2):223-5.
33. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B: Immunization and Impact on Natural History and Cancer Incidence. *Gastroenterol Clin North Am*. 2020;49(2):201-14.
34. Fanning GC, Zoulim F, Hou J, Bertoletti A. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(11):827-44.
35. Guo Y, Lu H, Xu L, Idris NFB, Li Y, Hu J, et al. The response of hepatitis B virus genotype to interferon is associated with a mutation in the interferon-stimulated response element. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(51):e18442.
36. Menendez-Arias L, Alvarez M, Pacheco B. Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Curr Opin Virol*. 2014;8:1-9.
37. Tacke F, Kroy DC. Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. *Ann Transl Med*. 2016;4(18):334.
38. Papatheodoridis GV. Why do I treat HBeAg-negative chronic hepatitis B patients with nucleos(t)ide analogues? *Liver Int*. 2013;33 Suppl 1:151-6.
39. Gupta N, Goyal M, Wu CH, Wu GY. The Molecular and Structural Basis of HBV-resistance to Nucleos(t)ide Analogs. *J Clin Transl Hepatol*. 2014;2(3):202-11.

40. Lai CJ, Terrault NA. Antiviral therapy in patients with chronic hepatitis B and cirrhosis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2004;33(3):629-54, x-xi.
41. De Clercq E. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochem Pharmacol.* 2016;119:1-7.
42. Lai CL, Wong DK, Wong GT, Seto WK, Fung J, Yuen MF. Rebound of HBV DNA after cessation of nucleos(tide) analogues in chronic hepatitis B patients with undetectable covalently closed. *JHEP Rep.* 2020;2(3):100112.
43. Li YW, Yang FC, Lu HQ, Zhang JS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface protein. *World J Gastroenterol.* 2016;22(6):1943-52.
44. Xie Y. Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1018:11-21.
45. Chaturvedi VK, Singh A, Dubey SK, Hetta HF, John J, Singh MP. Molecular mechanistic insight of hepatitis B virus mediated hepatocellular carcinoma. *Microb Pathog.* 2019;128:184-94.
46. Tan YJ. Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2011;17(44):4853-7.
47. Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S84-S101.
48. Ali A, Abdel-Hafiz H, Suhail M, Al-Mars A, Zakaria MK, Fatima K, et al. Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(30):10238-48.
49. Wei W, Ji S. Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. *J Cell Physiol.* 2018;233(12):9121-35.
50. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 2018;28(6):436-53.
51. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424-35.
52. Dodig S, Cepelak I, Pavic I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Med (Zagreb).* 2019;29(3):030501.
53. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene.* 2013;32(33):3789-97.
54. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018;217(1):65-77.

55. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
56. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1238-46.
57. Zhang W, Ji W, Yang J, Yang L, Chen W, Zhuang Z. Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence. *Life Sci*. 2008;83(13-14):475-80.
58. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179-204.
59. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.
60. Carusillo A, Mussolino C. DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells*. 2020;9(7).
61. Rossiello F, Herbig U, Longhese MP, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;26:89-95.
62. Ou HL, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood*. 2018;131(5):488-95.
63. Heitzer E, Auinger L, Speicher MR. Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living. *Trends Mol Med*. 2020;26(5):519-28.
64. Hu Z, Chen H, Long Y, Li P, Gu Y. The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;157:103166.
65. Jylhava J, Kotipelto T, Raitala A, Jylha M, Hervonen A, Hurme M. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90+ study. *Mech Ageing Dev*. 2011;132(1-2):20-6.
66. Jylhava J, Nevalainen T, Marttila S, Jylha M, Hervonen A, Hurme M. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell*. 2013;12(3):388-97.
67. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.

