

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Παθολογική Κλινική και Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



Διευθυντής: Καθηγητής ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ν. ΝΤΑΛΕΚΟΣ

Διδακτορική Διατριβή

**«Ο ρόλος των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών
μηχανισμών σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες»**

ΜΠΑΚΑΡΟΖΗ ΜΑΡΙΑ

Ειδικευόμενη Ιατρός Πανεπιστημιακής Παθολογικής κλινικής

Λάρισα, 2015

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο – ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

© 2015 Μπακαρόζη Μαρία

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή (8^η /12-5-2015 ΓΣΕΣ)

Ειρήνη Ι. Ρηγοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Π.Θ

(Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Επιβλέπουσα)

Γεώργιος Ν. Νταλέκος, Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ

Δημήτριος Π. Μπόγδανος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ

Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Π.Θ

Καλλιόπη Ζάχου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Π.Θ

Κωνσταντίνος Π. Μακαρίτσης, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ

Νικόλαος Γατσέλης, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Πανεπιστημιακής Παθολογικής κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και έχει συγχρηματοδοτηθεί από το Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II, επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Για την ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής αισθάνομαι την υποχρέωση κατ' αρχήν να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γ. Ν. Νταλέκο ο οποίος με εμπιστεύτηκε να εκπαιδευτώ στο ερευνητικό του εργαστήριο και έτσι να ανακαλύψω τον κόσμο της Ηπατολογίας. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διατριβής μου, την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ε. Ρηγοπούλου για την αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγηση σ' όλη τη πορεία της διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Π. Μπόγδανο για τις ευκαιρίες εκπαίδευσης στην ιατρική έρευνα που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους συναδέλφους ιατρούς, βιολόγους και παρασκευαστές με τους οποίους συνεργάστηκα στο ερευνητικό εργαστήριο και ιδιαίτερα τον ιατρό κ. Ηλία Σπύρου και τον βιολόγο κ. Αθανάσιο Μαυρόπουλο για την εκμάθηση και επιτέλεση διαφόρων τεχνικών.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου και τον σύζυγό μου για την αμέριστη υποστήριξη, κατανόηση και υπομονή καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές πληροφορίες

Όνοματεπώνυμο: Μπακαρόζη Μαρία
Ημερομηνία Γέννησης: 9 Νοεμβρίου 1984
Τόπος Γέννησης: Λάρισα
Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμη
Διεύθυνση: Χατζηαναγνώστου 23-25, Λάρισα, 41335
Τηλέφωνο: +302413501513
e-mail: mabakaro@med.uth.gr
Ξένες Γλώσσες : Αγγλικά (Άριστα)

Εκπαίδευση - Έρευνα

- Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2002-2008)
- Παρακολούθηση των 1^ο-7^ο Ετήσιων Μετεκπαιδευτικών Προγραμμάτων Μαθημάτων της Παθολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2008 ως σήμερα)
- Υποψήφια Διδάκτορας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2009 έως σήμερα)
- Συμμετοχή στις εργασίες του Εξωτερικού Ηπατολογικού Ιατρείου της Παθολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2009-2011)
- Εκπαίδευση ως Υποψήφια Διδάκτορας και συμμετοχή στις εργασίες του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Παθολογικής κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2009 έως σήμερα)

Εργασία

- Εκπλήρωση υπηρεσίας υπαίθρου ως Αγροτικός Ιατρός στο Κέντρο Υγείας Φαρσάλων και στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (2011-2012)
- Ειδικευόμενη Ιατρός στην Παθολογική κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2012 έως σήμερα)

Συμμετοχές σε συνέδρια - μετεκπαιδευτικά προγράμματα

- Ανακοίνωση στο 12^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος (2006) με θέμα «Τραυματισμοί άνω άκρου από έγχυση τοξικών ουσιών»
- Ανακοίνωση στο 2^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδας (2010) με θέμα «Προσδιορισμός των πρόσφατα μεταναστευσάντων από τον θύμο CD4» Τ λεμφοκυττάρων (CD4⁺ Recent Thymic Emigrants, RTEs) με κυτταρομετρία ροής».
- Ανακοινώσεις στο 5^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδας (2013) με θέματα τα «Επιδημία λοίμωξης από *Fusarium* σε μη ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς της Παθολογικής κλινικής» και «Ιδιοπαθές Υπερρωσινόφιλο σύνδρομο»
- Συμμετοχή ως εκπαιδευτής στο 5^ο και 6^ο Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Πρόγραμμα Μαθημάτων της Παθολογικής κλινικής του Π.Θ (2012-2014)
- Ανακοίνωση με θέμα «Ο ρόλος του σηματοδοτικού δρόμου της p38 ενεργοποιημένης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen-activated

protein kinase (p38 MAPK)) στη φυσική πορεία της χρόνιας HBV λοίμωξης»,
14^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο (2015).

Δημοσιεύσεις

- Injection injuries: seemingly minor injuries with major consequences, Hippokratia 2008, 12(1):33-6. Dailiana HZ, Kotsaki D, Varitimidis S, Moka S, **Bakarozi M**, Oikonomou K, Malizos NK
- Predicting short-term mortality in patients with pulmonary embolism: a simple model. Am J Med Sci. 2013;345(6):462-9. Papaioannou AI, Kastanis A, Malli F, Zakynthinos E, Minas M, **Bakarozi M**, Moka S, Zintzaras E, Gourgoulianis KI, Daniil Z.
- Cutaneous infection caused by Bacillus anthracis in Larissa, Thessaly, Central Greece, July 2012. Euro Surveill. 2012;17(32) Stefos A, Gatselis N, Goudelas A, **Bakarozi M**, Papaparaskevas J, Dalekos G, Petinaki E.

Βραβεία

- Βραβείο για την συμμετοχή στο 12^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος (2006) με θέμα «Τραυματισμοί άνω άκρου από έγχυση τοξικών ουσιών»
- 1^ο Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης για την εργασία με θέμα «Ο ρόλος του σηματοδοτικού δρόμου της p38 ενεργοποιημένης από

μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen-activated protein kinase (p38 MARK)) στη φυσική πορεία της χρόνιας HBV λοίμωξης», 14^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Κως, Μάιος 2015.

Υποτροφίες

- Η διδακτορική διατριβή με τίτλο «Ο ρόλος των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μηχανισμών σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες» έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο – ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

**«Ο ρόλος των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών
μηχανισμών σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες»**

ΜΠΑΚΑΡΟΖΗ ΜΑΡΙΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ειρήνη Ι. Ρηγοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Π.Θ (Επιβλέπουσα)

Γεώργιος Ν. Νταλέκος, Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ

Δημήτριος Π. Μπόγδανος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	15
Κεφάλαιο Α.....	16
1. Επιδημιολογία της ηπατίτιδας Β.....	16
2. Μετάδοση.....	18
2.1 Παρεντερική μετάδοση.....	18
2.2 Κάθετη μετάδοση.....	19
2.3 Μετάδοση με τη σεξουαλική επαφή.....	20
2.4 Ενδονοσοκομειακή μετάδοση.....	21
3. Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV).....	21
3.1 Ανακάλυψη και ταξινόμηση.....	21
3.2 Μοριακή δομή του HBV.....	22
3.2.1 Οι πρωτεΐνες του φακέλου ή αντιγόνο επιφανείας (HBsAg).....	24
3.2.2 Πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου.....	24
3.2.3 Η πρωτεΐνη Χ.....	25
3.2.4 Η DNA πολυμεράση του ιού.....	26
3.3 Πολλαπλασιασμός του HBV.....	26
3.4 Ορότυποι και γονότυποι του HBV.....	27
4. HBV λοίμωξη – φυσική ιστορία.....	29
4.1 Οξεία ηπατίτιδα Β.....	29
4.2 Χρόνια ηπατίτιδα Β.....	31
4.3 Διάγνωση της HBV λοίμωξης.....	35
4.4 Εξωηπατικές εκδηλώσεις της HBV λοίμωξης.....	38

4.5	Λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας D.....	40
4.6	Θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας B.....	42
Κεφάλαιο Β.....		47
1.	Βασικές αρχές ανοσιακής απάντησης.....	47
2.	Αρχέγονη ή πρώιμη (innate) και προσαρμοστική ή ειδική (adaptive) ανοσιακή απάντηση στην HBV λοίμωξη.....	48
2.1	Κυτταρική ανοσιακή απάντηση στην HBV λοίμωξη.....	48
2.1.1	Πρώιμη ανοσιακή απάντηση στην HBV λοίμωξη.....	49
2.1.2	T κυτταρική ανοσιακή απάντηση στην HBV λοίμωξη	50
2.1.3	CD8+ T κυτταρική απάντηση.....	51
2.1.4	CD4+ T κυτταρική απάντηση.....	54
2.1.5	NK κύτταρα στην HBV λοίμωξη.....	55
3.	p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK).....	57
3.1	MAPKs.....	57
3.2	p38 MAPKs.....	59
3.2.1	Οι ισομορφές της p38 MAPK.....	59
3.2.2	Η σηματοδοτική οδός της p38 MAPK.....	61
3.2.3	Ο αναστολέας της p38 MAPK.....	63
3.2.4	p38 MAPK και ανοσιακή απάντηση.....	64
3.2.5	p38 MAPKs και HBV λοίμωξη.....	65

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	69
Εισαγωγή.....	70
1. Ασθενείς.....	73
1.1 Ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β.....	73
2. Μέθοδοι.....	77
Πειράματα σε μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος.....	77
2.1 Απομόνωση, ψύξη και απόψυξη των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)...	77
2.2 Διεγέρτες.....	79
2.3 Καλλιέργειες των PBMCs παρουσία μη ειδικών διεγερτών για την ανάλυσή τους σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής.....	80
2.4 Προσδιορισμός της ενεργοποίησης της p38 MAPK και της σχετιζόμενης με αυτήν έκφρασης κυτταροκινών με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry analysis).....	81
2.5 Καλλιέργεια PBMCs για τον προσδιορισμό στη συνέχεια της παραγωγής IFN-γ παρουσία ή μη αναστολέα της p38 MAPK, SB203540 με τη μέθοδο ELISpot.....	83
2.6 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISpot).....	84
2.7 Καλλιέργειες PBMCs για τον προσδιορισμό στη συνέχεια της παραγωγής IFN-γ με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203540 με τη μέθοδο της ELISA.....	85

2.8 Προσδιορισμός με ELISA της παραγωγής IFN-γ σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών PBMCs με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203540.....	86
3. Στατιστική ανάλυση.....	87
4. Αποτελέσματα.....	88
4.1 Κινητική της ενεργοποίησης της p38 MAPK σε σχέση με το χρόνο επώασης των κυττάρων.....	88
4.2 Ενεργοποίηση της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs στους τρεις υπό μελέτη πληθυσμούς.....	92
4.3 Ενεργοποίηση της p38 MAPK σε υποπληθυσμούς κυττάρων στους τρεις υπό μελέτη πληθυσμούς.....	96
4.4 Ενεργοποίηση της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs και στους επιμέρους υποπληθυσμούς αυτών, στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη πριν και μετά την έναρξη της αντι-ϊικής αγωγής.....	106
4.5 Ενεργοποίηση της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs και στους επιμέρους υποπληθυσμούς αυτών στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη πριν και μετά την έναρξη της αντι-ϊικής αγωγής- σύγκριση μεταξύ αγωγής με PEG-IFN-α και νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα.....	110
4.6 Προσδιορισμός της ενδοκυττάριας έκφρασης IFN-γ στα PBMCs με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής	125
4.7 Προσδιορισμός της παραγωγής της IFN-γ με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISpot με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203540.....	128

4.8 Παραγωγή IFN-γ σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών PBMCs με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203540.....	130
Συζήτηση.....	136
Βιβλιογραφία.....	145
Περίληψη.....	161
Abstract.....	164

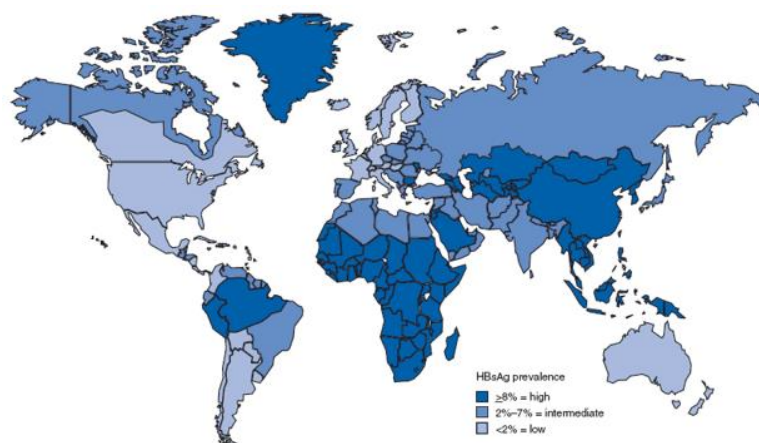
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

1. Επιδημιολογία της ηπατίτιδας Β

Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) αποτελεί σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε παγκόσμια κλίμακα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας υπολογίζεται ότι 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί από τον HBV από τους οποίους 350 εκατομμύρια έχουν χρόνια ηπατίτιδα Β ενώ περίπου 800.000 πεθαίνουν ετησίως από τις μακροχρόνιες επιπλοκές της λοίμωξης [World Health Organization (WHO) 2015].

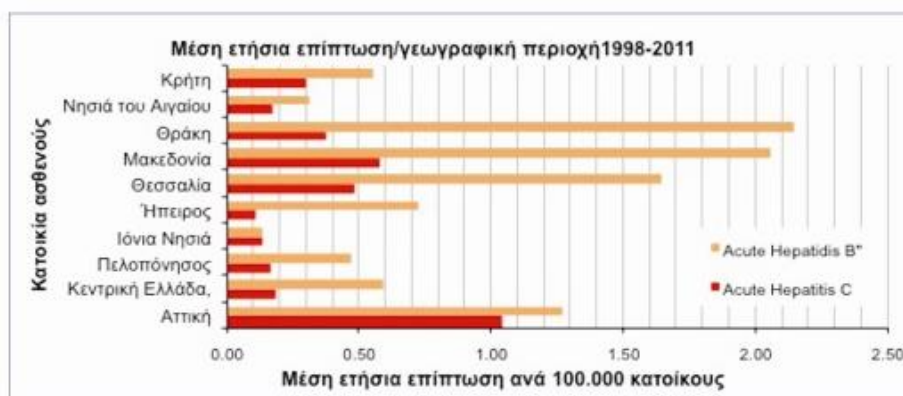
Ο επιπολασμός της λοίμωξης διαφέρει μεταξύ των χωρών της υφής. Σχεδόν όλη η Αφρική, περιοχές της Νότιας Αμερικής, η Αλάσκα, ο Βόρειος Καναδάς, η Ανατολική Ευρώπη, περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου, η Νοτιο-Ανατολική Ασία και η Κίνα αποτελούν περιοχές με υψηλή ενδημικότητα της λοίμωξης (εικόνα 1). Στις περισσότερες από αυτές τις χώρες περίπου το 5-15% του πληθυσμού είναι χρόνιοι φορείς του ιού [1-4].



Εικόνα 1: Γεωγραφική κατανομή της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV)

ανά τη υφήλιο, 2006 (πηγή: CDC)

Η Ελλάδα ανήκει στις χώρες με ενδιάμεση ενδημικότητα της νόσου με ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ διαφόρων περιοχών και πληθυσμών της χώρας από 3-5% μέχρι 7,2% [5]. Η ένταξη του εμβολιασμού έναντι του HBV στο Εθνικό πρόγραμμα υποχρεωτικού εμβολιασμού της χώρας συνέβαλε στη μείωση της επίπτωσης του HBsAg στο γενικό πληθυσμό σε ποσοστά της τάξεως από 0,29% έως 2,6%. Η είσοδος, ωστόσο, στην χώρα μεταναστών από χώρες με υψηλή ενδημικότητα για τον HBV (Αλβανία, Ανατολική Τουρκία, Ασία) αναμένεται να οδηγήσει σε αλλαγές στα επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης στην Ελλάδα. Ενδεικτικά αναφέρεται πως σύμφωνα με δεδομένα του ΚΕΕΛΠΟ οι περιοχές της Θεσσαλίας και Κεντρικής Μακεδονίας εμφανίζουν αυξημένη μέση ετήσια επίπτωση της οξείας HBV λοίμωξης την περίοδο 1998-2011, γεγονός που αποδόθηκε στη παρουσία ειδικών πληθυσμιακών ομάδων και συγκεκριμένα των μουσουλμάνων, αθιγγάνων και αλλοδαπών (εικόνα 2) [5-8].



Εικόνα 2: Μέση ετήσια επίπτωση της οξείας HBV λοίμωξης ανά γεωγραφική περιοχή κατά το διάστημα 1998-2011 στην Ελλάδα (πηγή: ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012)

2. Μετάδοση

Ο HBV ανευρίσκεται σχεδόν σε όλα τα βιολογικά υγρά των ασθενών με ηπατίτιδα Β όπως το σάλιο, τα δάκρυα, τις κολπικές εκκρίσεις και το σπέρμα, τα οποία είναι λιγότερο μολυσματικά σε σύγκριση με το αίμα και τα παράγωγα του, όπως προκύπτει από μελέτες στις οποίες έγινε ένεση των ανωτέρω βιολογικών υγρών σε διάφορα πειραματικά μοντέλα. Οι κύριοι τρόποι μετάδοσης του ιού είναι: η παρεντερική, η κάθετη, η μετάδοση μέσω σεξουαλικής επαφής και η ενδονοσοκομειακή μετάδοση [3-4]. Ο τρόπος μετάδοσης του ιού σχετίζεται με την ενδημικότητα της νόσου καθώς στις χώρες της Άπω Ανατολής και τις υπο-Σαχάριες χώρες, όπου σημειώνεται υψηλός επιπολασμός της νόσου, η κύρια οδός μετάδοσης της λοίμωξης είναι η κάθετη, ενώ στον Δυτικό κόσμο ο HBV μεταδίδεται κυρίως μέσω της σεξουαλικής επαφής και της επαγγελματικής έκθεσης [3, 9].

2.1 Παρεντερική μετάδοση

Η παρεντερική μετάδοση του HBV περιλαμβάνει τη μετάδοση του ιού μέσω μεταγγίσεων αίματος και των παραγώγων του, την αιμοκάθαρση, την κοινή χρήση μολυσμένων αντικειμένων όπως συρίγγες, ξυραφάκια και οδοντόβουρτσες.

Στο δυτικό κόσμο η μετάδοση του ιού μέσω των μεταγγίσεων αίματος και των παραγώγων του έχει μειωθεί σημαντικά μετά το 1970 και αυτό θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της εφαρμογής ορολογικού ελέγχου των δοτών για τον ιό αλλά και της βελτίωσης των ανωτέρω διαγνωστικών μεθόδων [10-12]. Έτσι ο κίνδυνος λοίμωξης από τον HBV μετά από μετάγγιση αίματος υπολογίζεται σε 1:230000. Αντίθετα η

μετάδοση με τη χρήση μολυσμένων συριγγών μεταξύ των χρηστών ενδοφλέβιων τοξικών ουσιών συνεχίζει να είναι σημαντική στις περιοχές με χαμηλή ενδημικότητα της νόσου. Στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς η συχνότητα της HBV λοίμωξης συνεχίζει να είναι υψηλότερη σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, ενώ ο υψηλότερος επιπολασμός σε αυτή την ομάδα ατόμων παρατηρείται στις χώρες της Μέσης και Άπω Ανατολής [13].

Τέλος η χρήση μη αποστειρωμένων εργαλείων για βελονισμό, τατουάζ, «body piercing» άλλα και ξεπερασμένων θεραπευτικών πρακτικών όπως οι «κοφτές βεντούζες» που συνεχίζουν να εφαρμόζονται στην Ελλάδα, αν και σε μικρότερο βαθμό, αποτελούν μία άλλη οδό παρεντερικής μετάδοσης του HBV στις ενδημικές χώρες για την ηπατίτιδα Β [6].

2.2 Κάθετη μετάδοση

Η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο νεογνό αποτελεί συχνό τρόπο μετάδοσης του HBV στις χώρες της Άπω Ανατολής και τις αναπτυσσόμενες χώρες σε αντίθεση με τη Βόρεια Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη. Υπολογίζεται ότι παγκοσμίως η περιγεννητική μετάδοση του HBV είναι υπεύθυνη για το 21% των θανάτων από τον ιό [3-4].

Αν και ο ακριβής τρόπος που επιτελείται η κάθετη μετάδοση δεν είναι γνωστός, σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα, η πλειοψηφία των λοιμώξεων συμβαίνει κατά τη γέννηση και δε σχετίζονται με το θηλασμό, ενώ μικρό ποσοστό συμβαίνει

κατά την εμβρυική ηλικία και προϋποθέτει διαταραχή του εμβρυομητρικού φράγμου (π.χ. αμνιοκέντηση).

Η πιθανότητα να συμβεί η μόλυνση από τον HBV σχετίζεται με τη παρουσία του HBeAg και τον ενεργό ιϊκό πολλαπλασιασμό καθώς το 90% των μητέρων με HBeAg(+) HBV λοίμωξη μεταδίδουν τη λοίμωξη στα νεογνά τους [14]. Υψηλά είναι τα ποσοστά μετάπτωσης σε χρόνια λοίμωξη από τον HBV στη νεογνική ηλικία, ενώ η ενεργητική και παθητική ανοσοποίηση του νεογνού κατά τη γέννηση το προφυλάσσει από τη μόλυνση από τον ιό σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% [3-4, 14-15].

2.3 Μετάδοση με τη σεξουαλική επαφή

Η μετάδοση με τη σεξουαλική επαφή αποτελεί από τους συχνότερους τρόπους μετάδοσης του HBV στις αναπτυσσόμενες χώρες. Στις χώρες της Λατινικής Αμερικής θεωρείται ο συχνότερος τρόπος μετάδοσης του ιού. Στις ομάδες υψηλού κινδύνου συγκαταλέγονται οι ομοφυλόφιλοι, οι ετεροφυλόφιλοι με πολλαπλούς ερωτικούς συντρόφους, η πρώιμη έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας και οι ερωτικοί σύντροφοι ασθενών με HBV λοίμωξη. Συχνή είναι η HBV λοίμωξη στους HIV ασθενείς δεδομένου του κοινού τρόπου μετάδοσης των δύο ιών [3-4, 16] .

2.4 Ενδονοσοκομειακή μετάδοση

Ο ΗΒV αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες επαγγελματικών νόσων για τους εργαζόμενους στις μονάδες υγείας. Ιατροί, οδοντίατροι, νοσηλευτές, το προσωπικό των εργαστηρίων και οι εργαζόμενοι στις μονάδες αιμοκάθαρσης ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Η άμεση ή έμμεση (μέσω μολυσμένων αντικειμένων) έκθεση στο αίμα και τα παράγωγά του αποτελούν την κύρια οδό μετάδοσης συνήθως από τους ασθενείς στους επαγγελματίες υγείας, ενώ υπάρχουν σπάνιες αναφορές μετάδοσης της ΗΒV λοίμωξης από το προσωπικό στους ασθενείς [17-18]. Ο κίνδυνος λοίμωξης μετά την έκθεση στον ιό εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους όπως το μέγεθος της αιμίας, το είδος της πρακτικής (π.χ. τοποθέτηση φλεβοκαθετήρα), η έκταση του τραύματος κ.ά. Το πλύσιμο των χεριών, η χρήση προστατευτικών μέσων (π.χ. γάντια, μάσκα), η χρησιμοποίηση πλαστικών δοχείων συλλογής αιχμηρών αντικειμένων αποτελούν τα συνιστώμενα μέτρα προφύλαξης από τα διάφορα μεταδιδόμενα νοσήματα.

3. Ο ιός της ηπατίτιδας Β (ΗΒV)

3.1 Ανακάλυψη και ταξινόμηση

Το 1963 η ερευνητική ομάδα του Blumberg ανακάλυψε την παρουσία του επιφανειακού αντιγόνου του ΗΒV (HBsAg) στον ορό ενός αυτόχθονα Αυστραλού, το οποίο τότε ονομάσθηκε από τους ερευνητές Αυστραλιανό αντιγόνο. Ταυτόχρονα ανακαλύφθηκε και το αντισώμα έναντι του επιφανειακού αντιγόνου (anti-HBs). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1970, ο D. S. Dane ανακάλυψε το ιικό σωματίο του ΗΒV

στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κατά την εξέταση δειγμάτων αίματος και ηπατοκύτταρων ασθενών με ηπατίτιδα [19].

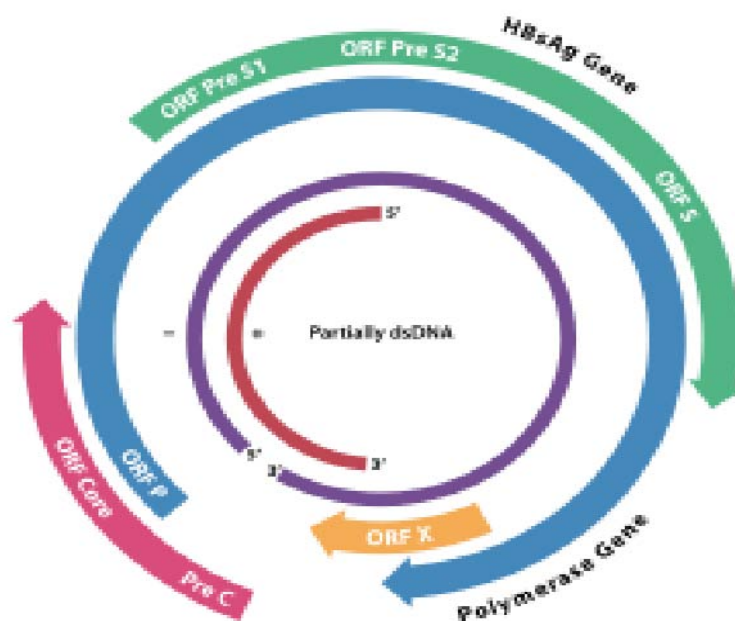
Ο HBV ανήκει στην οικογένεια των *hepadna* ιών, οι οποίοι είναι ηπατοτρόποι DNA ιοί που προκαλούν ηπατίτιδα σε ανθρώπους και ζώα [20]. Έχουν μικρό κυκλικού σχήματος γονιδίωμα, που αποτελείται από δύο αλυσούς. Στην εν λόγω οικογένεια, εκτός του HBV, συμπεριλαμβάνονται ο ιός του δασύτριχου πιθήκου, ο ιός της ηπατίτιδας των τρωκτικών woodchuck, του ερωδιού, της πάπιας Πεκίνου και του σκίουρου εδάφους.

3.2 Μοριακή δομή του HBV

Το ιικό σωματίο του HBV, διαμέτρου 42 nm, αποτελείται από ένα εξωτερικό φάκελο που περιβάλλει το πυρηνοκαψίδιο εντός του οποίου βρίσκεται το γονιδίωμα του ιού. Το γενετικό υλικό του ιού είναι DNA κυκλικού σχήματος αποτελούμενο από περίπου 3200 νουκλεοτίδια, τα οποία είναι οργανωμένα σε δύο αλυσούς, μία αρνητικής κατεύθυνσης και μία ελλιπούς θετικής κατεύθυνσης [19-21]. Το γονιδίωμα αποτελείται από τέσσερα μερικώς αλληλοεπικαλυπτώμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames)—τα *preS/S*, *preC/C*, *P* και *X* - τα οποία εκφράζουν αντίστοιχα: 1) το *PreS/S* (*presurface/ surface*), που κωδικογραφεί τα τρία επιφανειακά αντιγόνα του ιού, την πρωτεΐνη *S* (γνωστή και ως επιφανειακό αντιγόνο-HBsAg), την πρωτεΐνη *M* της οποίας ο ρόλος είναι άγνωστος και την πρωτεΐνη *L* που φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση των ιών στα κύτταρα ξενιστές, 2) το *PreC/C* (*precore/core*), που κωδικογραφεί το πυρηνικό

αντιγόνο της ηπατίτιδας Β (HBcAg) και το e αντιγόνο (HBeAg), 3) το P, που κωδικογραφεί την DNA πολυμεράση του ιού και 4) το X, που κωδικογραφεί την πρωτεΐνη X, η οποία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό και τη διασπορά του ιού.

Κάθε πλαίσιο ανάγνωσης επικαλύπτει τουλάχιστον άλλο ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, ενώ το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της DNA πολυμεράσης επικαλύπτει όλα τα υπόλοιπα. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελεί μέρος τουλάχιστον ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης. Συγκεκριμένα το PreS/S γονίδιο αποτελεί μέρος του PreC/C γονιδίου, ενώ το X γονίδιο επικαλύπτεται με το P γονίδιο. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίζεται η μέγιστη χρήση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδιώματος του ιού και δικαιολογείται η αξιοσημείωτα συμπαγής δομή του ιού [21-24]. Στην παρακάτω εικόνα (**εικόνα 3**) φαίνεται σχηματικά η δομή και οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Β.



Εικόνα 3: Δομή και οργάνωση του γονιδιώματος του HBV [22]

3.2.1 Οι πρωτεΐνες του φακέλου ή αντιγόνο επιφανείας (HBsAg)

Η πρωτεΐνη επιφανείας του HBV που αποτελείται από τη κύρια-s ή μικρή πρωτεΐνη (small, SHB), την προεπιφανειακή πρωτεΐνη 1 ή μεγάλη (large, LHB) και την προεπιφανειακή πρωτεΐνη 2 ή μεσαία (medium, MHB), οι οποίες μαζί με τα λιπίδια του κυττάρου σχηματίζουν το φάκελο του ιού. Εκκρίνονται στον ορό και εκφράζονται κυρίως σε γλυκοζυλιωμένη μορφή.

Η SHB πρωτεΐνη αποτελεί το 85% του επιφανειακού αντιγόνου του ιού της ηπατίτιδας Β (HBsAg) και είναι εκείνη που προκαλεί την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή έναντι του ιού [25]. Η LHB, η οποία αποτελεί περίπου το 10-30% του επιφανειακού αντιγόνου του ιϊκού σωματίου, είναι απαραίτητη για τη λοίμωξη από τον HBV και τη μορφογένεση του ιού [26]. Και οι δύο προεπιφανειακές πρωτεΐνες φαίνεται ότι βοηθούν στην προσκόλληση και την είσοδο του ιού στο ηπατοκύτταρο ενώ η εμφάνισή τους σχετίζεται χρονολογικά με την φάση της αιμίας [20, 22, 25-26].

3.2.2 Πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου

Η preC / C περιοχή κωδικογραφεί το πυρηνικό αντιγόνο και το e αντιγόνο του HBV, που αποτελούν δείκτες ενεργού πολλαπλασιασμού του ιού και υψηλής μεταδοτικότητας της λοίμωξης.

Το πυρηνικό αντιγόνο, που είναι το κύριο δομικό συστατικό του πυρηνικού καψιδίου, χρησιμοποιείται στο σχηματισμό των νέων ιικών σωματιδίων και είναι απαραίτητο στην αναπαραγωγή του ιού. Πρόσφατες δε μελέτες σε πειραματικά

μοντέλα με ποντίκια ανέδειξαν το πυρηνικό αντιγόνο ως σημαντικό παράγοντα για τη κάθαρση του ιού καθώς η απουσία του αναστέλλει την ανάπτυξη της ειδικής έναντι του HBV ανοσολογικής απάντησης [23, 25, 27].

Η μη δομική πρωτεΐνη e παράγεται μετά από την πρωτεολυτική επεξεργασία του αμινικού και καρβοξυλικού άκρου της πρωτεΐνης που κωδικογραφείται από το PreC/C ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης κατά τη πορεία της στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi αντίστοιχα. Ο ρόλος του ευδιάλυτου HBeAg είναι αδιευκρίνιστος. Δεν είναι απαραίτητο για τον ιικό πολλαπλασιασμό και ίσως να βοηθά στη διαφυγή του ιού από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή καθώς φαίνεται να μειώνει την έκφραση του Toll-like υποδοχέα 2 των ηπατοκυττάρων και των μονοκυττάρων οδηγώντας στη μείωση της έκφρασης κυτταροκινών [25-26, 28].

3.2.3 Η πρωτεΐνη X

Η πρωτεΐνη X θεωρείται ότι είναι απολύτως απαραίτητη για τον *in vivo* πολλαπλασιασμό και διασπορά του ιού της ηπατίτιδας Β, καθιστώντας την σημαντική στην παθογένεια του HBV [24-26, 29]. Ρυθμίζει τη μετάφραση γονιδίων τόσο του ιού όσο και του ξενιστή που είναι σημαντικά για τον ιικό πολλαπλασιασμό μέσω υποκινητών διαφόρων γονιδίων όπως ογκογονιδίων, κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, της επιδιόρθωσης του DNA, της απόπτωσης και της κυτταρικής προσκόλλησης.

3.2.4 Η DNA πολυμεράση του ιού

Κωδικογραφείται από το P ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και αποτελείται από τέσσερις περιοχές: την τερματική πρωτεΐνη που ανευρίσκεται στο αμινικό της άκρο και λειτουργεί ως primer (εκκινήτης) για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA του ιού, τον τομέα διαχωρισμού της, την ανάστροφη τρανσκριπτάση που λειτουργεί και ως DNA πολυμεράση και την RNAάση [21-22].

3.3 Πολλαπλασιασμός του HBV

Τα ιικά σωματίδια του HBV προσδένονται σε αδιευκρίνιστους μέχρι τώρα, επιφανειακούς υποδοχείς των κυττάρων ξενιστών και εισέρχονται στο ηπατοκύτταρο. Το πυρηνικό σωματίδιο του ιού εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου το DNA του ιού μετατρέπεται σε ένα ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (cccDNA) το οποίο λειτουργεί ως εκμαγείο για την RNA πολυμεράση του ξενιστή για το σχηματισμό τεσσάρων ιικών RNAs. Τα εν λόγω RNAs μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα και χρησιμοποιούνται σαν mRNAs για τη μετάφραση των πρωτεϊνών του φακέλου, του πυρηνοκαψιδίου, της πρωτεΐνης X και της DNA πολυμεράσης του ιού. Το μεγαλύτερο RNA αποτελεί επίσης εκμαγείο για τον πολλαπλασιασμό του HBV που λαμβάνει χώρα στα νουκλεοκαψίδια στο κυτταρόπλασμα. Ορισμένα από τα σχηματιζόμενα νουκλεοκαψίδια επιστρέφουν στον πυρήνα του ηπατοκυττάρου όπου χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό νέων cccDNAs. Στη συνέχεια μετά από επεξεργασία στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi εξέρχονται από το κύτταρο-ξενιστή [20, 23, 26, 30].

3.4 Ορότυποι και γονότυποι του HBV

Ο ιός HBV διακρίνεται σε 4 μείζονες οροτύπους βάσει των αντιγονικών επιτόπων (adr, adw, ayr, ayw) που αναγνωρίζονται από τις πρωτεΐνες του φακέλου και σε 10 γονοτύπους (A-J) βάσει των μεταλλάξεων στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του γονιδιώματος [31-33]. Οι διαφορές στην αλληλουχία του γονιδιώματος μπορεί να είναι πάνω από 8% κατά την ανάλυση όλου του γονιδιώματος ή πάνω από 4% στην S περιοχή. Οι πρώτοι έξι γονότυποι περιγράφηκαν το 1988 και ακολούθησαν εν συνεχεία οι υπόλοιποι, με τους δύο τελευταίους να έχουν περιγραφεί τα τελευταία τέσσερα χρόνια. Πολλαπλές μελέτες έχουν γίνει στην προσπάθεια καθορισμού της σχέσης μεταξύ οροτύπων και γονοτύπων, αλλά τα αποτελέσματά τους είναι ανεπαρκή εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού αναλύσεων που έχουν πραγματοποιηθεί. Επιπλέον φαίνεται ότι μερικοί ορότυποι μπορούν να ταξινομηθούν σε περισσότερους του ενός γονοτύπους (Πίνακας 1) [31-34].

Πίνακας 1: Συσχέτιση μεταξύ οροτύπων και γονοτύπων HBV [31, 33]

Γονότυποι	Ορότυποι
A	ayw1, adw2
B	ayw1, adw2
C	ayr, adr _q +, adr _q -, adw2
D	ayw2, ayw3
E	ayw4
F	adw4

Οι περισσότεροι γονότυποι, πλέον, υποδιαιρούνται σε υπογονοτύπους, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους κατά τουλάχιστον 4% στην αλληλουχία του γονιδιώματός τους με διακριτά χαρακτηριστικά. Οι γονότυποι αλλά και οι υπογονότυποι, εμφανίζουν διαφορετική γεωγραφική κατανομή (Πίνακας 2) [31-34]. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν σε μεγάλο ποσοστό μελέτες που έχουν γίνει σε Ασιάτες με HBV λοίμωξη, φαίνεται ότι η παρουσία διαφόρων γονοτύπων έχει συσχετιστεί με τη φυσική πορεία της λοίμωξης, τη σοβαρότητα της νόσου, τις πιθανές επιπλοκές καθώς και την ανταπόκριση στη θεραπεία [35-36]. Συγκεκριμένα, ο γονότυπος A σχετίζεται συχνότερα με κάθετη μετάδοση του ιού. Ασθενείς με λοίμωξη από τους γονοτύπους A και B εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά μετάπτωσης σε χρόνια ηπατίτιδα ενώ οι γονότυποι C και D σχετίζονται με εμφάνιση κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος πολύ αργότερα στη πορεία της λοίμωξης σε σύγκριση με τους υπόλοιπους γονοτύπους [35-39]. Όσον αφορά στην ανταπόκριση στην αντιϊκή αγωγή με ιντερφερόνη, μελέτες σε Ασία και Ευρώπη έδειξαν πως οι γονότυποι A και B σχετίζονται με υψηλότερα ποσοστά ορομετατροπής του HBeAg σε σύγκριση με τους οροτύπους C και D [36, 40-41]. Περιορισμένα και αντικρουόμενα είναι τα δεδομένα για την ανταπόκριση στην αγωγή με νουκλεο(σ)ιδικά όπου σε ορισμένες μελέτες φαίνεται πως ο γονότυπος A σχετίζεται με υψηλότερα ποσοστά αντίστασης στη αγωγή με λαμβουδίνη, ενώ σε άλλες δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των γονοτύπων [35-36, 41].

Πίνακας 2: Γεωγραφική κατανομή γονοτύπων HBV [39]

Γονότυποι	Γεωγραφική κατανομή
A	Αφρική, Αμερική, Ινδία, Δυτική Ευρώπη
B	Ασία, ΗΠΑ
C	Ασία, ΗΠΑ
D	Νότια Ευρώπη, Ινδία, ΗΠΑ
E	Δυτική και Νότια Αφρική
F	Κεντρική και Νότια Αμερική
G	Γαλλία, Γερμανία, ΗΠΑ, Κεντρική Αμερική
H	Κεντρική και Νότια Αμερική, ΗΠΑ (Καλιφόρνια)
I	Λάος, Βιετνάμ, Κίνα
J	Νησιά Ρυγκυ, Ιαπωνία

4. HBV λοίμωξη - φυσική ιστορία

4.1 Οξεία ηπατίτιδα Β

Η οξεία ηπατίτιδα Β εκδηλώνεται συνήθως μετά περίοδο επώασης 30-180 ημερών (διάμεση περίοδος 4 εβδομάδες) από τον χρόνο της έκθεσης στον ιό. Μπορεί να διαδράμει αθόρυβα και ο ασθενής να είναι ασυμπτωματικός ή να εμφανίσει γενικά

συμπτώματα όπως γενικευμένη αδυναμία και καταβολή, ανορεξία, ναυτία, εμέτους. Συχνή είναι η εμφάνιση ικτέρου στις 2 πρώτες εβδομάδες από τη μόλυνση, ενώ ο ασθενής μπορεί να παρουσιάσει χαμηλή πυρετική κίνηση. Από την κλινική εξέταση μπορεί να διαπιστωθεί ηπατομεγαλία με συνοδό ευαισθησία στο δεξιό υποχόνδριο καθώς και σπληνομεγαλία. Σπανιότερα ($\approx 1\%$ των περιπτώσεων) η οξεία λοίμωξη από τον HBV μπορεί να οδηγήσει σε οξεία κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια με υψηλά ποσοστά θνητότητας (έως 70%). Οι κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης εξαρτώνται άμεσα από την ηλικία του ασθενούς κατά τη μόλυνση, καθώς μόλις το 1% των νεογνών και 10% των παιδιών ηλικίας 1-5 ετών θα εμφανίσουν συμπτώματα.

Περίπου ένα μήνα μετά τη μόλυνση από τον ιό, το HBV-DNA μπορεί να ανιχνευθεί με την τεχνική της PCR στο περιφερικό αίμα του ασθενούς. Η αύξηση των αμινοτρανσφερασών έπεται της εμφάνισης της ιαιμίας και είναι ενδεικτική της μεσολαβούμενης από τα T λεμφοκύτταρα ανοσιακής απάντησης [20, 25-26]. Η μετάπτωση της λοίμωξης σε χρονιότητα εξαρτάται από 2 βασικές παραμέτρους: την κατάσταση του ανοσολογικού συστήματος και την ηλικία του ασθενούς κατά τη μόλυνση από τον HBV [41, 42]. Έτσι συχνή είναι η μετάπτωση σε χρόνια HBV λοίμωξη στους ανοσοκατεσταλμένους. Όσον αφορά στην ηλικία του ασθενούς κατά τη μόλυνση φαίνεται ότι η πλειοψηφία των ενηλίκων (>90%) που θα μολυνθούν από τον HBV θα εμφανίζουν ορομετατροπή των HBeAg και HBsAg αποκτώντας φυσική ανοσία έναντι του ιού [14, 20, 42-45]. Αντίθετα, η μόλυνση από τον HBV κατά την παιδική ηλικία σχετίζεται με μετάπτωση σε χρονιότητα στο 90% των περιπτώσεων [14-15, 44].

4.2 Χρόνια ηπατίτιδα Β

Η χρόνια HBV λοίμωξη χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση του επιφανειακού αντιγόνου στον ορό των πασχόντων για περισσότερους από 6 μήνες [20, 25, 43-44]. Οι ασθενείς μπορεί να είναι απολύτως ασυμπτωματικοί και η διάγνωση της λοίμωξης να τεθεί στο πλαίσιο τυχαίου εργαστηριακού ελέγχου ή να εμφανίσουν μη ειδικά συμπτώματα όπως γενικευμένη αδυναμία, καταβολή και αρθραλγίες. Σε μικρότερο ποσοστό η διάγνωση μπορεί να τεθεί στο πλαίσιο ελέγχου εξωηπατικών εκδηλώσεων της νόσου όπως η οζώδης πολυαρθρίτιδα, η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα και η κρουσφαιριναιμία. Τέλος σημαντικός είναι ο αριθμός των ασθενών για τους οποίους η διάγνωση της λοίμωξης θα τεθεί με αφορμή την εκδήλωση των απώτερων επιπλοκών της νόσου, όπως η εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων της κίρρωσης ήπατος, της πυλαίας υπέρτασης ή του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [43-44].