68. Holdenrieder S, Nagel D, Schalhorn A, Heinemann V, Wilkowski R, von Pawel J, et al. Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137:180-9.
69. Onufriev AV, Schiessel H. The nucleosome: from structure to function through physics. *Curr Opin Struct Biol.* 2019;56:119-30.
70. Hu Z, Chen K, Xia Z, Chavez M, Pal S, Seol JH, et al. Nucleosome loss leads to global transcriptional up-regulation and genomic instability during yeast aging. *Genes Dev.* 2014;28(4):396-408.
71. Kane AE, Sinclair DA. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2019;54(1):61-83.
72. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002;2(2):103-12.
73. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer.* 2012;130(8):1715-25.
74. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:685-705.
75. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv.* 2016;2(7):e1600584.
76. Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet.* 2018;392(10149):777-86.
77. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):23-38.
78. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25(10):1010-22.
79. Misawa T, Tanaka Y, Okada R, Takahashi A. Biology of extracellular vesicles secreted from senescent cells as senescence-associated secretory phenotype factors. *Geriatr Gerontol Int.* 2020;20(6):539-46.
80. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019;8(7).
81. Wallis R, Mizen H, Bishop CL. The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype. *Mech Ageing Dev.* 2020;189:111263.

82. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. *Mol Aspects Med.* 2018;60:92-103.
83. Xu D, Tahara H. The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(3):368-75.
84. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1208-15.
85. Schmeer C, Kretz A, Wengerodt D, Stojiljkovic M, Witte OW. Dissecting Aging and Senescence-Current Concepts and Open Lessons. *Cells.* 2019;8(11).
86. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY).* 2016;8(1):3-11.
87. Teo YV, Capri M, Morsiani C, Pizza G, Faria AMC, Franceschi C, et al. Cell-free DNA as a biomarker of aging. *Aging Cell.* 2019;18(1):e12890.
88. Mahmood W, Erichsen L, Ott P, Schulz WA, Fischer JC, Arauzo-Bravo MJ, et al. Aging-associated distinctive DNA methylation changes of LINE-1 retrotransposons in pure cell-free DNA from human blood. *Sci Rep.* 2020;10(1):22127.
89. Reddy PH, Williams J, Smith F, Bhatti JS, Kumar S, Vijayan M, et al. MicroRNAs, Aging, Cellular Senescence, and Alzheimer's Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;146:127-71.
90. Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med.* 2018;23(1):50.
91. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):e493-503.
92. Khandia R, Munjal A. Interplay between inflammation and cancer. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2020;119:199-245.
93. Ren JL, Pan JS, Lu YP, Sun P, Han J. Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cell Signal.* 2009;21(3):378-83.
94. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun.* 2016;7:11190.
95. Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine.* 2017;21:21-8.

96. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell*. 2017;169(6):1000-11.
97. Short S, Fielder E, Miwa S, von Zglinicki T. Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine*. 2019;41:683-92.
98. Domaszewska-Szostek A, Puzianowska-Kuznicka M, Kurylowicz A. Flavonoids in Skin Senescence Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13).
99. Kang C. Senolytics and Senostatics: A Two-Pronged Approach to Target Cellular Senescence for Delaying Aging and Age-Related Diseases. *Mol Cells*. 2019;42(12):821-7.
100. Martel J, Ojcius DM, Wu CY, Peng HH, Voisin L, Perfettini JL, et al. Emerging use of senolytics and senomorphics against aging and chronic diseases. *Med Res Rev*. 2020;40(6):2114-31.
101. Xiao M, Chen W, Wang C, Wu Y, Zhu S, Zeng C, et al. Senescence and cell death in chronic liver injury: roles and mechanisms underlying hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*. 2018;9(9):8772-84.
102. Karakousis ND, Papatheodoridi A, Chatzigeorgiou A, Papatheodoridis G. Cellular senescence and hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: An intriguing link. *Liver Int*. 2020;40(12):2917-27.
103. Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, et al. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene*. 2001;20(28):3620-8.
104. Idrissi ME, Hachem H, Koering C, Merle P, Thenoz M, Mortreux F, et al. HBx triggers either cellular senescence or cell proliferation depending on cellular phenotype. *J Viral Hepat*. 2016;23(2):130-8.
105. Kim YJ, Jung JK, Lee SY, Jang KL. Hepatitis B virus X protein overcomes stress-induced premature senescence by repressing p16(INK4a) expression via DNA methylation. *Cancer Lett*. 2010;288(2):226-35.
106. Park SH, Jung JK, Lim JS, Tiwari I, Jang KL. Hepatitis B virus X protein overcomes all-trans retinoic acid-induced cellular senescence by downregulating levels of p16 and p21 via DNA methylation. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 6):1309-17.
107. Piciocchi M, Cardin R, Cillo U, Vitale A, Cappon A, Mescoli C, et al. Differential timing of oxidative DNA damage and telomere shortening in hepatitis C and B virus-related liver carcinogenesis. *Transl Res*. 2016;168:122-33.