Η φυσική ιστορία της χρόνιας HBV λοίμωξης εξαρτάται τόσο από παράγοντες του ξενιστή (ηλικία, φύλο, ανοσολογική κατάσταση) όσο και παράγοντες που σχετίζονται με τον ίδιο τον ιό (πολλαπλασιασμός, μεταλλαγές στο γονιδίωμα) [26, 42].

Η χρόνια HBV λοίμωξη μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερις φάσεις: 1) τη φάση της ανοσοανοχής ή πολλαπλασιασμού, 2) τη φάση της ανοσιακής κάθαρσης ή ορομετατροπής, 3) τη φάση της ενσωμάτωσης ή χρόνιας ανενεργού φορείας και 4) τη φάση της επανενεργοποίησης με αρνητικό HBeAg ή HBeAg αρνητική χρόνια ηπατίτιδα Β [25]. Πιο αναλυτικά:

Κατά τη φάση της ανοσοανοχής ή πολλαπλασιασμού υπάρχει απουσία της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή έναντι ιικών αντιγόνων, που έχει σαν αποτέλεσμα τον υψηλό ιικό πολλαπλασιασμό και απουσία ιστολογικής βλάβης, όπως φαίνεται και από την ύπαρξη φυσιολογικών τιμών αμινοτρανσφερασών. Ορολογικά η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία του HBeAg και υψηλού HBV DNA (τιμές ιικού φορτίου 2×10^6 έως 2×10^7 IU/ml), ενώ όπως προαναφέρθηκε ιστολογικά υπάρχει ελάχιστη ή ήπια ηπατοκυτταρική βλάβη. Ανοσοιστοχημικά το HBcAg ανιχνεύεται μόνο στον πυρήνα των ηπατοκυττάρων. Η διάρκεια της φάσης αυτής κυμαίνεται από μερικούς μήνες έως χρόνια και έχει δειχτεί ότι εξαρτάται από τον HBV γονότυπο, τη φυλή, αλλά και επιδημιολογικούς παράμετρους. Οι μηχανισμοί της ανοσιακής ανοχής δεν είναι απολύτως διευκρινισμένοι [25, 43].

Στη φάση της ανοσιακής κάθαρσης ή ορομετατροπής του HBeAg, το ανοσιακό σύστημα του ξενιστή ενεργοποιείται προκειμένου να καταπολεμήσει τον ιό, οδηγώντας στην παραγωγή κυτταροκινών και τη λύση των προσβεβλημένων ηπατοκυττάρων με αποτέλεσμα την πρόκληση νεκροφλεγμονώδους βλάβης στο ήπαρ [20, 25, 43]. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την προοδευτική μείωση των επιπέδων HBV-DNA, την αύξηση των αμινοτρανσφερασών σε επίπεδα που συχνά μπορεί να φτάσουν αυτά που βλέπουμε στην οξεία ηπατίτιδα (>300 IU/L).

Ορολογικά η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία HBeAg, το οποίο εξαφανίζεται όταν η ανοσολογική απάντηση είναι επιτυχής με τελική έκβαση την ανίχνευση του anti-HBe σε χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από μήνες έως και χρόνια. Η κάθαρση και ορομετατροπή σε anti-HBe συμβαίνει στο 3-12% των ατόμων ετησίως και αυξάνει κατά 2-3 φορές με τη χορήγηση IFN- α [42-44]. Παράγοντες που

σχετίζονται με την κάθαρση του HBeAg είναι η ηλικία του ασθενούς, τα επίπεδα της ALT και ο γονότυπος του ιού [44]. Η μη επιτυχής ανοσιακή απάντηση σχετίζεται με παραμονή του HBeAg με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη της χρόνιας HBeAg θετικής χρόνιας ηπατίτιδας Β, που έχει άσχημη πρόγνωση. Επίσης μπορεί να υπάρχουν αυξημένα επίπεδα anti-HBc IgM τάξης αναλόγα αυτών που ανιχνεύονται στην οξεία HBV λοίμωξη. Ιστολογικά μπορεί να υπάρχει σημαντική ηπατοκυτταρική βλάβη με ίνωση που συχνά η εικόνα μπορεί να είναι συμβατή με κίρρωση. Στη φάση αυτή ανιχνεύεται ανοσοιστοχημικά το HBcAg τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων [25, 43].

Η τρίτη φάση είναι η φάση της ενσωμάτωσης ή της χρόνιας ανενεργούς φορείας κατά την οποία ο HBV είναι ενσωματωμένος στο γενετικό υλικό των ηπατοκυττάρων. Θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα του ελέγχου του ιικού πολλαπλασιασμού από την ανοσολογική απάντηση του συστήματος του ξενιστή. Χαρακτηρίζεται από χαμηλές ή φυσιολογικές τιμές αμινοτρανσφερασών, μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο και ιστολογικά την παρουσία των χαρακτηριστικών ηπατοκυττάρων “ground glass” ή κυττάρων Χατζηγιάννη που περιέχουν επιφανειακά αντιγόνα στο ενδοπλασματικό τους δίκτυο [25, 46]. Σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές οδηγίες για τη θεραπεία της ηπατίτιδας Β, οι ανενεργοί φορείς έχουν επίπεδα HBV-DNA <2000IU/L, ενώ πιο σπάνια ανενεργοί φορείς θεωρούνται και άτομα με σταθερά φυσιολογικές τιμές αμινοτρανσφερασών και επίπεδα HBV-DNA >2000IU/L, αλλά <20000IU/L. Η φάση αυτή της χρόνιας HBV λοίμωξης θεωρείται ότι έχει καλή μακροχρόνια έκβαση με πολύ χαμηλό κίνδυνο ανάπτυξης κίρρωσης και

ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Στην παρούσα φάση μπορεί να παρατηρηθεί απώλεια του HBsAg και ορομετατροπή σε anti-HBs με συχνότητα 1-3% ανά έτος.

Η τελευταία φάση είναι η φάση της επανενεργοποίησης κατά την οποία μέρος των anti-HBe θετικών ανενεργών φορέων (φάση 3^η) επανεμφανίζουν σημαντικό ιικό πολλαπλασιασμό και σαν συνέπεια αυτού προοδευτικά εξελισσόμενη ηπατοκυτταρική βλάβη. Παράλληλα παρατηρείται αύξηση των αμινοτρανσφερασών και σε κάποιους ασθενείς ανίχνευση του anti-HBc IgM τάξης συχνά σε επίπεδα ανάλογα αυτών που παρατηρούνται σε οξεία ηπατίτιδα Β. Συχνά παρατηρείται διαλείπουσα αύξηση των επιπέδων του HBV-DNA και των αμινοτρασφερασών με περιόδους ύφεσης, κατά τις οποίες η διάκριση από αυτή της ανενεργούς φορέας είναι συχνά δύσκολη. Δεδομένου της διαφορετικής πρόγνωσης των ασθενών αυτών, είναι απαραίτητη η προσεκτική παρακολούθηση με προσδιορισμό των αμινοτρασφερασών και του HBV-DNA ανά 3-4 μήνες και για διάρκεια 1 έτους προκειμένου να μπορέσει κανείς να διακρίνει τους ανενεργούς φορείς από αυτούς με anti-HBe θετική χρόνια HBV λοίμωξη.

Η μορφή αυτή θεωρείται ότι αποτελεί την τελική φάση στην φυσική ιστορία της HBV λοίμωξης και ως εκ τούτου παρατηρείται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας από αυτά με HBeAg θετική χρόνια ηπατίτιδα Β. Η γεωγραφική κατανομή της anti-HBe θετικής χρόνιας ηπατίτιδας Β είναι ευρεία και αποτελεί την κύρια μορφή χρόνιας ηπατίτιδας στην περιοχή της Μεσογείου [20, 42]. Η μορφή αυτή της ηπατίτιδας σχετίζεται με την παρουσία σημειακής μετάλλαξης στη θέση 1896 (G → A), που οδηγεί σε αδυναμία παραγωγής του HBeAg, χωρίς όμως να επηρεάζει την ικανότητα πολλαπλασιασμού του ιού [42].

4.3 Διάγνωση της HBV λοίμωξης

Η διάγνωση της HBV λοίμωξης περιλαμβάνει τον προσδιορισμό στον ορό διαφόρων αντιγόνων και αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του ιού (Πίνακας 3). Αναλυτικά:

Το επιφανειακό αντιγόνο (HBsAg) αποτελεί το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο δείκτη για τη διάγνωση της λοίμωξης από τον HBV. Αποτελεί τον πρώτο ιολογικό δείκτη που ανιχνεύεται στον ορό του ασθενούς, συνήθως 4-8 εβδομάδες μετά την έκθεση στον HBV. Στην οξεία ηπατίτιδα Β η παρουσία του προηγείται της αύξησης των αμινοτρανσφερασών και των συμπτωμάτων κατά περίπου 2-6 εβδομάδες, ενώ η παρομονή του στον ορό των ασθενών πάνω από 6 μήνες είναι ενδεικτική της χρόνιας λοίμωξης από τον HBV [20, 44]. Η απουσία του HBsAg δεν αποκλείει την οξεία HBV λοίμωξη σε περιπτώσεις που ο έλεγχος πραγματοποιηθεί πριν τη θετικοποίηση του HBsAg, όταν ο έλεγχος γίνεται μετά την κάθαρσή του, όταν το HBsAg έχει καθιζήσει σε ανοσοσυμπλέγματα (ιδιοπαθής μεικτή κρουσφαιριναιμία) και σε τεχνικό λάθος. Ανιχνεύεται στον ορό με ευαίσθητες ανοσοενζυμικές ή ραδιοανοσομετρικές μεθόδους (χαμηλότερα επίπεδα ανίχνευσης: 0.02-1ng/ml).

Το αντίσωμα έναντι του επιφανειακού αντιγόνου (anti-HBs) είναι ενδεικτικό ανάπτυξης ανοσίας έναντι του HBV. Εμφανίζεται είτε ως αποτέλεσμα της επιτυχούς ανοσιακής απάντησης του ασθενούς μετά από οξεία HBV λοίμωξη με αποτέλεσμα την κάθαρση του ιού και την εξαφάνιση του HBsAg είτε μετά από χορήγηση εμβολίου έναντι του HBV. Η παρουσία τίτλου anti-HBs αντισωμάτων μεγαλύτερο των 10 mIU/ml εξασφαλίζει πλήρη ανοσία έναντι του HBV. Σημειώνεται πως συχνά στη φυσική λοίμωξη από τον HBV μεταξύ της εξαφάνισης του επιφανειακού

αντιγόνου και της εμφάνισης αντισώματος έναντι αυτού μπορεί να μεσολαβεί διάστημα αρκετών εβδομάδων έως και ετών [20].

Το πυρηνικό αντιγόνο (HBcAg) αποτελεί ενδοκυττάριο αντιγόνο και ως επακόλουθο αυτού δεν ανιχνεύεται στον ορό των ασθενών με ηπατίτιδα Β. **Τα αντισώματα έναντι του πυρηνικού αντιγόνου (anti-HBc)** διακρίνονται σε IgM και IgG τάξης. Η παρουσία υψηλού τίτλου IgM anti-HBc αντισωμάτων είναι ενδεικτικά οξείας HBV λοίμωξης, εμφανίζονται στον ορό του ασθενούς μέσα στις πρώτες δύο εβδομάδες μετά την εμφάνιση του HBsAg, ενώ στην περίοδο του «παραθύρου», που ορίζεται το διάστημα από την εξαφάνιση του HBsAg μέχρι την εμφάνιση του anti-HBc αποτελεί τον μοναδικό ορολογικό δείκτη ενδεικτικού οξείας HBV λοίμωξης. Αντίθετα οι ασθενείς που εμφανίζουν φυσική ανοσία μετά την έκθεση στον HBV καθώς και οι ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη εμφανίζουν IgG anti-HBc. Η παρουσία των anti-HBc και IgG anti-HBc αντισωμάτων είναι ενδεικτικά φυσικής ανοσίας έναντι του HBV. Σε ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη σε φάσεις ενεργότητας της νόσου μπορεί να ανιχνευτούν anti-HBc αντισώματα IgM τάξης σε επίπεδα που μπορεί να φτάσουν αυτά που παρατηρούνται σε οξεία HBV λοίμωξη.

Το e αντιγόνο (HBeAg) εμφανίζεται ταυτόχρονα ή λίγο μετά την εμφάνιση του HBsAg. Η εμφάνισή του είναι ενδεικτική υψηλού ιικού πολλαπλασιασμού και υψηλής μολυσματικότητας. Απώλεια του HBeAg είτε αυτόματα στην πορεία της λοίμωξης είτε σαν αποτέλεσμα θεραπευτικής παρέμβασης σχετίζεται με ύφεση του νοσήματος και μείωση του κινδύνου εμφάνισης επιπλοκών (μη αντιρροπούμενη κίρρωση και ηπατοκυτταρικός καρκίνος). Όσον αφορά **το αντίσωμα έναντι του e αντιγόνου (anti-HBe)**, η κάθαρση του HBeAg και η εμφάνιση anti-HBe

πραγματοποιείται μετά την αύξηση των αμινοτρανσφερασών και πριν την εξαφάνιση του HBsAg στην οξεία λοίμωξη ενώ στη χρόνια λοίμωξη είναι ενδεικτικό ύφεσης της χρόνιας νόσου.

Τέλος το **HBV – DNA** που ανιχνεύεται στον ορό των ασθενών αποτελεί δείκτη ενεργού ιικού πολλαπλασιασμού και χρησιμοποιείται στην ενδεχόμενη απόφαση έναρξης αντι-ιικής αγωγής, την εκτίμηση της πορείας της λοίμωξης και της ανταπόκρισης στη θεραπεία [43, 47]. Ο προσδιορισμός του HBV-DNA δεν χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της οξείας HBV λοίμωξης. Στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του HBV-DNA και του βαθμού της ηπατικής βλάβης [47]. Έτσι τα υψηλά επίπεδα του ιικού φορτίου σχετίζονται με αυξημένη έκφραση ιικών αντιγόνων, νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα στο ήπαρ και αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση απώτερων επιπλοκών από την HBV λοίμωξη όπως η εμφάνιση κίρρωσης, ηπατικής ανεπάρκειας και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [44, 47]. Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του HBV-DNA είναι: 1) μέθοδος υβριδισμού υγρής φάσης, 2) η μέθοδος του bDNA και 3) η PCR ή PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR). Η real-time PCR χρησιμοποιείται ευρέως τελευταία και τα βασικά της πλεονεκτήματα είναι η επαναληψιμότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το μεγάλο εύρος ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων σε σχέση με άλλες μεθόδους.

Πίνακας 3: Ορολογικοί δείκτες HBV λοίμωξης και η διαγνωστική ερμηνεία αυτών

[20, 43]

HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	HBeAg	Anti-HBe	Διάγνωση
+	-	IgM+	+	-	Οξεία ηπατίτιδα Β, υψηλή μολυσματικότητα
+	-	IgG+	+	-	HBeAg-θετική χρόνια ηπατίτιδα Β
+	-	IgG+	-	+	HBeAg-αρνητική (precore-μετάλλαξη) ηπατίτιδα Β
+	+	IgG+	+/-	+/-	1. HBsAg ενός υποτύπου και anti-HBs άλλου υποτύπου (σύνηθες) 2. Διαδικασία ορομετατροπής του HBsAg (σπάνιο)
-	-	IgM+	+/-	+/-	Οξεία ηπατίτιδα Β (περίοδος παραθύρου)
-	-	IgG+	-	+/-	Λανθάνουσα HBV λοίμωξη
-	+	IgG+	-	+/-	Παρελθούσα HBV λοίμωξη, φυσική ανοσία
-	+	-	-	-	Εμβολιασμός έναντι της HBV

4.4 Εξωηπατικές εκδηλώσεις της HBV λοίμωξης

Οι ασθενείς με HBV λοίμωξη παρουσιάζουν στο 1-10% αυτών εξωηπατικές εκδηλώσεις. Αυτές περιλαμβάνουν το σύνδρομο που ομοιάζει με αντίδραση ορονοσίας, την οζώδη πολυαρθρίτιδα, τη μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα, τη βλατιδώδη ακροδερματίτιδα της παιδικής ηλικίας καθώς και τις κλινικές εκδηλώσεις στο πλαίσιο της κρουσφαιριναιμίας [48-49].

Το σύνδρομο που ομοιάζει με αντίδραση ορονοσίας πήρε την ονομασία του από τις ομοιότητες που εμφανίζει κλινικά με την αντίδραση ορονοσίας. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση πυρετού, κνίδωσης, μυαλγιών, αρθραλγιών, λεμφαδενοπάθειας και

ήπιας πρωτεϊνουρίας. Εμφανίζεται στην οξεία HBV λοίμωξη με την εκδήλωση του ικτέρου και η κάθαρση του ιού σχετίζεται με τη λύση του συνδρόμου [20].

Η οζώδης πολυαρτηρίτιδα αποτελεί αγγειίτιδα που προσβάλλει τις μεσαίου και μικρού μεγέθους αρτηρίες. Εμφανίζεται συχνότερα στους ενήλικες άνδρες. Στη δεκαετία του 1970 υπολογίζονταν ότι περίπου το 30% των ασθενών με οζώδη πολυαρτηρίτιδα είναι φορείς της ηπατίτιδας Β [50]. Η εφαρμογή των προγραμμάτων εμβολιασμού και των μέτρων πρόληψης οδήγησαν στη μείωση του ποσοστού των ασθενών με οζώδη πολυαρτηρίτιδα που σχετίζεται με τον HBV στο 7% των περιπτώσεων [20, 50-51]. Η παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων που περιέχουν το HBeAg πιθανά να σχετίζονται με την πρόκληση της νόσου. Κλινικά χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση πυρετού και συμπτωμάτων από την προσβολή διαφόρων οργάνων (αρθρώσεις, πεπτικό σύστημα, νεφροί, περιφερικά νεύρα, καρδιά). Η νόσος χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά θνητότητας που μπορεί να φτάσουν το 30% σε μία πενταετία εάν οι ασθενείς δε λάβουν θεραπεία [20].

Η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα αποτελεί τη συχνότερη μορφή εξωηπατικής εκδήλωσης από τους νεφρούς που σχετίζεται με την ηπατίτιδα Β. Στις ενδημικές για την HBV λοίμωξη χώρες εμφανίζεται συχνότερα στα παιδιά σε σύγκριση με τους ενήλικες. Κλινικά εκδηλώνεται με την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας, που συχνά φτάνει στα επίπεδα νεφρωσικού συνδρόμου με τελική κατάληξη τη νεφρική ανεπάρκεια στο 30% περίπου των ασθενών. Ο συνδυασμός της χορήγησης αντικής αγωγής έναντι του HBV και κορτικοστεροειδών φαίνεται ότι μπορεί να αντιμετωπίσει αποτελεσματικά τη νόσο [52-54].

Η μεικτή κρουοσφαιριναιμία αποτελεί σπανιότερη εξωηπατική εκδήλωση της ηπατίτιδας Β σε σύγκριση με την ηπατίτιδα C. Μπορεί να συσχετισθεί με ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις δεδομένης της πολυοργανικής προσβολής, όπως την εμφάνιση πορφυρικού εξανθήματος, αρθραλγιών και προσβολής των νεφρών και του γαστρεντερικού συστήματος [51, 55].

4.5 Λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας D

Ο ιός της ηπατίτιδας D (hepatitis D virus, HDV) είναι ένας δορυφόρος RNA ιός (διάμετρος 36nm) για τον πολλαπλασιασμό του οποίου απαραίτητη είναι η ύπαρξη του HBV. Η πρώτη αναφορά για τον HDV έγινε στα μέσα του 1977 από τον Ιταλό ερευνητή Mario Rizzetto ως ένα πυρηνικό αντιγόνο σε ασθενείς με HBV λοίμωξη [57-59]. Αργότερα, πειράματα σε χιμπατζήδες ανέδειξαν τον HDV ως ένα ανεξάρτητο παθογόνο που απαιτεί την παρουσία του HBV για τον πολλαπλασιασμό του. Ολόκληρο το γονιδίωμα του ιού ταυτοποιήθηκε το 1986 και ονομάστηκε Delta virus.

Παγκοσμίως υπολογίζεται ότι περίπου 20 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί από τον HDV. Η λοίμωξη από τον HDV μπορεί να εμφανιστεί με δύο διαφορετικά πρότυπα: είτε ως ταυτόχρονη λοίμωξη από τους ιούς HBV/HDV (οξεία συν-λοίμωξη) είτε ως λοίμωξη σε ασθενείς που είναι ήδη χρόνιοι φορείς της ηπατίτιδας Β (οξεία επί-λοίμωξη). Στις ενδημικές για την ηπατίτιδα Β χώρες, όπως οι χώρες της Μεσογείου, επικρατεί το πρότυπο της επί-λοίμωξης από τον HDV, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί κλινικά σαν οξεία ηπατίτιδα σε έναν ασυμπτωματικό φορέα της

ηπατίτιδας Β ή σαν έξαρση της υποκείμενης χρόνιας ηπατίτιδας Β, οδηγώντας τελικά σε χρόνια λοίμωξη και από τους δύο ιούς [60]. Στις μη ενδημικές χώρες όπως οι ΗΠΑ και η Βόρεια Ευρώπη επικρατεί το πρότυπο της οξείας συν-λοίμωξης και αφορά κυρίως σε χρήστες ενδοφλέβιων τοξικών ουσιών και αιμορροφιλικούς [61-62]. Στη περίπτωση της συν-λοίμωξης ο HDV προκαλεί πολύ πιο σοβαρή μορφή οξείας ηπατίτιδας σε σύγκριση με τη λοίμωξη μόνο από τον HBV με υψηλά ποσοστά θνητότητας. Παρά τη σοβαρότερη μορφή οξείας ηπατίτιδας, η συν-λοίμωξη από τους 2 ιούς οδηγεί σπανιότερα σε χρονιότητα [62-64].

Η διάγνωση της ηπατίτιδας D τίθεται με την ανεύρεση αντισωμάτων έναντι του HDV (anti-HDV), ενώ η οξεία HDV λοίμωξη επιβεβαιώνεται με την ανίχνευση anti-HDV IgM τάξης. Ο έλεγχος με αντισώματα έναντι του HDV απαιτείται σε όλους τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β. Το επόμενο βήμα μετά την ανεύρεση θετικών αντισωμάτων είναι η μέτρηση του ιικού φορτίου με μοριακές μεθόδους (PCR, HDV-RNA) [60-61].

Προτεινόμενη θεραπεία σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας για την μελέτη του Ήπατος είναι η χορήγηση πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης για τουλάχιστον 48 εβδομάδες, η οποία σχετίζεται με μακροχρόνια ιολογική ανταπόκριση σε ποσοστά που κυμαίνονται από 25-40% [65-67].

Όσον αφορά στις χρόνιες επιπλοκές, οι ασθενείς με χρόνια HBV/HDV λοίμωξη εμφανίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό και πρωιμότερα κίρρωση ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε σύγκριση με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β [44, 62-64]. Σημειώνεται, τέλος, πως η εφαρμογή των προγραμμάτων εμβολιασμού

και συνολικά των μέτρων πρόληψης έναντι της HBV λοίμωξης έχουν μειώσει σημαντικά τον επιπολασμό της ηπατίτιδας D την τελευταία δεκαετία [44].

4.6 Θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας B

Ο ιδεατός στόχος είναι η κάθαρση του HBsAg, η οποία δεν επιτυγχάνεται συχνά με τις διαθέσιμες θεραπείες. Έτσι πιο ρεαλιστικός στόχος της θεραπείας στη χρόνια ηπατίτιδα B θεωρείται η καταστολή του HBV επιτυγχάνοντας μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο ή/και ορομετατροπή του HBeAg στους θετικούς για το HBeAg ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B. Αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα τον περιορισμό της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας στο ήπαρ και την πρόληψη της εμφάνισης ηπατικής ανεπάρκειας στο μέλλον. Απώτεροι στόχοι είναι η πρόληψη της ανάπτυξης κίρρωσης ήπατος και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος με τελικό στόχο την αύξηση της επιβίωσης [42-44].

Οι ενδείξεις για θεραπεία είναι όμοιες στους HBeAg θετικούς και του HBeAg αρνητικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B και καθορίζονται από την συνεκτίμηση των εξής παραμέτρων: τα επίπεδα HBV-DNA, τα επίπεδα αμινοτρανσφεραών και τη σοβαρότητα της ηπατικής νόσου [68]. Συγκεκριμένα ένδειξη για θεραπεία θεωρείται ότι έχουν τα άτομα με HBV-DNA>2000IU/L, επίπεδα αμινοτρανσφερασών μεγαλύτερα του ανώτερου φυσιολογικού και τουλάχιστον μετρίου βαθμού νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και μετρίου βαθμού ίνωση [44, 68]. Πριν την έναρξη και την επιλογή θεραπείας θα πρέπει να εκτιμήσει κανείς και τις παρακάτω παραμέτρους: την ηλικία του ασθενούς, τα συνυπάρχοντα νοσήματα, τη

δυνατότητα συμμόρφωσης στην αγωγή, τα μακροπρόθεσμα οφέλη από αυτήν καθώς και τους πιθανούς κινδύνους συμπεριλαμβανομένων και των παρενεργειών από την εν λόγω θεραπεία [20, 43-44, 47]. Δεδομένου ότι η διαθέσιμη αντιική θεραπεία έχει σημαντικό κόστος, πάντα πρέπει να εκτιμάει κανείς επίσης και τη σχέση κόστους-οφέλους. Οι παράμετροι που λαμβάνει κανείς υπόψη για την εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία είναι η ομαλοποίηση των τιμών της ALT (βιοχημική ανταπόκριση), η μείωση του ιικού φορτίου (ιολογική ανταπόκριση), η εξάλειψη του HBeAg με ή χωρίς συνοδό ορομετατροπή αυτού σε anti-HBe και η βελτίωση της ιστολογικής εικόνας του ήπατος [43-44, 68].

Τα φάρμακα που χορηγούνται για τη θεραπεία της HBV λοίμωξης διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: την ιντερφερόνη και τα νουκλεο(σ)ιδικά ανάλογα.

Ιντερφερόνες:

Για τη θεραπεία της HBV λοίμωξης χρησιμοποιήθηκε αρχικά η κλασική ιντερφερόνη-α και στη συνέχεια η πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-α (Peg-IFN-α). Οι ιντερφερόνες έχουν τόσο αντιική όσο και ανοσοτροποποιητική δράση και οδηγούν σε καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού και σε αναστολή της εξέλιξης της ηπατικής βλάβης. Η Peg-IFN-α πλεονεκτεί έναντι της κλασικής όσον αφορά στο δοσολογικό σχήμα καθώς χορηγείται μία φορά την εβδομάδα ενώ εμφανίζει και υψηλότερα ποσοστά μακροχρόνιας ιολογικής ανταπόκρισης [43-44, 68-69].

Η θεραπεία με ιντερφερόνη έχει βραχεία διάρκεια (συνήθως 1-2 έτη), είναι σε ενέσιμη μορφή που χορηγείται υποδόρια και έχει συχνά παρενέργειες στις οποίες περιλαμβάνονται συμπτώματα που προσομοιάζουν με γριππώδη συνδρομή,

αδυναμία και καταβολή, απώλεια βάρους, αλωπεκία, καταστολή του μυελού των οστών ποικίλης βαρύτητας (αναιμία, θρομβοπενία, λευκοπενία), διαταραχές της θυρεοειδικής λειτουργίας (υπο- ή υπερθυρεοειδισμός) καθώς και εκδηλώσεις από την ψυχική σφαίρα (ευερεθιστότητα, κατάθλιψη, αυτοκτονικό ιδεασμό). Συχνές είναι και οι αναφορές που σχετίζουν τη θεραπεία με ιντερφερόνη με την εκδήλωση αυτοάνοσων διαταραχών.

Νουκλεο(σ)ιδικά ανάλογα (NA):

Τα εν λόγω φάρμακα δρούν αναστέλλοντας τη DNA πολυμεράση του HBV με απώτερο στόχο την καταστολή του πολλαπλασιασμού του ιού. Τα από του στόματος φάρμακα που έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: τα νουκλεοσιδικά ανάλογα [λαμιβουδίνη (LAM), τελμιβουδίνη (TBV) και εντεκαβίρη (ETV)] και τα νουκλεοτιδικά ανάλογα [διπιβαλική αδεφοβίρη (ADV) και δισοπροξική φουμαρική τενοφοβίρη (TDF)]. Τα φάρμακα αυτά χορηγούνται μια φορά την ημέρα καθημερινά και η δοσολογία τους χρειάζεται προσαρμογή στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Η χορήγησή τους πρέπει να γίνεται μακροχρόνια ή εφ' όρου ζωής δεδομένου ότι η διακοπή τους συνοδεύεται από υποτροπή της ιαμίας στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Στα μειονεκτήματα είναι η πιθανότητα εμφάνισης ικής αντοχής με την παρατεινόμενη χρήση τους που κυρίως αφορά στα παλαιότερα αντιικά φάρμακα (LAM, ADV). Κλινικά η εμφάνιση ικής αντοχής χαρακτηρίζεται από την αύξηση του HBV-DNA και των τρανσαμινασών, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ηπατικής ανεπάρκειας [43-44].

Σε ασθενείς με HBeAg θετική χρόνια ηπατίτιδα Β η χορήγηση Peg-IFN-α για 1 έτος σχετίζεται με υψηλότερα ποσοστά ορομετατροπής του HBeAg σε σχέση με αυτά μετά τη χορήγηση των NA για ανάλογο χρονικό διάστημα (32% έναντι <22% με τα νεότερα αντιικά) [69-70]. Το ποσοστό ορομετατροπής του HBeAg αυξάνει περαιτέρω με τη μακροχρόνια χορήγηση των NA (έως και 50%). Μετά την επίτευξη ορομετατροπής του HBeAg συστήνεται η συνέχιση του NA για άλλους 12 μήνες με στόχο τη διατήρηση της ανταπόκρισης. Το ποσοστό ορομετατροπής του HBsAg είναι επίσης υψηλότερο μετά από 1 έτος χορήγησης Peg-IFN-α έναντι αυτού μετά ανάλογο χρονικό διάστημα NA (3-7% έναντι 3% με TDF). Παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία της HBeAg θετικής χρόνιας ηπατίτιδας Β είναι: τα υψηλά επίπεδα ALT (>2.5 φορές το ανώτερο φυσιολογικό), τα χαμηλά επίπεδα HBV-DNA (<2×10⁸ IU/ml) και η αυξημένη νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα [43, 44]. Η εκτίμηση της πτώσης του HBV-DNA και της μείωσης των επιπέδων HBsAg κατά τη διάρκεια της θεραπείας αποτελούν επίσης προγνωστικούς δείκτες ανταπόκρισης στην αγωγή [44].

Στην HBeAg αρνητική χρόνια ηπατίτιδα Β το ποσοστό της μακροχρόνιας ιολογικής ανταπόκρισης μετά 1 έτος θεραπείας με Peg-IFN-α ανέρχεται στο 20%. Αντίθετα, ενώ η ιολογική ανταπόκριση μετά 1 έτος θεραπείας με NA είναι πολύ ικανοποιητική και φτάνει έως και το 90-93% για τα νεότερα NA, η διακοπή της αγωγής μετά 1 έτος θεραπείας σχετίζεται με υποτροπή της ιαμίας σχεδόν στην πλειοψηφία των περιπτώσεων [44, 71-72]. Για το λόγο αυτό τα NA χορηγούνται μακροχρόνια χωρίς μέχρι τώρα να υπάρχουν σαφείς συστάσεις για το ακριβές διάστημα χορήγησής τους [44]. Η χορήγηση Peg-IFN-α σχετίζεται με απώλεια του HBsAg στο 3% των

περιπτώσεων μετά 1 έτος θεραπείας και αυξάνει σημαντικά μετά τη διακοπή της αγωγής στο 12% των ασθενών μετά 5 έτη [71-72]. Η πτώση τόσο του HBV-DNA, όσο και του τίτλου του HBsAg κατά τη θεραπεία έχουν χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικοί δείκτες για την ανταπόκριση στη θεραπεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

1. Βασικές αρχικές ανοσιακής απάντησης

Η ανοσία είναι συνυφασμένη με την άμυνα του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων και ουσιαστικά αποτελεί την αντίδρασή του στις ξένες ουσίες συμπεριλαμβανομένων τόσο των μικροβίων και ιών όσο και διάφορων μακρομορίων όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.

Διακρίνεται στην αρχέγονη ή πρώιμη (innate) ανοσιακή απάντηση και στην προσαρμοστική ή ειδική (adaptive) ανοσιακή απάντηση. Η πρώιμη ή αλλιώς μη ειδική ανοσιακή απάντηση αποτελεί τη πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των διαφόρων εισβολέων. Εξελικτικά αποτελεί μια πρωτόγονη μορφή άμυνας του οργανισμού που ανευρίσκεται επίσης σε φυτά, μύκητες, ζώα, έντομα και πρωτόγονους πολυκύτταρους οργανισμούς. Αποτελείται από κύτταρα όπως τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural killers cells, NK cells), τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και μηχανισμούς όπως το συμπλήρωμα και τα φυσικά ανατομικά εμπόδια στα οποία συγκαταλέγονται τα επιθήλια που συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού έναντι διαφόρων παθογόνων χωρίς να οδηγούν σε μακροχρόνια ή προστατευτική ανοσία έναντι αυτών [73-74].

Η επίκτητη ή αλλιώς ειδική ανοσιακή απάντηση επιτελείται από εξειδικευμένα κύτταρα και μηχανισμούς που στοχεύουν διάφορα αντιγόνα που οδηγούν τελικά στην εξάλειψη ή πρόληψη της ανάπτυξης αυτών. Επάγεται όταν ο παθογόνος μικροοργανισμός διαφύγει της πρώτης γραμμής άμυνας του οργανισμού, δηλαδή της φυσικής ανοσιακής απάντησης. Τα λεμφοκύτταρα, τόσο τα Τ όσο και τα Β λεμφοκύτταρα, αποτελούν τα κύτταρα της ειδικής ανοσιακής απάντησης. Η ειδική

ανοσιακή απάντηση επιπλέον διακρίνεται στη χυμική και τη κυτταρική ανοσιακή απάντηση. Η χυμική ανοσιακή απάντηση μεσολαβείται από τα αντισώματα τα οποία παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα που μετά την έκθεση στο αντιγόνο μετατρέπονται σε κύτταρα που παράγουν αντισώματα, δηλαδή τα πλασματοκύτταρα και αποτελεί τον κύριο προστατευτικό μηχανισμό έναντι των εξωκυττάρων βακτηρίων. Η κυτταρική ανοσία μεσολαβείται από τα Τ λεμφοκύτταρα (CD8+ Τ λεμφοκύτταρα, CD4+ Τ λεμφοκύτταρα, γ/δ Τ λεμφοκύτταρα) και προάγει την ενδοκυττάρια καταστροφή ή λύση των μολυσμένων κυττάρων από ιούς και ορισμένα βακτήρια [75-78].

2. Αρχέγονη ή πρώιμη (innate) και προσαρμοστική ή ειδική (adaptive) ανοσιακή απάντηση στην HBV λοίμωξη

2.1 Κυτταρική ανοσιακή απάντηση στην HBV λοίμωξη

Ο HBV προκαλεί ηπατική νόσο, η σοβαρότητα της οποίας ποικίλλει σημαντικά από άτομο σε άτομο [78-79]. Η έκβαση της HBV λοίμωξης και στο σύνολο η φυσική πορεία της νόσου εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού και του ξενιστή, αλλά οι επιμέρους παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, δεδομένου ότι ο ιός μέχρι στιγμής έχει αποδειχτεί μόνο στον άνθρωπο και στον χιμπαντζή.

Ο επιτυχής έλεγχος του ιικού πολλαπλασιασμού στις ιογενείς λοιμώξεις προϋποθέτει την συντονισμένη συνεργασία της πρώιμης (ή εγγενούς) και της προσαρμοστικής ανοσιακής απάντησης [80-83].

2.1.1 Πρώιμη ανοσιακή απάντηση στην HBV λοίμωξη

Η πρώιμη ανοσιακή απάντηση που έχει περιγραφεί στον άνθρωπο για πολλές ιογενείς λοιμώξεις (λοίμωξη από τον κυτταρομεγαλοϊό, λοίμωξη από τον Epstein-Barr, λοίμωξη από τον HIV), όπως και σε λοιμώξεις σε πειραματικά μοντέλα (όπως ο ιός της λεμφοκυτταρικής χοραιομηνιγγίτιδας) είναι ένα γεγονός που συμβαίνει νωρίς στη φυσική ιστορία των νοσημάτων [84]. Κατά τη φάση της οξείας HBV λοίμωξης, αντίθετα, φαίνεται ότι ο ιός δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί αποτελεσματικά για ένα διάστημα που κυμαίνεται από 4-7 εβδομάδες από την μόλυνση με τον ιό [85]. Αυτή η φάση της HBV λοίμωξης στερείται συμπτωμάτων σε αντίθεση με άλλες ιογενείς λοιμώξεις που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη γενικών συμπτωμάτων.

Η μέχρι στιγμής έρευνα που αφορά στην πρώιμη ανοσιακή απάντηση της λοίμωξης από τον HBV χαρακτηρίζεται από τεχνικές δυσκολίες. Αναλυτικότερα, το γεγονός ότι οι ασθενείς κατά την πολύ πρώιμη φάση της λοίμωξης είναι ασυμπτωματικοί περιορίζει σημαντικά τη δυνατότητα αναγνώρισής τους και συνεπώς και της μελέτης τους. Επίσης το *in vitro* σύστημα ηπατοκυττάρων, που είναι διαθέσιμο για τη μελέτη της HBV λοίμωξης δεν είναι ευρέως διαθέσιμο, ενώ δεν χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική πολλαπλασιαστική ικανότητα του HBV (χαμηλοί τίτλοι HBV-DNA) [86]. Το καλύτερο ζωικό πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη του HBV είναι ο χιμπατζής, γεγονός που κάνει τη χρήση του αρκετά ακριβή, ενώ παράλληλα εμπλέκονται και ηθικά ζητήματα, που καθιστούν τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών ακόμα δυσκολότερη.

Σε γενικές γραμμές και λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω περιορισμούς, η μέχρι τώρα έρευνα έχει οδηγήσει στην αποδοχή ενός σεναρίου που υποστηρίζει τη μειωμένη ή ακόμα και την απύσχα πρώιμη ανοσιακή απάντηση στην οξεία HBV λοίμωξη.

Σε μια μελέτη ασθενών με οξεία HBV λοίμωξη, φάνηκε ότι κατά την προκλινική-ασυμπτωματική φάση της HBV λοίμωξης υπήρχε ελαττωμένη παραγωγή IFN-I, ενώ υπήρχε αυξημένη παραγωγή ιντερλευκίνης-10 (Interleukin-10, IL-10). Παράλληλα σε αυτή τη φάση παρατηρήθηκε μείωση της T κυτταρικής και NK ανοσιακής απάντησης [87]. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με τα ευρήματα σε χιμπατζήδες μολυσμένους από τον HBV, όπου στην οξεία φάση παρατηρήθηκε απουσία ενεργοποίησης (induction) των σχετιζόμενων με την IFN γονιδίων [88].

Ένας πιθανός μηχανισμός που προτάθηκε πρόσφατα είναι αυτός της καταστολής της επαγωγής της IFN-β διαμέσου αλληλεπίδρασης της HBV πολυμεράσης με τον ρυθμιστικό παράγοντα της IFN (interferon - regulatory factor - IRF) [89].

2.1.2 T κυτταρική ανοσιακή απάντηση στην HBV λοίμωξη

Τόσο τα CD4+ όσο και τα CD8+ T λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαίνοντα ρόλο στη HBV λοίμωξη, γιατί συνεισφέρουν όχι μόνο στη κάθαρση του ιού και στην ανάπτυξη προστατευτικών αντισωμάτων έναντι του ιού αλλά και στην πρόκληση σημαντικής ηπατικής βλάβης.

Μελέτες που αφορούν σε ασθενείς με HBV λοίμωξη, αλλά και σε πειραματικά μοντέλα μολυσμένων από τον ιό χιμπατζήδων έδειξαν ότι ο έλεγχος του ιικού

πολλαπλασιασμού σχετίζεται με ισχυρή CD4+ και CD8+ T απάντηση έναντι αντιγόνων αυτού.

2.1.3 CD8+ T κυτταρική απάντηση

Η ειδική έναντι του HBV CD8+ T κυτταρική απάντηση εμπλέκεται στην ανοσοπαθογένεια της λοίμωξης. Μελέτες σε χιμπατζήδες με οξεία HBV λοίμωξη έδειξαν ότι η έναρξη της οξείας ηπατικής βλάβης συμπίπτει με την είσοδο των ειδικών έναντι του ιού CD8+ T λεμφοκυττάρων στο ήπαρ [90-91]. Αντίθετα, η εξάλειψη των CD8+ T κυττάρων έχει δείχτει ότι μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη της ηπατοκυτταρικής βλάβης [91].

Η ένταση της ειδικής έναντι του HBV CD8+ T κυτταρικής απάντησης και ο αριθμός των HBV επιτόπων που αναγνωρίζονται παίζει καθοριστικό ρόλο όχι μόνο στη βαρύτητα της ηπατοκυτταρικής βλάβης, αλλά και στην έκβαση της HBV λοίμωξης. Συγκεκριμένα, η έντονη και στρεφόμενη έναντι πολλών επιτόπων του HBV CD8+ T κυτταρική απάντηση σχετίζεται με σοβαρή κλινικά ηπατίτιδα, αλλά και με επιτυχή έκβαση της λοίμωξης. Αντίθετα, ήπια και στρεφόμενη έναντι περιορισμένου αριθμού HBV επιτόπων CD8+ T κυτταρική απάντηση σχετίζεται με ηπιότερη ηπατοκυτταρική βλάβη κατά τη διάρκεια ενός επεισοδίου οξείας HBV λοίμωξης και με χρονιότητα της λοίμωξης [91-94].

Επιπρόσθετα ο ρόλος της CD8+ T κυτταρικής απάντησης επισημαίνεται και στη μελέτη των Maini και συνεργατών, όπου ασθενείς με HBeAg θετική χρόνια HBV λοίμωξη και αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα του ιού (υψηλά επίπεδα HBV-

DNA και ALT) είχαν μειωμένη ειδική έναντι του ιού CD8+ T κυτταρική απάντηση σε σχέση με αυτούς με μειωμένα επίπεδα HBV-DNA και ALT [95].

Φαίνεται όμως ότι ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο επιτελείται ο έλεγχος του ιικού πολλαπλασιασμού δεν είναι μέσω λύσης των ηπατοκυττάρων (cytolytic), όπως περιγράφηκε πιο πάνω, αλλά είναι μη κυτταρολυτικός (non-cytolytic). Η μη-κυτταρολυτική αναστολή του πολλαπλασιασμού του HBV έχει δεχτεί ότι επιτελείται μέσω διαφόρων μηχανισμών που κυρίως επάγουν την παραγωγή IFN- γ και TNF- α [88, 95-97]. Οι μηχανισμοί που καθορίζουν την ένταση και το είδος της ειδικής έναντι του HBV CD8+ T κυτταρικής απάντησης δεν είναι σαφείς. Η παρατεταμένη έκθεση στα ιικά αντιγόνα φαίνεται να αποτελεί ένα από τα βασικά αίτια της αναποτελεσματικής λειτουργίας των ειδικών έναντι του ιού CD8+ T κυττάρων όπως προκύπτει καταρχήν από μελέτες σε ποντίκια που έχουν μολυνθεί με τον ιό της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας που χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο για τη μελέτη της παθογένεσης των ιογενών ηπατιτίδων [82]. Στην περίπτωση του HBV η παρατεταμένη έκθεση αφορά σε διάφορες ιικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων του επιφανειακού αντιγόνου HBsAg και της εξοκυττάριας μορφής του πυρηνικού αντιγόνου HbcAg που παρουσιάζονται στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας [92, 98].

Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι σημαντικό ρόλο παίζει και η αυξημένη έκφραση ανασταλτικών μορίων, όπως είναι η πρωτεΐνη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1 (programmed death-1, PD-1), το αντιγόνο 4 των T κυτταροτοξικών κυττάρων καθώς και των αντίστοιχων συνδετών στο προσβεβλημένο ήπαρ. Έτσι, όταν τα ειδικά έναντι του HBV CD8+ T κύτταρα

μεταφέρονται στα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν στα ηπατοκύτταρα τους το HBsAg, με την αναγνώριση του ιικού αντιγόνου εμφανίζουν αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης PD-1, ενώ χάνουν την ικανότητα να παράγουν IFN- γ [99, 100]. Σε ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη, ο ιός έχει δειχτεί ότι αυξάνει την έκφραση του συνδέτη του PD1 (PDL1) στα μολυσμένα από τον ιό ηπατοκύτταρα *in vitro* και διαμέσου αυτού του μηχανισμού μπορεί να μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ κυτταρολυτικής και μη-κυτταρολυτικής δράσης των CD8+ T κυττάρων συμβάλλοντας κατά αυτό τον τρόπο στην χρονιότητα της HBV λοίμωξης [102].

Η μειωμένη λειτουργικότητα των CD8+ T λεμφοκυττάρων έχει συσχετιστεί χρονικά με αύξηση στην παραγωγή της ανοσοτροποποιητικής κυτταροκίνης IL-10 τόσο στο αίμα όσο και στο ήπαρ των ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη [87]. Η IL-10 που παράγεται από τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, τα B λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος και τα κύτταρα Kupffer στο προσβεβλημένο από τον HBV ήπαρ έχει δειχτεί ότι αναστέλλει την παραγωγή της IFN- α , ενώ προάγει την απόπτωση των δενδριτικών κυττάρων. Παράλληλα η IL-10 αναστέλλει τη δράση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και μειώνει την διέγερση των CD4+ T λεμφοκυττάρων [103-104].

Στο περιβάλλον του ηπατικού παρεγχύματος ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη φαίνεται ότι η λειτουργικότητα των CD8+ T λεμφοκυττάρων, ανεξάρτητα από την αντιγονικότητά τους, είναι επηρεασμένη κυρίως ως προς την ικανότητά τους να παράγουν ιντερλευκίνη-2 (interleukin-2, IL-2) και να πολλαπλασιάζονται μετά από διέγερσή τους διαμέσου του υποδοχέα τους (T-Cell receptor, TCR). Μια μελέτη έδειξε ότι αυτή η διαταραχή στη λειτουργία των CD8+ T λεμφοκυττάρων οφείλεται

εν μέρει σε μείωση του σήματος διαμέσου του εγγύς τμήματος του TCR (αλυσίδα CD3zeta) και αυτό φάνηκε να σχετίζεται με σημειακή διαγραφή (deletion) του αμινοξέος αργινίνη παρουσία της αργινάσης [105].

2.1.4 CD4+ T κυτταρική απάντηση

Η συμβολή των CD4+ T λεμφοκυττάρων είναι καθοριστική στην έκβαση της HBV λοίμωξης. Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι τα CD4+ T λεμφοκύτταρα ή αλλιώς γνωστά και ως «βοηθητικά» λεμφοκύτταρα επιτελούν πληθώρα λειτουργιών. Τα ίδια δεν φαίνεται να έχουν κυτταρολυτική δράση. Η κύρια δράση τους είναι ότι επάγουν και διατηρούν τη λειτουργία των CD8+ T λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, έντονη και στρεφόμενη έναντι πολλών ιικών επιτόπων CD4+ T κυτταρική απάντηση χαρακτηρίζει την οξεία HBV λοίμωξη που καταλήγει σε επιτυχή έκβαση, ενώ ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη παρουσιάζουν ασθενή CD4+ T κυτταρική απάντηση [93, 106].

Η μειωμένη λειτουργικότητα των CD4+ T λεμφοκυττάρων φαίνεται ότι είναι πολυπαραγοντική. Σημαντικό ρόλο παίζει η μειωμένη δράση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και κυρίως αυτή των δενδριτικών κυττάρων, που αφορά στην μειωμένη συχνότητά τους και την μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών [107, 108].

2.1.5 NK κύτταρα στην HBV λοίμωξη

Τα NK κύτταρα αποτελούν το βασικό σκέλος της εγγενούς ανοσιακής απάντησης, που συμμετέχουν στην αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένης και της ηπατίτιδας Β.

Η ενεργοποίηση των NK κυττάρων περιλαμβάνει τη διέγερση από διάφορες κυτταροκίνες όπως η τύπου 1 ιντερφερόνη (type I IFN), η ιντερλευκίνη 8 (IL-8), η ιντερλευκίνη 12 (IL-12), η ιντερλευκίνη 15 (IL-15) και η ιντερλευκίνη 18 (IL-18). Επίσης περιλαμβάνει τη μείωση των σημάτων από ανασταλτικούς υποδοχείς, όπως είναι η μειωμένη έκφραση των υποδοχέων του συστήματος μείζονος ιστοσυμβατότητας και την αύξηση των σημάτων από υποδοχείς ενεργοποίησης, όπως των επαγόμενων από το στρες συνδετών (stress-induced ligands) [108].

Έτσι, τα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα των υποδοχέων ενεργοποίησης όπως ο NKp30 και ο NKp46. Οι αλληλεπιδράσεις των σημάτων διαμέσου των εν λόγω υποδοχέων οδηγεί στην ενεργοποίηση των NK κυττάρων στη HBV λοίμωξη, όπως δηλώνεται από την παρουσία της CD69, μιας διαλυτής γλυκοπρωτεΐνης της κυτταρικής επιφάνειας. Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι τα ενδοηπατικά NK κύτταρα είναι περισσότερο διεγερμένα σε σύγκριση με αυτά του περιφερικού αίματος [110].

Στην HBV λοίμωξη η δυσλειτουργία των NK κυττάρων φαίνεται πως επάγεται από την IL-10 και τον TNF-β καθώς η λειτουργία αυτών αποκαθίσταται *in vitro* με την αναστολή των εν λόγω κυτταροκινών [111]. Η δε μειωμένη ικανότητα των NK κυττάρων να παράγουν IFN-γ φαίνεται ότι πιθανά σχετίζεται με μείωση της αντιϊκής τους λειτουργίας. Σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον αντιϊκό ρόλο της IFN-γ

στη HBV λοίμωξη προέκυψαν από μελέτη σε πειραματικά μοντέλα ποντικών όπου η IFN- γ , που παράγεται από ειδικά έναντι του HBV CD8⁺ T κύτταρα και από ενεργοποιημένα από την IL-12 NK κύτταρα, μειώνει τον ιικό πολλαπλασιασμό [112, 113]. Επίσης συνηγορικά ήταν και τα αποτελέσματα μελέτων τόσο σε προσβεβλημένους από τον HBV ασθενείς όσο και σε πρωτεύοντα ζώα στις οποίες η αρχική μείωση των τιμών του ιικού φορτίου συμπίπτει με την αύξηση της IFN- γ στο ήπαρ καθώς και με την εμφάνιση των ειδικών έναντι του ιού T κυττάρων που παράγουν IFN- γ τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στο ήπαρ [90-91, 114-115]. Φαίνεται όμως ότι τα NK κύτταρα από μόνα τους δεν μπορούν να οδηγήσουν στην κάθαρση του HBV. Όπως προέκυψε από μελέτες σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β, η αύξηση της συχνότητας των NK κυττάρων δεν σχετίζεται με μείωση των επιπέδων της ιαμίας. Στη φάση κορύφωσης της ιαμίας φαίνεται ότι υπάρχει δυσλειτουργία των NK κυττάρων με μείωση των δεικτών ενεργοποίησής τους και μείωση της παραγωγής IFN- γ [116].

Υπάρχουν δεδομένα ότι τα NK κύτταρα συμβάλουν στη ρύθμιση της ειδικής έναντι του HBV T κυτταρικής ανοσιακής απάντησης. Από πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς με HBV λοίμωξη, ο αποκλεισμός των NK κυττάρων του περιφερικού αίματος των ασθενών με HBV λοίμωξη είχε σαν αποτέλεσμα την εξασθένηση της ειδικής έναντι του HBV CD8⁺ T κυτταρική ανοσιακής απάντησης [111]. Συμπερασματικά λοιπόν οι ανωτέρω μελέτες είναι ενδεικτικές του ρυθμιστικού ρόλου των NK κυττάρων στην ανοσιακή απάντηση έναντι του HBV.

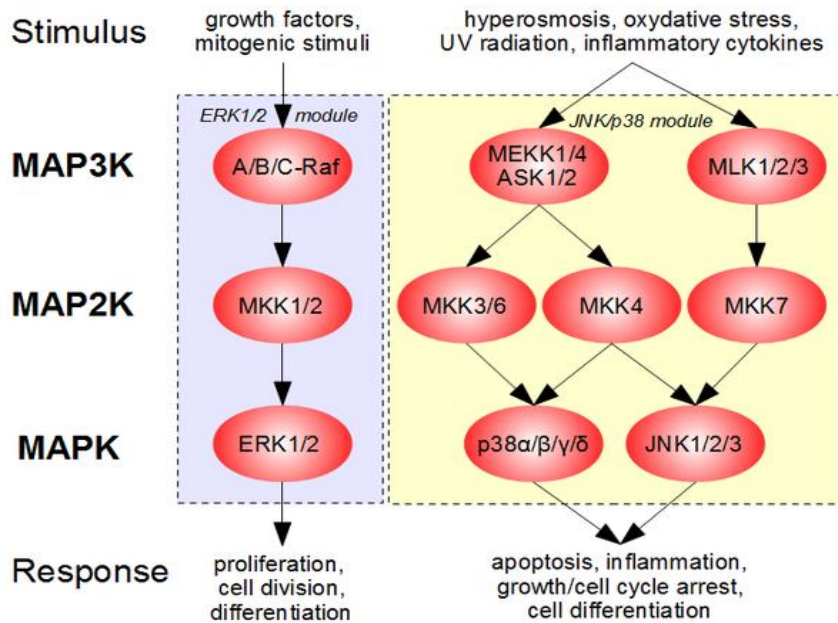
3. p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)

3.1 MAPKs

Τα κύτταρα αναγνωρίζουν και αντιδρούν στα εξωκυττάρια ερεθίσματα μέσω της ενεργοποίησης ποικίλων ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών όπως αυτών που οδηγούν στην ενεργοποίηση των ενεργοποιημένων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (mitogen-activated protein kinases, MAPKs). Οι MAPKs αποτελούν μια υπεροικογένεια κινασών που ρυθμίζουν ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων.

Διακρίνονται τρεις υποοικογένειες των MAPKs, οι ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα κινάσες (extracellular signal regulated kinases, ERKs), οι c-Jun N-terminal κινάσες (c-Jun N-terminal kinases, JNKs) και οι p38 ενεργοποιημένες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (p38 mitogen-activated protein kinases, p38 MAPKs). Οι εν λόγω υποομάδες είναι πανομοιότυπες κατά το 60-70%, αλλά διαφέρουν στην αλληλουχία και το μέγεθος του βρόγχου ενεργοποίησης καθώς και στα ερεθίσματα τα οποία τις ενεργοποιούν. Συγκεκριμένα οι ERKs ενεργοποιούνται από μιτογόνα ερεθίσματα που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όπως οι αυξητικοί παράγοντες και οι εστέρες φορβόλης, ενώ οι ERKs και p38 MAPKs ενεργοποιούνται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα του stress όπως το ωσμωτικό shock, η ιονίζουσα ακτινοβολία και οι κυτταροκίνες, γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως ενεργοποιημένες από το stress πρωτεϊνικές κινάσες (stress-activated protein kinases SAPKs) [117-118].

Οι οδοί των τριών υποομάδων των MAPK δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους αλλά περιλαμβάνουν αλληλοεπικαλυπτόμενους σηματοδοτικούς μηχανισμούς. Κάθε υποομάδα MAPKs αποτελείται από τρεις διαδοχικά δρώσες κινάσες, την MAPK, την MAPK κινάση (MAPK kinase, MAPKK) και την MAPKK κινάση (MAPKK kinase, MAPKKK). Οι MAPKKKs που αποτελούν κινάσες σερίνης/θρεονίνης ενεργοποιούν φωσφορυλιώνοντας την MAPKK που ακολούθως ενεργοποιεί τη MAPK μέσω της διπλής φωσφορυλίωσης καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης που ανευρίσκονται στον βρόγχο ενεργοποίησης της υπομονάδας VIII της κινάσης (Εικόνα 4). Η διπλή φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την αναδίπλωση του βρόγχου και την αλληλεπίδραση με επιφανειακές θέσεις σύνδεσης αργινίνης, αυξάνοντας έτσι, την ειδική ενεργότητα των MAPK κατά 1000 τουλάχιστον φορές. Τέλος, οι MAPKs φωσφορυλιώνουν κατάλοιπο σερίνης ή θρεονίνης μόνο σε υποστρώματα τα οποία περιέχουν προλίνη στη θέση P-1. Στα υποστρώματα των MAPK περιλαμβάνονται φωσφολιπάσες, μεταγραφικοί παράγοντες, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού καθώς και πρωτεϊνικές κινάσες που ονομάζονται ενεργοποιημένες από της MAPK πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK – activated protein kinases, MKs) [119].



Εικόνα 4: Σηματοδοτικοί οδοί των MAPKs [117, 119].

3.2 p38 MAPKs

3.2.1 Οι ισομορφές της p38 MAPK

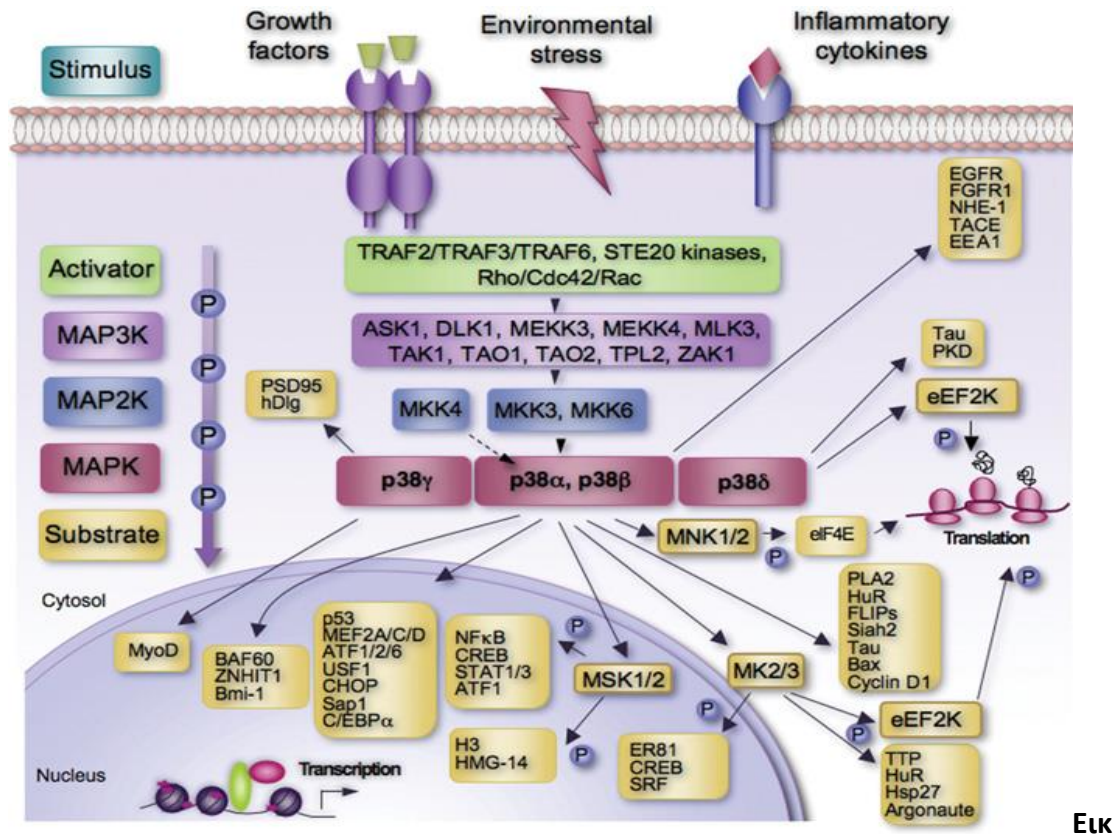
Το πρώτο μέλος της οικογένειας των p38 MAPKs ταυτοποιήθηκε από τέσσερις ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες προ 20ετίας περίπου ως μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 38 kDa που φωσφορυλιώνεται ταχιάως στη θέση της τυροσίνης μετά από διέγερση με λιποπολυσακχαρίδιο (Lipopolysaccharide, LPS), ως πρωτεΐνη στόχος των φαρμάκων πυριδυνιλιμαζόλης που αναστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και τέλος ως κινάση ενεργοποιητής της MAPKAP-K2/MK2 (ενεργοποιημένη από τη MAPK πρωτεϊνική κινάση, MAPK-activated protein kinase 2) σε κύτταρα που ενεργοποιούνται μετά θερμικό σοκ, arsenite ή ιντερλευκίνη 1 [120].

Έχουν περιγραφεί τέσσερις ισομορφές της p38 MAPK: p38α, p38β, p38γ, and p38δ οι οποίες είναι πανομοιότυπες κατά 60% όσον αφορά στην αλληλουχία αμινοξέων. Κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, ενώ κάποιες από τις ισομορφές φαίνεται ότι εκφράζονται συχνότερα σε ορισμένους ιστούς. Συγκεκριμένα, η p38α εκφράζεται σε όλους του ιστούς, ενώ η έκφραση των υπολοίπων ισομορφών φαίνεται να είναι περισσότερο οργανοειδική με την p38β να εκφράζεται στον εγκέφαλο, την p38γ στους σκελετικούς μύες και την p38δ στους ενδοκρινείς αδένες, τους πνεύμονες, το λεπτό έντερο και τους νεφρούς. Οι ισομορφές της p38 MAPK μοιράζονται κοινά υποστρώματα, αν και έχουν αναφερθεί διαφορές, καθώς ορισμένα υποστρώματα φαίνεται να φωσφορυλιώνονται καλύτερα από τις p38α και p38β σε σύγκριση με τις p38γ και p38δ ή αντίστροφα. Επίσης, οι επιμέρους ισομορφές μπορεί να επάγουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά στα ίδια κύτταρα. Για παράδειγμα, μελέτη σε κυτταρική σειρά με καρκινικά κύτταρα μαστού ανέδειξε πως η ισομορφή p38β επάγει την ενεργοποίηση της AP-1 ενώ οι ισομορφές p38γ και p38δ την αναστέλλουν. Το γεγονός όμως ότι η ενεργοποίηση της AP-1 ρυθμίζεται ταυτόχρονα και από τις τρεις ισομορφές της p38 MAPK οδηγεί στο συμπέρασμα πως η τελική συμπεριφορά της AP-1 εξαρτάται από την ισομορφή της οποίας η έκφραση επικρατεί στο συγκεκριμένα κύτταρα. Έτσι, εάν επικρατεί η έκφραση της ισομορφής p38β η AP-1 θα ενεργοποιηθεί, ενώ αντίθετα θα ανασταλλεί εάν επικρατεί η έκφραση των ισομορφών p38γ και p38δ [121-123].

3.2.2 Η σηματοδοτική οδός της p38 MAPK

Η ενεργοποίηση της p38 MAPK περιλαμβάνει τη διπλή φωσφορυλίωση των καταλοίπων θρεονίνης και τυροσίνης της αλληλουχίας Thr-Gly-Tyr στη θηλιά ενεργοποίησης. Καταλύεται από τις MKK3 και MKK6 οι οποίες ενεργοποιούνται από ποικίλα ερεθίσματα όπως το οξειδωτικό stress, η υπεριώδης ακτινοβολία, η ισχαιμία, και από ποικίλες κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένων της IL-1 και του TNF-α. Η ενεργοποίηση των MKK3/MKK6 περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση των ανωτέρω κινάσων από διάφορες MKKKs, οι οποίες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της p38 MAPK, σε δύο συντηρημένες θέσεις θρεονίνης/σερίνης στη θηλιά ενεργοποίησης. Ενώ η MKK6 φωσφορυλιώνει και τις τέσσερις ισομορφές της p38, η MKK3 φωσφορυλιώνει της p38α, p38γ, p38δ αλλά όχι την p38β. Επιπλέον, η ισομορφή p38α μπορεί να ενεργοποιηθεί από την MKK4 που αποτελεί ενεργοποιητή της JNK.