108. Tachtatzis PM, Marshall A, Aravinthan A, Verma S, Penrhyn-Lowe S, Mela M, et al. Correction: Chronic Hepatitis B Virus Infection: The Relation between Hepatitis B Antigen Expression, Telomere Length, Senescence, Inflammation and Fibrosis. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134315.
109. Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, Chang WW, Lei HY, Lai MD, et al. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2004;25(10):2023-32.
110. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, European Association for the Study of the L. *EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*. 2018;69(1):182-236.
111. Papatheodoridi A, Chatzigeorgiou A, Chrysavgis L, Lembessis P, Loglio A, Facchetti F, et al. Circulating cell-free DNA species affect the risk of hepatocellular carcinoma in treated chronic hepatitis B patients. *J Viral Hepat*. 2021;28(3):464-74.
112. Gong B, Xue J, Yu J, Li H, Hu H, Yen H, et al. Cell-free DNA in blood is a potential diagnostic biomarker of breast cancer. *Oncol Lett*. 2012;3(4):897-900.
113. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-90.
114. Ding SC, Lo YMD. *Cell-Free DNA Fragmentomics in Liquid Biopsy*. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(4).
115. Goncalves E, Goncalves-Reis M, Pereira-Leal JB, Cardoso J. DNA methylation fingerprint of hepatocellular carcinoma from tissue and liquid biopsies. *Sci Rep*. 2022;12(1):11512.
116. Kay J, Thadhani E, Samson L, Engelward B. Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2019;83:102673.
117. Zhao Z, Dong Q, Liu X, Wei L, Liu L, Li Y, et al. Dynamic transcriptome profiling in DNA damage-induced cellular senescence and transient cell-cycle arrest. *Genomics*. 2020;112(2):1309-17.
118. Sieben CJ, Sturmlechner I, van de Sluis B, van Deursen JM. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol*. 2018;28(9):723-37.
119. Ishida T, Ishida M, Tashiro S, Takeishi Y. DNA Damage and Senescence-Associated Inflammation in Cardiovascular Disease. *Biol Pharm Bull*. 2019;42(4):531-7.

120. Tachtatzis PM, Marshall A, Arvinthan A, Verma S, Penrhyn-Lowe S, Mela M, et al. Chronic Hepatitis B Virus Infection: The Relation between Hepatitis B Antigen Expression, Telomere Length, Senescence, Inflammation and Fibrosis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127511.
121. Sidler C, Woycicki R, Kovalchuk I, Kovalchuk O. WI-38 senescence is associated with global and site-specific hypomethylation. *Aging (Albany NY)*. 2014;6(7):564-74.
122. Park IY, Sohn BH, Yu E, Suh DJ, Chung YH, Lee JH, et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1476-94.
123. Sampath D, Rao VA, Plunkett W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene*. 2003;22(56):9063-74.
124. Bogdanovic O, Lister R. DNA methylation and the preservation of cell identity. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;46:9-14.
125. Pastor-Anglada M, Cano-Soldado P, Molina-Arcas M, Lostao MP, Larrayoz I, Martinez-Picado J, et al. Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res*. 2005;107(2):151-64.