Τόσο η MKK3 όσο και η MKK6 είναι ειδικές για την ενεργοποίηση της p38 MAPK και η ανωτέρω εξειδίκευση φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα της μορφολογίας των συμπλεγμάτων των ισομορφών της p38 και των MKK3/MKK6 καθώς και της επιλεγμένης αναγνώρισης της θηλιάς ενεργοποίησης των ισομορφών της p38 από τις MKK3/MKK6. Η ενεργοποίηση δε των ισομορφών της p38 από διαφορετική κινάση εξαρτάται από το ερέθισμα άλλα και από τον τύπο του κυττάρου καθώς οι κινάσες εκφράζονται σε διαφορετικό ποσοστό στα επιμέρους κύτταρα. Η ενεργοποίηση των MKK3/MKK6 περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση των ανωτέρω κινάσων από διάφορες MKKKs, οι οποίες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της p38 MAPK, σε δύο συντηρημένες θέσεις θρεονίνης/σερίνης στη θηλιά ενεργοποίησης [120].



όνα 5: Ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της p38 MAPK από διάφορα ερεθίσματα, όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και διάφορα στρεσογόνα περιβαλλοντικά ερεθίσματα [120].

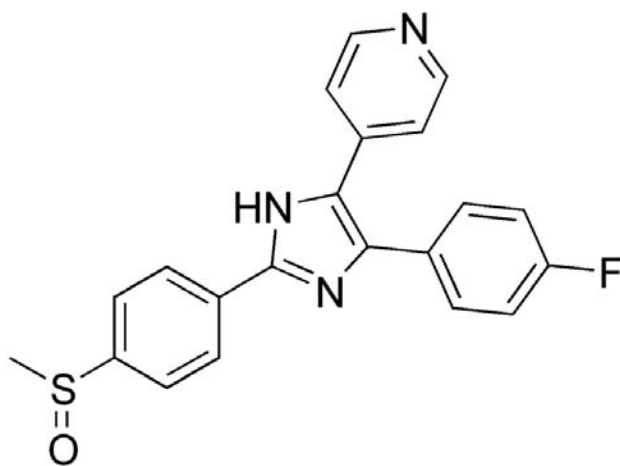
Η ενεργοποιημένη p38 MAPK με τη σειρά της φωσφορυλιώνει διάφορα μόρια στόχους στα κύτταρα, όπως τη κυττοσολική φωσφολιπάση A2, τη σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη Tau, τους μεταγραφικούς παράγοντες ATF1 και 2, MEF2A, Sap-1, NF-κB, Ets-1 και p35 ενώ φαίνεται πως επάγει την ενεργοποίηση διαφόρων κινάσων όπως η MSK1 και 2, MNK1 και 2, MK2 και 3 (εικόνα 5).

Η p38 MAPK πριν την ενεργοποίηση των κυττάρων μπορεί να ανευρεθεί τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, μετά τη διαδικασία αυτή, η ενεργοποιημένη πλέον p38 MAPK μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα των κυττάρων, ενώ σύμφωνα με άλλες

αναφορές μπορεί να ανευρεθεί και στο κυτταρόπλασμα των ενεργοποιημένων κυττάρων [120, 124].

3.2.3 Ο αναστολέας της p38 MAPK

Ο SB203580 αποτελεί χαρακτηριστικό εκπρόσωπο των πυριδινυλ-ιμιδαζολών που αναπτύχθηκαν το 1994 από τον John Lee και τους συνεργάτες του στην SmithKline Beecham σαν αναστολέας της επαγόμενης από το λιποπολυσακχαρίδιο σύνθεσης της IL-1 και του TNF στα μονοκύτταρα [126]. *In vitro* μπορεί να αναστείλει σε μικρές συγκεντρώσεις την p38 MAPK χωρίς να αναστείλει άλλες πρωτεϊνικές κινάσες όπως οι ERK και οι JNK [126-127].



Εικόνα 6: Η χημική δομή του SB203580 [47]

Ο αναστολέας SB203580 έχει ελάχιστη τοξικότητα *in vivo* και μπορεί να είναι αποτελεσματικός στη θεραπεία διαφόρων φλεγμονωδών νοσημάτων όπως της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες μελέτες για τη

διευκρίνιση του ρόλου της p38 MAPK και τον έλεγχο των διαδικασιών στις οποίες αυτή συμμετέχει [121-123]. Σημειώνεται πως οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες αναδεικνύουν την ειδικότητα του εν λόγω αναστολέα για την p38 MAPK.

3.2.4 p38 MAPK και ανοσιακή απάντηση

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, κυρίως σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, με στόχο την κατανόηση του ρόλου της σηματοδοτικής οδού της p38 MAPK *in vivo*. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν στην ισομορφή p38α και σχετίζονται με τη μελέτη του ρόλου της στην ομοιοστασία των ιστών και σε διάφορες άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως στη φλεγμονή, την ανοσιακή απάντηση στο καρκίνο και άλλες παθήσεις διάφορων συστημάτων όπως σε νευρογενετικά νοσήματα και νοσήματα του καρδιαγγειακού [121-123, 128-129].

Ένας από τους κεντρικούς ρόλους της p38 MAPK είναι η συμμετοχή της στη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης, τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης. Η p38 MAPK ενεργοποιείται στα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα T κύτταρα μέσω διαφόρων εξωκυττάρων μεσολαβητών της φλεγμονής όπως χημειοκινών, κυτταροκινών και του λιποπολιστακχαριδίου των βακτηρίων ρυθμίζοντας τη χημειοταξία, τη προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των ανωτέρω κυττάρων. Με τη ρύθμιση της παραγωγή της IFN- γ , η p38 MAPK συμμετέχει στη διαφοροποίηση και απόπτωση των T κυττάρων [124, 130]. Τέλος, ένα ακόμη τρόπος με τον οποίο ρυθμίζει η p38 MAPK την ανοσιακή απάντηση είναι σταθεροποιώντας συγκεκριμένα

mRNAs στα κύτταρα όπως για παράδειγμα την έκφραση αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και υποδοχέων επιφανείας των κυττάρων [124, 131-133].

3.2.5 p38 MAPKs και HBV λοίμωξη

Οι ιογενείς λοιμώξεις μπορούν να ενεργοποιήσουν την p38 MAPK και να ενισχύσουν τον μικρό πολλαπλασιασμό, όπως έχει προκύψει από μελέτες που αφορούν στον ιό της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (human immunodeficiency virus, HIV-1), τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (human respiratory syncytial virus, RSV) και τον ιό της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας [133-135].

Λίγες είναι οι μελέτες σχετικά με το ρόλο της p38 MAPK στη λοίμωξη από τον HBV και αφορούν κυρίως σε πειραματικά μοντέλα με διαγονιδιακά ποντίκια και κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων. Μέχρι τώρα δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως ο ρόλος της στην λοίμωξη από τον HBV, ενώ πολλές από τις μελέτες χαρακτηρίζονται από αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Αναλυτικά ο HBV έχει διαπιστωθεί, πως επάγει την παραγωγή και έκκριση κυτταροκινών με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της p38MAPK. Συγκεκριμένα, μελέτη σε ανθρώπινα μακροφάγα κύτταρα έδειξε ότι το HBcAg επάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών και ρυθμιστικών κυτταροκινών από τα ανθρώπινα μακροφάγα με μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχει η p38 MAPK καθώς η αναστολή αυτής οδηγεί στην αναστολή της παραγωγής της IL-6 [136]. Μελέτη σε κυτταρικές σειρές ηπατοκυττάρων άλλα και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ανέδειξε πως η πρωτεΐνη

HBx οδηγεί στην παραγωγή και έκκριση της IL-6, μια από τις κυριότερες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Στη μελέτη αυτή η παραγωγή IL-6 φάνηκε ότι εξαρτάται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεΐνης MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene,) στο οποίο εμπλέκεται και ενεργοποίηση της p38 MAPK [137].

Όσον αφορά στους μηχανισμούς με τους οποίους ο HBV επάγει την καρκινογένεση, μελέτες σε κυτταρικές σειρές Huh-7 και διαγονιδιακά ποντίκια ανέδειξαν πως η έκφραση μεταλλαγμένης πρωτεΐνης του HBV (Pre-S mutant) οδηγεί σε διέγερση στο περιβάλλον του ενδοπλασματικού δικτύου και παραγωγή της κυκλοοξυγενάσης 2. Το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου επιτελείται μέσω διάφορων σηματοδοτικών οδών, συμπεριλαμβανομένης και της p38 MAPK [138].

Σε άλλη μελέτη σε κυτταρική σειρά Huh7, διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίηση της επαγόμενης από το c-Myc απόπτωσης επιτελείται διαμέσου της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού της p38MAPK. Η έκφραση της πρωτεΐνης HBx φάνηκε ότι αναστέλει την ενεργοποίηση του πρωτοογκογονιδίου c-Myc και άρα της επαγόμενης από αυτό απόπτωσης με μείωση των επιπέδων της p38. Κατ'αυτό τον τρόπο η παρουσία της HBx πρωτεΐνης συντελεί στην πολύπλοκη διαδικασία της ηπατοκαρκινογένεσης που σχετίζεται με τον HBV [139].

Αντίθετα, μελέτη των Kuo και συνεργατών σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος έδειξε πως η HBx πρωτεΐνη οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης HURP (hepatoma upregulated protein) μέσω της ενεργοποίησης της p38 MAPK σηματοδοτικής οδού με αποτέλεσμα την εμφάνιση αντίστασης στην

επαγόμενη από τη σισπλατίνη απόπτωση [140]. Στη συνέχεια, μελέτη σε κυτταρική σειρά ηπατοκυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη HBx ανέδειξε πως η επαγόμενη από την πρωτεΐνη HBx απόπτωση περιλαμβάνει τη παρατεταμένη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών της p38 MAPK και της JNK που οδηγεί στη μεταγραφή των υποδοχέων Fas/FasL και TNFR1/TNF- α οδηγώντας στην απόπτωση των κυττάρων [139]. Λίγα χρόνια αργότερα η ίδια ομάδα ερευνητών έδειξε ότι η HBx επάγει την απόπτωση των κυττάρων με τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση του p53 μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού της p38 MAPK [139].

Ως προς τον πολλαπλασιασμό του HBV, δεδομένα σε καρκινικά κύτταρα Huh-7 έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της p38 MAPK είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του HBV στα Huh-7, καθώς η καταστολή της p38 MAPK οδηγεί στην αναστολή της έκκρισης πρωτεϊνών του HBV, της σύνθεσης RNA, καθώς και του ιικού πολλαπλασιασμού, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης του cccDNA [143]. Στο προσβεβλημένο από τον HBV ήπαρ, η HBx πρωτεΐνη φαίνεται να επάγει διαφορετικά μιτογόνα μονοπάτια στα διαφοροποιημένα σε σύγκριση με τα λιγότερο διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα. Συγκεκριμένα, μελέτη σε κυτταρική σειρά αποδιαφοροποιημένων ηπατοκυττάρων ανέδειξε πως η HBx πρωτεΐνη οδηγεί στην καθυστέρηση της ανάπτυξης των ηπατοκυττάρων με μηχανισμό στον εμπλέκεται η ενεργοποίηση της p38 MAPK [144]. Τέλος, η ενεργοποίηση της p38 MAPK από την πρωτεΐνη HBx οδηγεί σε αλλαγή της ενδοκυττάριας κινητικότητας όπως διαπιστώθηκε σε μελέτη με κυτταρική σειρά Huh-7. Συγκεκριμένα σε μια μελέτη φάνηκε ότι επάγεται η εξαρτώμενη από τους μικροσωληνίσκους ενεργοποίηση της δυνεΐνης με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των μιτοχονδρίων στη

περιφέρεια του πυρήνα, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη πρόοδο της νόσου σε χρόνια ηπατίτιδα Β [145].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Η εγγενής όσο και η ειδική ανοσιακή απάντηση έχει δειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στον έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού όσο και στην παθογένεια της ηπατικής βλάβης στην HBV λοίμωξη [78, 79]. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι ο συντονισμός των μηχανισμών της ανοσιακής απάντησης αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τον επιτυχή έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού στις ιογενείς λοιμώξεις [80].

Μελέτες που αφορούν σε ασθενείς με HBV λοίμωξη, αλλά και σε πειραματικά μοντέλα μολυσμένων από τον ιό χιμπατζήδων έδειξαν ότι η CD4+ και CD8+ T κυτταρική απάντηση σχετίζεται με τον έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού. Στην επιτυχή αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού εμπλέκονται τόσο κυτταρολυτικοί όσο και μη κυτταρολυτικοί μηχανισμοί. Συγκεκριμένα έχει δειχτεί πως η έντονη CD8+ κυτταρική απάντηση σχετίζεται με σοβαρή ηπατοκυτταρική βλάβη αλλά επιτυχή έκβαση της λοίμωξης. Η μη κυτταρολυτική αναστολή του πολλαπλασιασμού του HBV έχει δειχτεί ότι επιτελείται μέσω διαφόρων μηχανισμών που κυρίως επάγουν την παραγωγή IFN- γ [95, 97]. Η IFN- γ αποτελεί την σημαντικότερη ίσως κυτταροκίνη για την επιτυχή έναρξη αλλά και διατήρηση της αποτελεσματικής ανοσιακής απάντησης στην HBV λοίμωξη και φαίνεται να καθορίζει την ένταση, την ποικιλομορφία και την ποιότητα της ειδικής έναντι του ιού CD4 και CD8 T λεμφοκυτταρικής απάντησης [25, 43].

Τα NK κύτταρα αποτελούν βασικό συντελεστή της εγγενούς ανοσιακής απάντησης στην αντιμετώπιση των ιογενών λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένης της HBV λοίμωξης. Μελέτες σε ασθενείς με οξεία HBV λοίμωξη έδειξαν ότι κατά την ασυμπτωματική φάση ο ιός εξαπλώνεται στο ήπαρ χωρίς να μπορεί να επάγει την επαρκή παραγωγή IFN-α/β προκειμένου να περιορίσει τον ιικό πολλαπλασιασμό. Σε αυτό φαίνεται να συμβάλει η καταστολή των δραστικών κυττάρων της εγγενούς ανοσιακής απάντησης, που είναι τα NK κύτταρα και τα NK T κύτταρα, τα οποία έχει δειχτεί ότι κατά τη φάση της μέγιστης ιαιμίας αδυνατούν να παράγουν IFN-γ [28, 136].

Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι στην HBV λοίμωξη ενεργοποιούνται αρκετοί ενδοκυττάριοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται αυτός της p38 MAPK. Η p38 MAPK ενεργοποιείται τόσο στα κύτταρα της εγγενούς ανοσιακής απάντησης, συμπεριλαμβανομένων των NK κυττάρων, όσο και στα T κύτταρα της επίκτητης ανοσιακής απάντησης ρυθμίζοντας τη χημειοταξία, τη προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των ανωτέρω κυττάρων [126]. Η ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας οδού της p38 MAPK συντελεί στην ταχεία παραγωγή IFN-γ από τα NK κύτταρα. Επιπλέον με τη ρύθμιση της παραγωγή της IFN-γ συμμετέχει στη διαφοροποίηση και απόπτωση των T κυττάρων [124].

Όσον αφορά στο ρόλο της ενδοκυττάριας οδού της p38 MAPK στην HBV λοίμωξη, τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι αντικρουόμενα και αφορούν κυρίως σε πειραματικά μοντέλα με διαγονιδιακά γονίδια και κυτταρικές σειρές με καρκινικά κύτταρα. Δεδομένα σε καρκινικά κύτταρα Huh-7 έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της p38 MAPK

είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του HBV στα Huh-7, [143]. Μελέτη όμως σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος έδειξε πως η HBx πρωτεΐνη οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης HURP (hepatoma upregulated protein) μέσω της ενεργοποίησης της p38 MAPK σηματοδοτικής οδού με αποτέλεσμα την εμφάνιση αντίστασης στην επαγόμενη από τη σισπλατίνη απόπτωση οδηγώντας κατ' αυτόν το τρόπο στην χρονιότητα της βλάβης [140].

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη:

- της ενεργοποίησης της p38 MAPK σε μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β και στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς αυτών
- της συσχέτισης της ενεργοποίησης της p38 MAPK με την ανταπόκριση στην αντική αγωγή στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β
- της παραγωγής IFN- γ στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και την πιθανή συσχέτισή της με την ενεργοποίηση της p38 MAPK

1. Ασθενείς

1.1 Ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β

Μελετήθηκαν 13 ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη, οι οποίοι παρακολουθούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο Ηπατολογικό Ιατρείο της Παθολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αναλυτικά, από τους 13 ασθενείς, οι 10 είχαν χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β (HBeAg αρνητική) και οι 3 ήταν ανενεργοί φορείς του ιού. Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε σε κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία για τη Μελέτη Ήπατος (European Association for the study of the Liver (EASL)) και το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) [140,146]. Συγκεκριμένα, η διάγνωση της χρόνιας HBV λοίμωξης βασίζεται στην παρουσία HBsAg για τουλάχιστον 6 μήνες (ή θετικό HBsAg και αρνητικό IgM anti-HBc). Η διάγνωση της HBeAg αρνητικής χρόνιας ηπατίτιδας Β βασίζεται: α) στην παρουσία HBsAg, την απουσία HBeAg και συνήθως θετικό anti-HBe τουλάχιστον από 6μήνου, β) σταθερά ή διαλειπόντως αυξημένες τρανσαμινάσες, γ) υψηλά επίπεδα HBV-DNA ορού (≥ 2.000 IU/mL) και δ) ιστολογικές αλλοιώσεις χρόνιας ηπατίτιδας

Ο χρόνιος ανενεργός φορέας του HBV χαρακτηρίζεται από την απουσία HBeAg, επίμονα φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες και χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα HBV DNA ορού (<2000IU/ml).

Η ανίχνευση του HBV-DNA πραγματοποιήθηκε με εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο πραγματικού χρόνου PCR (Cobas TaqMan HBV Test, Roche) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευστή στον ορό των ασθενών και το ιικό φορτίο εκφράστηκε ως IU/ml.

Οκτώ από τους 10 ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β υποβλήθηκαν σε βιοψία

ήπατος πριν την έναρξη της θεραπείας. Κανένας από τους ασθενείς της μελέτης δεν εμφάνιζε κλινικά ή ιστολογικά σημεία κίρρωσης. (Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1).

Όλοι οι ασθενείς ήταν αρνητικοί για τα αντισώματα έναντι του ιού της ηπατίτιδας δ (HDV) και του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) καθώς και του ιού της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Κανένας τους δεν εμφάνιζε κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα συμβατά με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, αλκοολική ηπατοπάθεια και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

Από τους δέκα ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη, οι μισοί έλαβαν αγωγή με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-2α (PEG-IFN-2a) και οι υπόλοιποι έλαβαν αγωγή με νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα. Όλοι οι ασθενείς μελετήθηκαν τόσο πριν την έναρξη της αντι-ικτικής αγωγής όσο και μετά την ιολογική και βιοχημική ανταπόκριση σε αυτή, όπως ορίζεται από τις οδηγίες για τη θεραπεία της HBV λοίμωξης, που έχουν θεσπιστεί από διεθνείς επιστημονικές εταιρείες [140, 146]. Συγκεκριμένα, 5 ασθενείς έλαβαν μονοθεραπεία με PEG-IFN-2a για τουλάχιστον 1 έτος. Από τους ασθενείς που πήραν μακροχρόνια αγωγή με νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα, τέσσερις έλαβαν αγωγή με τενοφοβίρη και ένας έλαβε αγωγή με τελμπιβουδίνη. Οι ασθενείς μελετήθηκαν μετά την έναρξη της αντι-ικτικής αγωγής και εφόσον είχε διαπιστωθεί η επίτευξη της ιολογικής ανταπόκρισης. Συγκεκριμένα οι ασθενείς που έλαβαν PEG-IFN-2a μελετήθηκαν μετά από 6 μήνες αγωγής, ενώ αυτοί που έλαβαν από του στόματος αγωγή με νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα μελετήθηκαν μετά από 12 μήνες αγωγής. Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται τα γενικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στην μελέτη.

Παράλληλα σαν υγιείς μάρτυρες μελετήθηκαν 3 άτομα που επιλέχτηκαν από το προσωπικό του Εργαστηρίου της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (1 άντρας και 2 γυναίκες, εύρος ηλικίας: 30-55 έτη), βάσει του αρνητικού ελέγχου που είχαν για τον ιό της ηπατίτιδα Β και C.

Πίνακας 1: Βασικά δημογραφικά, εργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη που εντάχθηκαν στη μελέτη.

	Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη (n=10)	Ασθενείς με χρόνια ανενεργό HBV λοίμωξη (n=3)
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	8 / 2	2 / 1
Ηλικία (έτη)*	45±11	43±24
Τρόπος μετάδοσης:		
Κάθετη/Άγνωστη	5 / 5	1 / 2
HBV-DNA (IU/ml) **	5522000±1125000	<2000
AST (IU/L)**	76±52	18±1
ALT (IU/L)**	153±100	16±2
γ GT (IU/L)**	29±15	15±1
ALP (IU/L)**	76±30	59±14
Αλβουμίνη (g/dl)**	4,20±0,36	4,06±0,30
INR**	1,30±0,60	1,10±0,72
Βιοψία ήπατος**	7	1
Χρόνια ηπατίτιδα	4	0
Ήπια ηπατιτιδική δραστηριότητα	3	0
Στεατοηπατίτιδα	0	1

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή±τυπική απόκλιση, *Ηλικία στο χρόνο πραγματοποίησης της μελέτης, **Ιστολογικά ευρήματα προ έναρξης αγωγής για τους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη.

2. Μέθοδοι

Πειράματα σε μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος

2.1 Απομόνωση, ψύξη και απόψυξη των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)

Τα PBMCs απομονώθηκαν από φρέσκο ηπαρινισμένο φλεβικό αίμα με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης υπό κλίση πυκνότητας με τη χρήση φικόλης (Ficoll-Hyraque, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany) [147, 148]. Η λογική της μεθόδου αυτής στηρίζεται στο γεγονός ότι τα PBMCs (μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) έχουν διαφορετική πυκνότητα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και από τα κοκκιοκύτταρα. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι τα μονοπύρηννα μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζουν ένα νέφωμα πάνω από τη φικόλη, ενώ το πλάσμα και τα αιμοπετάλια βρίσκονται ακριβώς πιο πάνω και τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα κοκκιοκύτταρα καθιζάνουν κάτω από τη φικόλη.

Αναλυτικότερα, η αιμοληψία γινόταν σε σύριγγες 20ml ή φιαλίδια τα οποία περιείχαν ηπαρίνη σε τέτοια ποσότητα, που με το πέρας της αιμοληψίας να αντιστοιχούν 5 units ηπαρίνης σε 1ml ολικού αίματος. Στη συνέχεια, σε θάλαμο νηματικής ροής, το αίμα στοιβαζόταν σε μπουκαλάκια τύπου Falcon (Corning® Centrifuge Tubes, Corning Incorporated, Tewksbury, USA) πάνω σε φικόλη έτσι ώστε η αναλογία φικόλης προς το αίμα να είναι 1:1 έως 1:1.5. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές ανά λεπτό (800 g) για 20 λεπτά χωρίς φρένο στους 20°C. Με το πέρας της φυγοκέντρησης υπήρχαν οι διακριτές στοιβάδες που περιγράφονται πιο πάνω. Η στοιβάδα των PBMCs συλλεγόταν προσεχτικά με πουάρ έτσι ώστε να μη γίνεται αναρρόφηση φικόλης και μεταφερόταν σε άλλο Falcon. Στο

Falcon γινόταν προσθήκη RPMI 1640 (RPMI 1640 με L-Glutamine και με Phenol Red, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany) μέχρι να γεμίσει. Ακολουθούσαν δύο πλύσεις στις 1800rpm για 8 λεπτά και 1700rpm για 7 λεπτά αντίστοιχα. Πριν από κάθε πλύση το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε RPMI 1640. Μετάξύ της πρώτης και δεύτερης πλύσης τα PBMCs μετρούνταν. Με το πέρας της δεύτερης πλύσης, το ίζημα διαλυόταν εκ νέου σε διάλυμα που περιέχει 75% Fetal Calf Serum, 15% RPMI 1640 και 10% DMSO (PAA Laboratories GmbH). Ο όγκος που διαλύονταν τα κύτταρα ήταν τέτοιος, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι $5-10 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Σε κάθε κρυοφιαλίδιο (Corning® 1.2mL External Threaded Polypropylene Cryogenic Vial) μεταφερόταν 1ml ($5-10 \times 10^6$ κύτταρα). Τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνταν σε ειδικά δοχεία (Freezing container, Nalgene® Mr. Frosty) στα οποία περιέχονταν ισοπροπανόλη (Sigma Aldrich, USA) και στη συνέχεια τοποθετούνταν για 20-24 ώρες στους -80°C . Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχανόταν η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας των κυττάρων. Στη συνέχεια ακολουθούσε η μεταφορά τους στο υγρό άζωτο (-210°C).

Κατά τη διαδικασία της απόψυξης τα PBMCs μεταφέρονταν από το υγρό άζωτο σε δοχείο που περιείχε μικρή ποσότητα υγρού αζώτου στο δωμάτιο κυτταροκαλλιεργειών. Το κρυοφιαλίδιο τοποθετούνταν στη συνέχεια σε υδατόλουτρο στους 37°C και με μικρές κυκλικές κινήσεις παρέμενε στο νερό μέχρι να λιώσει το περιεχόμενο και να παραμείνει μια μικρή ποσότητα πάγου στο κρυοφιαλίδιο. Μετά από ψεκασμό του κρυοφιαλιδίου με 70% αιθανόλη μεταφερόταν στη συνέχεια στο θάλαμο νηματικής ροής και ακολουθούσε προσθήκη καλλιεργητικού υλικού (σταγόνα-σταγόνα) σε αυτό το οποίο βρισκόταν στους 37°C μέχρι αυτό να γεμίσει. Ως καλλιεργητικό υλικό χρησιμοποιήθηκε RPMI

1640 που περιείχε φιλτραρισμένο 5% FBS (FBS "Gold", Heat Inactivated, PAA Laboratories GmbH), πενικιλίνη 1000 Units/ml και στρεπτομυκίνη 0.1mg/ml (Penicillin/Streptomycin -100x-, PAA Laboratories GmbH).

Το περιεχόμενο του κρυοφιαλιδίου στη συνέχεια μεταφερόταν σταγόνα-σταγόνα σε ένα Falcon 50ml που περιείχε καλλιεργητικό υλικό στους 37°C. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1800rpm για 8 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου και την επαναδιάλυση του ιζήματος σε καλλιεργητικό υλικό, ακολουθούσε δεύτερο πλύσιμο και φυγοκέντρηση στις 1700rpm για 7 λεπτά. Στη συνέχεια το ίζημα επαναδιαλυόταν σε μικρή ποσότητα καλλιεργητικού υλικού ανάλογα με το αριθμό των αναμενόμενων PBMCs. Μικρή ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων αναδευόταν με Trypan Blue και ακολουθούσε μέτρηση του συνολικού αριθμού των PBMCs και υπολογισμός της βιωσιμότητάς τους η οποία ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μεγαλύτερη από 95%. Στη συνέχεια τα PBMCs διαλύονταν εκ νέου σε όγκο τέτοιο καλλιεργητικού υλικού προκειμένου να επιτύχουμε συγκέντρωση κυττάρων 10^6 /ml.

2.2 Διεγέρτες

Χρησιμοποιήθηκαν μη ειδικοί διεγέρτες τόσο στις κυτταροκαλλιέργειες για τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής όσο και στις υπόλοιπες ανοσολογικές μεθόδους. Οι μη ειδικοί διεγέρτες επιλέχθηκαν βάσει της ικανότητάς τους να επάγουν την ενεργοποίηση διαφόρων κινασών, συμπεριλαμβανομένης της p38 MAPK, όπως και την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-2, IL-4 και IL-10 καθώς και της IFN- γ [149, 150]. Συγκεκριμένα, οι μη ειδικοί διεγέρτες που

χρησιμοποιήθηκαν ήταν το arsenite (Sigma Aldrich, USA), ο συνδυασμός των phorbol myristate acetate (PMA, Sigma Aldrich, USA) και ionomycin (Sigma Aldrich, USA), καθώς και οι συνδυασμοί των ανασυνδυασμένων ανθρώπινων κυτταροκινών ιντερλευκίνη-12 (recombinant human interleukin 12, rhIL-12, R&D Mineapolis, USA) και ιντερλευκίνη-2 (recombinant human interleukin 2, rhIL-2, R&D Mineapolis, USA) και των ιντερλευκίνη-12 με την ιντερλευκίνη-18 (recombinant human interleukin 18, rhIL-18, R&D Mineapolis, USA).

2.3 Καλλιέργειες των PBMCs παρουσία μη ειδικών διεγερτών για την ανάλυσή τους σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής

Τα PBMCs καλλιεργήθηκαν παρουσία μη ειδικών διεγερτών προκειμένου να αναλυθούν σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής, όπως έχει περιγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες [151]. Αναλυτικά, για την καλλιέργεια των PBMCs χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 48 πηγαδιών επίπεδου πυθμένα (Cell Bind 48-well plate, flat bottom, sterile, Corning Incorporated). Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν περί τα 500.000 κύτταρα τα οποία διεγέρθηκαν αντίστοιχα με τη προσθήκη arsenite (τελική συγκέντρωση, 500μM), PMA (τελική συγκέντρωση, 50ng/ml) και ionomycin (τελική συγκέντρωση, 10μg/ml), συνδυασμό rhIL-12 (τελική συγκέντρωση, 20ng/ml) με rhIL-2 (τελική συγκέντρωση, 20ng/ml) και συνδυασμό rhIL-12 (τελική συγκέντρωση, 20ng/ml) με rhIL-18 (τελική συγκέντρωση, 25ng/ml). Σε τέσσερα πηγάδια δεν προστέθηκαν διεγέρτες αποτελώντας έτσι τα πηγάδια – μάρτυρες. Κάθε συνθήκη/διεγέρτης επαναλήφθηκε έως και τέσσερις φορές. Τα κύτταρα

καλλιέργηθηκαν σε κλίβανο στους 37° C και σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα με συνεχή παροχή 5% CO₂.

Σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές της επώασης των κυττάρων (30, 60, 120 και 240 λεπτά) και για καθένα από τους τέσσερις διεγέρτες και κύτταρα-μάρτυρες προστέθηκε διάλυμα 10% μπρεφελδίνης προκειμένου να ανασταλεί η εξωκυττάρωση των κυτταροκινών και τελικά η συσσώρευσή τους στο σύμπλεγμα του Golgi. Μετά την προσθήκη του διαλύματος 10% μπρεφελδίνης, τα κύτταρα επώασθηκαν στον κλίβανο για άλλα 10 λεπτά στις προαναφερθείσες συνθήκες. Ακολούθως ξεπλύθηκαν με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει υδροχλωρικό οξύ και 2% αλβουμίνη βόειου ορού (2% bovine serum albumin - tris buffered solution, 2% BSA -TBS) και μονιμοποιήθηκαν με τη προσθήκη διαλύματος TBS με 80% μεθανόλη (80% methanol-TBS). Τα κύτταρα εν συνεχεία αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την χρησιμοποίησή τους στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής.

2.4. Προσδιορισμός της ενεργοποίησης της p38 MAPK και της σχετιζόμενης με αυτήν έκφρασης κυτταροκινών με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry analysis)

Προκειμένου να προσδιορισθεί η ενεργοποίηση της p38 MAPK τόσο στο σύνολο των T λεμφοκυττάρων όσο και στους υποπληθυσμούς αυτών (CD56+ και CD56- T λεμφοκύτταρα) και η σχετιζόμενη με την ενεργοποίηση της p38 MAPK έκφραση κυτταροκινών (IFN- γ , IL-10) προχωρήσαμε στη συνέχεια σε χρώση των PBMCs, που είχαν καλλιιεργηθεί υπό τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν (δες παράγραφος 2.3),

με διάφορα αντισώματα σύμφωνα με πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη [151].

Χρησιμοποιήθηκαν φωσφοειδικά αντισώματα έναντι των επιφανειακών αντιγόνων CD3 (FITC mouse anti-human CD3, BD Biosciences Pharmingen, USA) και CD56 (CD56-PC5, Beckman Coulte Company, France), έναντι της φωσφορυλιωμένης p38 MAPK (Alexa Fluor 647 Mouse anti-p38 MAPK, pT180/ pY182, BD Biosciences Pharmingen, USA), έναντι της IL-10 (PE Anti-Human and Viral Pharmingen IL-10, BD Biosciences Pharmingen, USA) και έναντι της IFN- γ (FITC Mouse Anti-Human IFN- γ , BD Biosciences Pharmingen, USA). Οι συνδυασμοί των αντισωμάτων ήταν οι ακόλουθοι: συνδυασμός των φωσφοειδικών αντισωμάτων έναντι του CD3, του CD56, της φωσφορυλιωμένης p38 MAPK και της IL-10 είτε συνδυασμός των αντισωμάτων έναντι του CD56, της φωσφορυλιωμένης p38 MAPK και της IFN- γ . Τα κύτταρα μάρτυρες συζεύχθηκαν μόνο με τα φωσφοειδικά αντισώματα έναντι των επιφανειακών αντιγόνων.

Τα PBMCs αφού ξεπλύθηκαν με διάλυμα 2% BSA-TBS μία φορά, επώσθηκαν με 5μL ανθρώπινου ορού για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως προστέθηκαν οι συνδυασμοί των φωσφοειδικών αντισωμάτων με τα οποία επώσθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι, για μία ώρα. Μετά το ξέπλυμα με διάλυμα 2% BSA-TBS τα κύτταρα μεταφέρθηκαν και αναλύθηκαν με το κυτταρόμετρο ροής (FACS, Calibur, Becton Dickinson, USA) με τη βοήθεια του λογισμικού CellQuest™ Pro.

2.5. Καλλιέργεια PBMCs για τον προσδιορισμό στη συνέχεια της παραγωγής IFN- γ παρουσία ή μη αναστολέα της p38 MAPK, SB203540 με τη μέθοδο ELISpot

PBMCs των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β (των 10 ασθενών με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη και των 3 ανενεργών φορέων) και των 3 υγιών μαρτύρων καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 96 πηγαδιών με επίπεδο πυθμένα (Cell Bind 96-well plate, flat bottom, sterile, Corning Incorporated) με ή χωρίς τη προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK SB203540 (Sigma Aldrich, USA), όπως έχει ήδη περιγραφεί [149]. Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 100.000 κύτταρα τα οποία μετά 30 λεπτά επώασης με τον SB203540 (τελική συγκέντρωση 10 μ M) διεγέρθηκαν αντίστοιχα με τη προσθήκη του συνδυασμού rhIL-12 (τελική συγκέντρωση, 10 ng/ml και 5 ng/ml) και rhIL-2 (τελική συγκέντρωση, 10ng/ml και 5 ng/ml) και του συνδυασμού rhIL-12 (τελική συγκέντρωση, 10 ng/ml και 5 ng/ml) μαζί με rhIL-18 (τελική συγκέντρωση, 10 ng/ml και 5 ng/ml). Τα κύτταρα επώασθηκαν για περίπου ένα 24ώρο σε κλίβανο στους 37 $^{\circ}$ C και σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα με συνεχή παροχή 5% CO $_2$. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν PBMCs στα οποία δεν προστέθηκε κανένας διεγέρτης και ως θετικοί μάρτυρες PBMCs που διεγέρθηκαν με φυτοαιμοσυγκολλητίνη (τελική συγκέντρωση 200 μ g/ml) (PHA, Sigma Aldrich, USA). Σημειώνεται πως κάθε συνθήκη επαναλήφθηκε σε τρία πηγάδια του καλλιεργητικού πιάτου.

2.6. Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISpot)

Σε πιάτα 96 πηγαδιών επίπεδου πυθμένα (96-well plate, Millipore, Bedford, Mass, USA) προστέθηκαν 100μl ανθρώπινης IFN-γ (μονοκλωνικό αντίσωμα 1-D1K) (Mabtech AB, Sweden) και επώασθηκαν για μία νύχτα στους 4° C. Ακολούθως πλύθηκαν 5 φορές με 200μl διαλύματος PBS και επώασθηκαν με 200μl καλλιεργητικού υλικού αποτελούμενου από RPMI 1640 με L-γλουταμίνη εμπλουτισμένο με 10% FBS για 30 λεπτά σε συνθήκες δωματίου. Αφού αφαιρέθηκε το καλλιεργητικό υλικό από το πιάτο προστέθηκαν στη συνέχεια τα PBMCs από τις κυτταροκαλλιέργειες (δες παράγραφο 2.5) και το πιάτο επώασθηκε στους 37° C σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα με συνεχή παροχή 5% CO₂.

Μετά επώαση 12 ωρών στις παραπάνω συνθήκες, αφαιρέθηκαν τα κύτταρα από το πιάτο, το οποίο ακολούθως πλύθηκε πέντε φορές με διάλυμα PBS. Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 100 μl αντισώματος ανίχνευσης (μονοκλωνικό αντίσωμα 7-B6-1 έναντι της IFN-γ συνδεδεμένο με το ένζυμο βιοτίνη) (Mabtech AB) και ακολούθησε επώαση 2 ωρών. Μετά από νέο πλύσιμο (πέντε φορές με διάλυμα PBS), προστέθηκε το ένζυμο στρεπταβιδίνη-αλκαλική φωσφατάση (Mabtech AB) και το πιάτο επώασθηκε για 1 ώρα. Στο τέλος το πιάτο πλύθηκε και πάλι πέντε φορές με διάλυμα PBS και ακολούθως προστέθηκε το έτοιμο προς χρήση υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης, το διάλυμα BCIP/NBT-plus (Mabtech AB). Η διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης έγινε με πλύση του πιάτου με αποσταγμένο νερό.

Οι κηλίδες (spots) καταμετρήθηκαν με αυτοματοποιημένο αναγνώστη ELISpot (AID, ELISpot reader, version 3.5).

Για τον υπολογισμό των κηλίδων που αφορά σε κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των κηλίδων των τριών πηγαδιών για κάθε συνθήκη από τον οποίο αφαιρέθηκε ο αριθμός των κηλίδων του αρνητικού μάρτυρα.

2.7. Καλλιέργειες PBMCs για τον προσδιορισμό στη συνέχεια της παραγωγής IFN- γ με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580 με τη μέθοδο της ELISA

Σε καλλιεργητικά πιάτα 48 πηγαδιών (48-well plate, Millipore) προστέθηκαν περί τα 500.000 PBMCs από τις υπό μελέτη ομάδες ανά πηγάδι και επώασθηκαν για μία ώρα στους 37° C σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα με συνεχή παροχή 5% CO₂. Στη συνέχεια προστέθηκε στα μισά πηγάδια 10μl διαλύματος του αναστολέα SB203580 (τελική συγκέντρωση 2 μM), ενώ στα υπόλοιπα δεν προστέθηκε ο εν λόγω αναστολέας. Μετά από επώαση 30 λεπτών στις ανωτέρω συνθήκες τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με τη προσθήκη των διεγερτών rhIL-12 (τελική συγκέντρωση, 20ng/ml) σε συνδυασμό με rhIL-2 (τελική συγκέντρωση, 20ng/ml) και rhIL-12 (τελική συγκέντρωση, 20ng/ml) σε συνδυασμό με rhIL-18 (τελική συγκέντρωση, 25ng/ml) έτσι ώστε σε κάθε συνθήκη η παραγωγή της IFN- γ να προσδιορισθεί τόσο χωρίς όσο και μετά τη προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK. Σημειώνεται πως ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε διεγέρτης.

Μετά από επώαση 48 ωρών το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού μεταφέρθηκε σε erpendorfs, φυγοκεντρήθηκε στις 7000 rpm και τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20° C μέχρι τη χρήση τους.

2.8 Προσδιορισμός με ELISA της παραγωγής IFN-γ σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών PBMCs με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580

Ο προσδιορισμός της παραγωγής της IFN- γ στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών PBMCs μετά ενεργοποίηση αυτών με τους μη ειδικούς διεγέρτες rhIL-12 και rhIL-2, rhIL-12 και rhIL-18 με ή χωρίς τη παρουσία του αναστολέα της p38 MAPK έγινε με τη ELISA (Human IFN-γ Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων μετρήθηκε με ELISA reader (Opsys MR Microplate Reader, Dynex Technologies, USA) στα 450-630 nm.

Στο πιάτο της ELISA η κάθε συνθήκη μελετήθηκε εις διπλούν (δύο διαδοχικά πηγάδια) και η οπτική πυκνότητα που αντιστοιχεί σε κάθε συνθήκη προέκυψε από το μέσο όρο των πυκνοτήτων των δύο πηγαδιών που αντιστοιχούσαν σε αυτή μετά την αφαίρεση της οπτικής πυκνότητας του υπερκειμένου των κυττάρων στα οποία δεν είχε προστεθεί διεγέρτης (αρνητικός μάρτυρας).

Η αντιστοίχιση δε των οπτικών πυκνοτήτων με τη συγκέντρωση της IFN-γ σε κάθε υπερκείμενο έγινε με τη βοήθεια της καμπύλης συγκέντρωσης IFN-γ που προέκυψε

χρησιμοποιώντας τα διαλύματα με γνωστή συγκέντρωση IFN- γ που περιέχονται στο kit.

3. Στατιστική ανάλυση

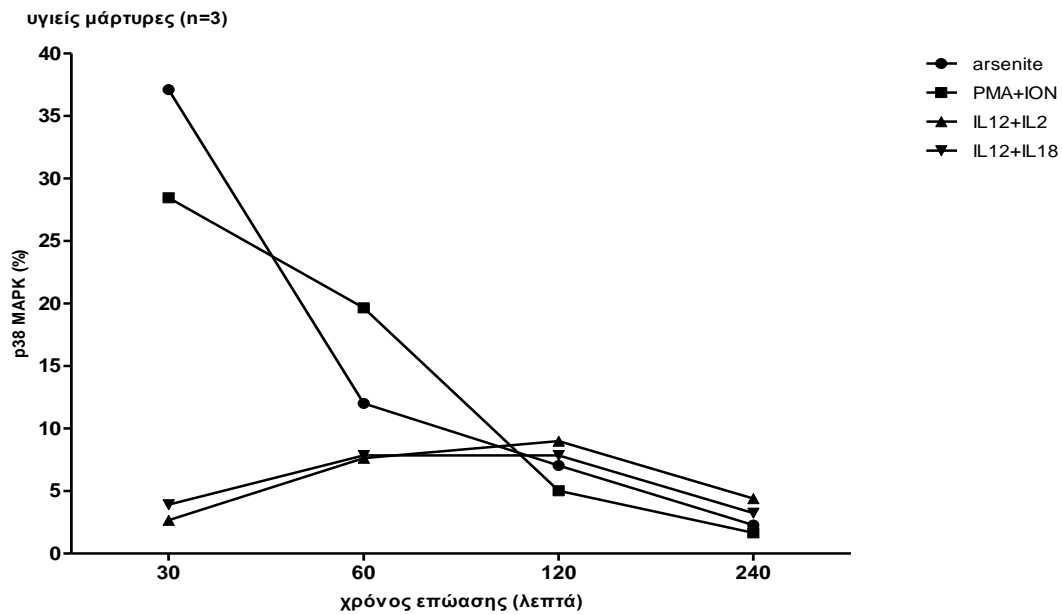
Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistic, 17^η έκδοση. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστά (%) και ως μέση τιμή \pm σταθερά απόκλιση. Τα ευρήματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη στατιστική μέθοδο του unpaired t-test. Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η διαφορά εκείνη όπου η διπλής κατεύθυνσης τιμή του p ήταν μικρότερη του 0.05 ($p < 0.05$).

4. Αποτελέσματα

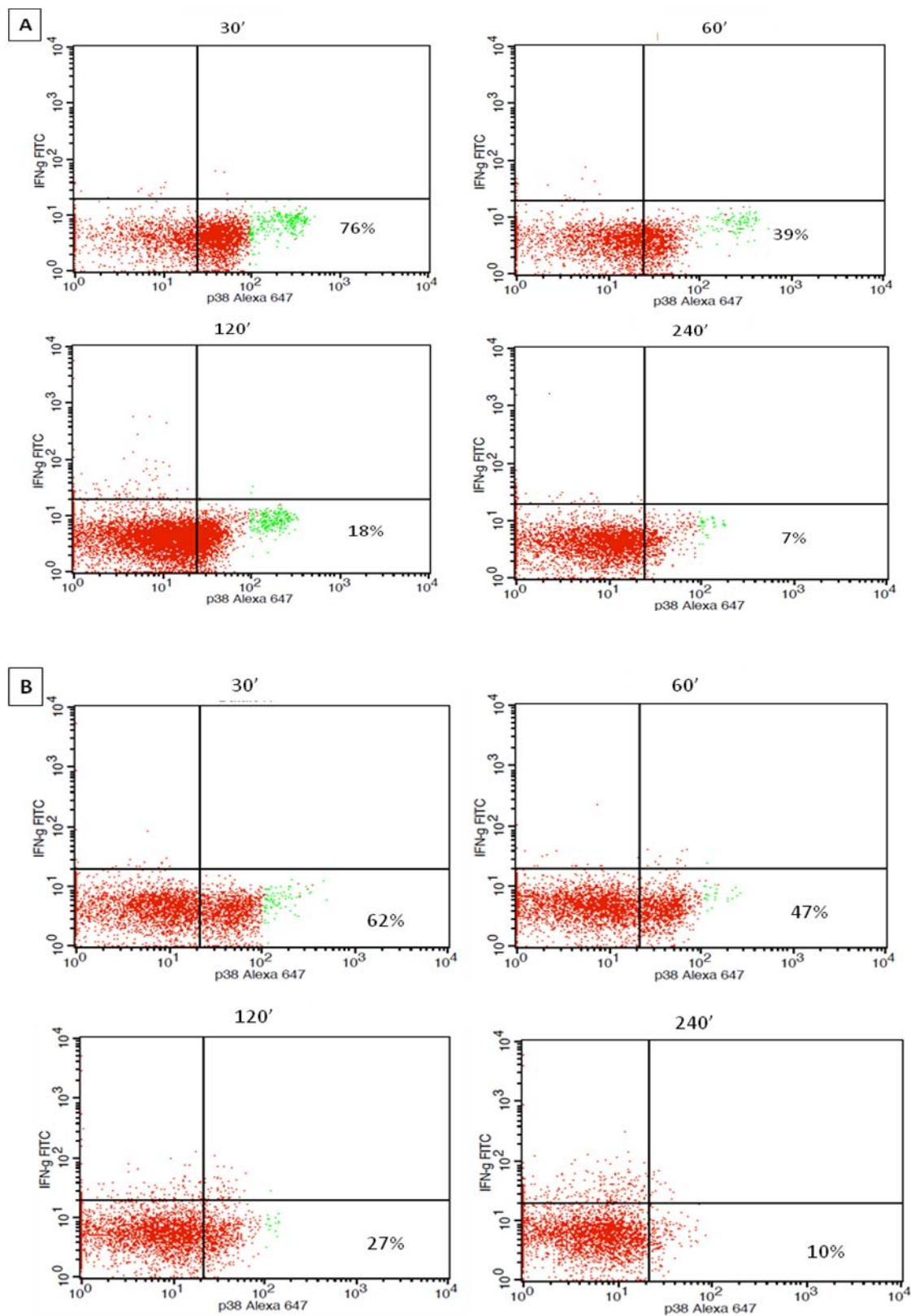
4.1 Κινητική της ενεργοποίησης της p38 MAPK σε σχέση με το χρόνο επώασης των κυττάρων

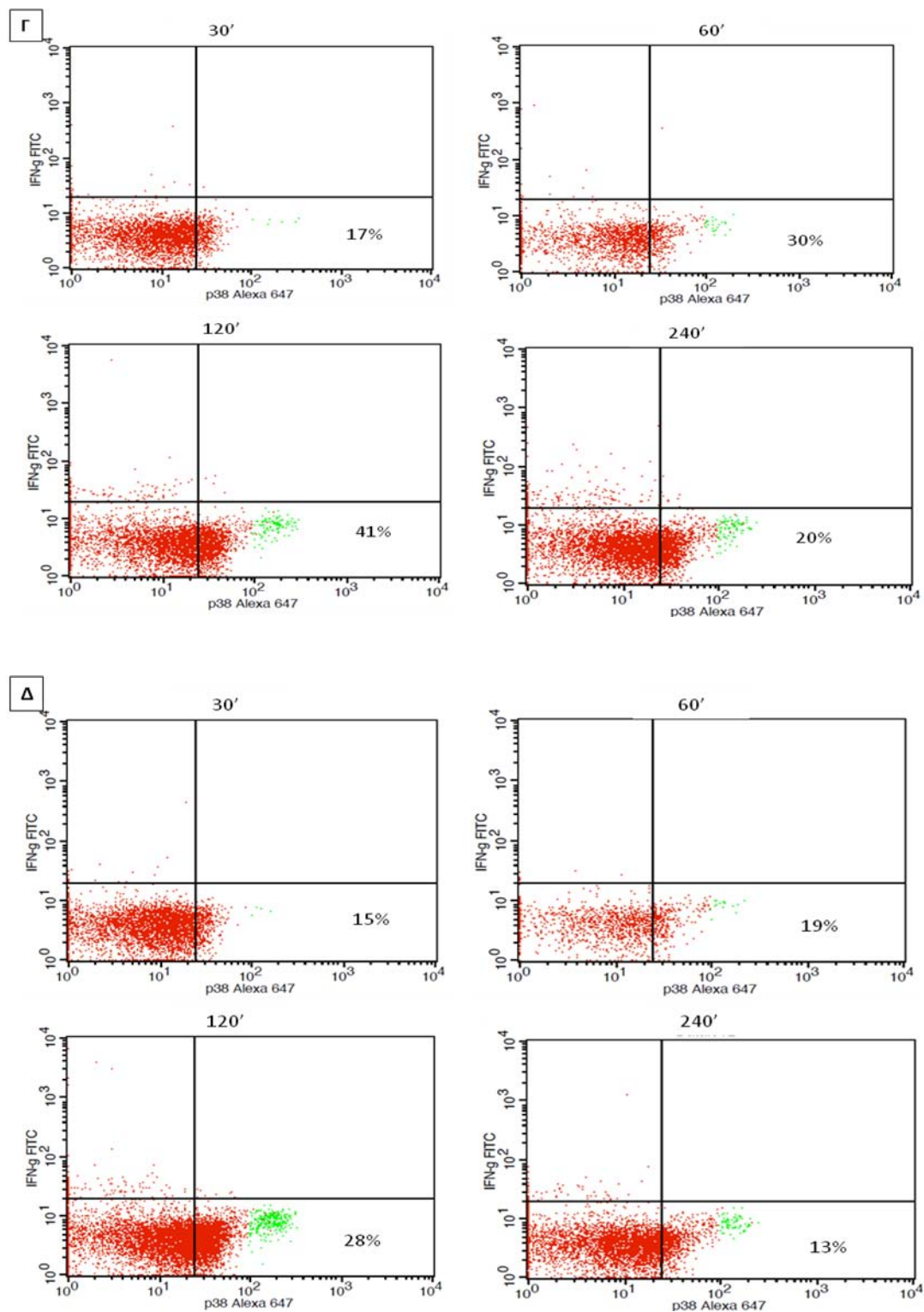
Η κινητική της ενεργοποίησης της p38 MAPK μελετήθηκε με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής τόσο στο σύνολο των PBMCs όσο και στους τέσσερις κυτταρικούς υποπληθυσμούς (CD3-, CD3+, CD56-, CD56+) μετά 30, 60, 120 και 240 λεπτά επώασης των κυττάρων των τριών υπό μελέτη ομάδων με τους επιμέρους μη ειδικούς διεγέρτες arsenite, PMA και ιονομυκίνη, και τους συνδυασμούς των ανασυνδυασμένων ανθρώπινων κυτταροκινών rhIL12 με rhIL2 και rhIL12 με rhIL18.

Διαπιστώθηκε ότι μετά τη διέγερση των κυττάρων με το arsenite και το συνδυασμό των PMA με ιονομυκίνη που αποτελούσαν και τους ισχυρότερους διεγέρτες, τα υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs εμφανίζονταν στα 30 λεπτά επώασης με σταδιακή μείωση των ποσοστών αυτών στις τρεις επόμενες χρονικές στιγμές ενώ τα μικρότερα ποσοστά παρατηρούνταν στα 240 λεπτά επώασης. Όσον αφορά στους συνδυασμούς των κυτταροκινών, τα μικρότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs παρατηρήθηκαν στα 30 λεπτά επώασης ενώ τα μεγαλύτερα ποσοστά σημειώθηκαν στα 60 και 120 λεπτά επώασης. Τα ανωτέρω διαπιστώθηκαν σε όλες τις υπό μελέτη ομάδες τόσο στο σύνολο των PBMCs όσο και στους τέσσερις κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Ενδεικτικά δίνεται η κινητική της ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs των υγιών μαρτύρων στο διάγραμμα της εικόνας 1 και σε ασθενή με χρόνια ηπατίτιδα Β στα Facs Blots της εικόνας 2.



Εικόνα 1: Κινητική της ενεργοποίησης της p38 MAPK (%) σε 4 χρονικές στιγμές (30, 60, 120 και 240 λεπτά) επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στο σύνολο των PBMCs των υγιών μαρτύρων που συμμετείχαν στην μελέτη.



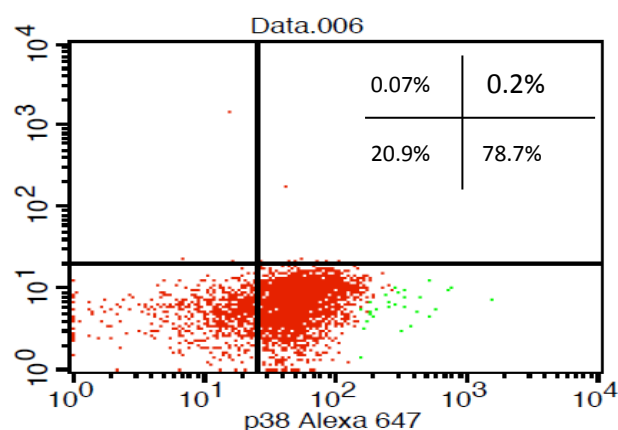


Εικόνα 2: Facs plots ασθενή με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη όπου φαίνεται η κινητική της ενεργοποίησης της p38 MAPK (% PBMCs) σε 4 χρονικές στιγμές (30, 60, 120 και 240 λεπτά) επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες (A. Arsenite, B. PMA και ionomycin, Γ. IL-12+IL18, Δ. IL-12+IL-2)

4.2 Ενεργοποίηση της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs στους τρεις υπό μελέτη πληθυσμούς

Η ενεργοποίηση της p38 MAPK προσδιορίστηκε με τη κυτταρομετρία ροής στα PBMCs των τριών υπό μελέτη πληθυσμών (3 υγιείς μάρτυρες, 10 ασθενείς με ενεργό χρόνια HBV λοίμωξη και 3 ανενεργοί φορείς της νόσου) μετά από 30, 60, 120 και 240 λεπτά επώασης με τους μη ειδικούς διεγέρτες arsenite, PMA και ionomycin και τους συνδυασμούς κυτταροκινών IL-12 και IL-2, IL-12 και IL-18 όπως περιγράφεται αναλυτικά στη μεθοδολογία των πειραμάτων παραπάνω.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό των PBMCs, στα οποία παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της p38 MAPK επί του συνόλου των PBMCs του υπό μελέτη ασθενούς για κάθε επιμέρους συνθήκη, όπως φαίνεται ενδεικτικά στο παράδειγμα της εικόνας 3.



Εικόνα 3: Facs plot των PBMCs ασθενούς με χρόνια ανενεργό HBV λοίμωξη μετά από 60 λεπτά επώασης παρουσία arsenite. Το ποσοστό της ενεργοποιημένης p38 MAPK στα PBMCs για τη συγκεκριμένη συνθήκη είναι 78.7%.

Ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β κατά τη φάση της ιαιμίας και πριν την έναρξη της αντιϊκής αγωγής εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Οι ανενεργοί φορείς της νόσου εμφάνιζαν τα υψηλότερα ποσοστά και από τις τρεις ομάδες. Οι εν λόγω διαφορές αφορούσαν όλες τις επιμέρους συνθήκες, δηλαδή όλους τους διεγέρτες και στις τέσσερις χρονικές στιγμές, και ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$) για την πλειοψηφία των συνθηκών μελέτης. Αναλυτικά τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs για όλες τις επιμέρους συνθήκες μελέτης καθώς και οι τιμές της p για τις διαφορές των εν λόγω ποσοστών μεταξύ των ομάδων ελέγχου παρουσιάζονται στους πίνακες 1 και 2 αντίστοιχα.

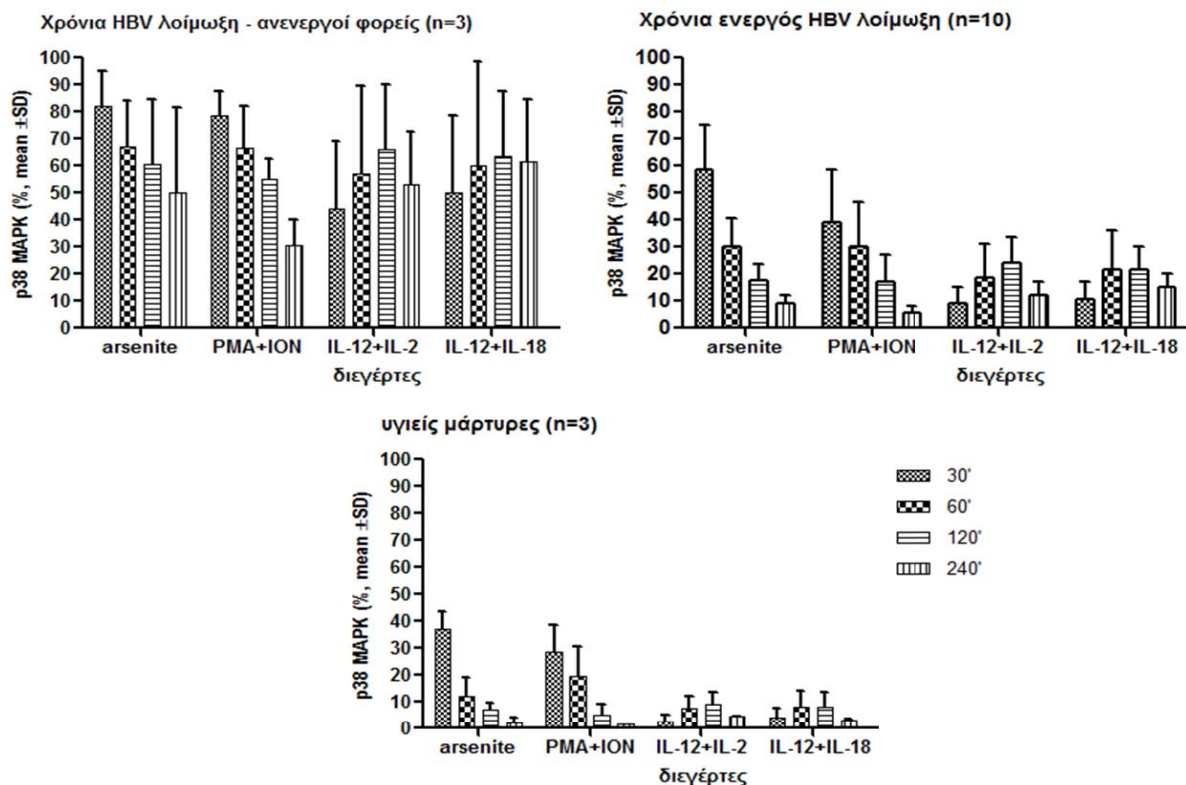
Πίνακας 1: Ενεργοποίηση της p38MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στις 3 ομάδες ελέγχου σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες. Οι ανενεργοί φορείς της HBV λοίμωξης παρουσίαζαν τα υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK σε όλες τις συνθήκες μελέτες, ενώ οι υγιείς μάρτυρες είχαν τα χαμηλότερα.

	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
Ανενεργοί φορείς της HBV λοίμωξης (n=3)	30'	82.18 \pm 13.13	78.52 \pm 20.55	43.86 \pm 25.14	50.33 \pm 28.46
	60'	67.24 \pm 16.63	66.58 \pm 15.29	57.05 \pm 32.42	59.85 \pm 35.59
	120'	60.62 \pm 23.77	54.86 \pm 7.77	65.88 \pm 24.23	63.68 \pm 24.14
	240'	49.96 \pm 31.66	30.60 \pm 9.50	52.96 \pm 19.48	61.42 \pm 23.34
Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη (n=10)	30'	59.11 \pm 17.01	42.89 \pm 20.55	8.83 \pm 6.02	10.81 \pm 6.13
	60'	31.26 \pm 11.1	30.19 \pm 16.16	18.82 \pm 12.24	21.76 \pm 14.26
	120'	18.58 \pm 7.19	16.98 \pm 10.02	24.22 \pm 9.46	21.86 \pm 8.13
	240'	9.13 \pm 3.24	5.40 \pm 2.46	11.92 \pm 5.08	14.97 \pm 4.96
Υγιείς μάρτυρες (n=3)	30'	31.77 \pm 6.51	28.45 \pm 10.10	2.66 \pm 2.42	3.91 \pm 3.56
	60'	12 \pm 6.88	19.66 \pm 10.72	19.7 \pm 10.3	7.85 \pm 6.35
	120'	7.04 \pm 2.43	5.02 \pm 3.83	8.99 \pm 4.45	7.85 \pm 5.78
	240'	2.28 \pm 1.58	1.66 \pm 0	4.39 \pm 0.26	3.23 \pm 0.38

Πίνακας 2: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης που αφορούν στη σύγκριση των ποσοστών ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs μεταξύ των ομάδων μελέτης για όλες τις συνθήκες μελέτης (δες δεδομένα πίνακα 1). Τα μαρκαρισμένα κελιά αφορούν στις στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$)

	Arsenite				PMA + ION				IL12+IL2				IL12+IL18			
	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs υγιείς μάρτυρες	0.05	0.018	0.022	0.018	0.279	0.330	0.082	0.019	0.119	0.918	0.023	0.072	0.049	0.137	0.019	0.009
Ανενεργοί φορείς vs υγιείς μάρτυρες	0.006	0.006	0.018	0.137	0.003	0.012	0.001	0.119	0.048	0.131	0.016	0.044	0.096	0.083	0.018	0.044
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs ανενεργοί φορείς	0.05	0.001	0.000	0.001	0.018	0.008	0.000	0.000	0.001	0.007	0.001	0.000	0.001	0.018	0.000	0.000

Τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στα διάγραμμα της εικόνας 4.



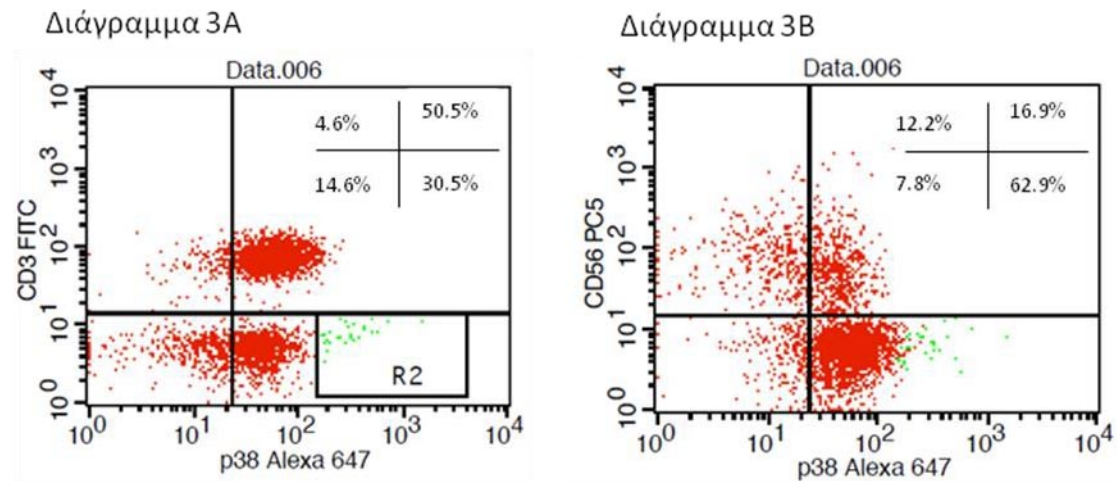
Εικόνα 4: Ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) των 3 υπό μελέτη ομάδων.

4.3 Ενεργοποίηση της p38 MAPK σε υποπληθυσμούς κυττάρων στους τρεις υπό μελέτη πληθυσμούς

Για να προσδιορισθεί η ενεργοποίηση της p38 MAPK τόσο στο σύνολο των T λεμφοκυττάρων (CD3+) όσο και στους υποπληθυσμούς αυτών (CD56+ και CD56- T λεμφοκύτταρα) χρησιμοποιήθηκαν φωσφοειδικά αντισώματα έναντι των επιφανειακών αντιγόνων CD3 και CD56.

Από τα γενόμενα πειράματα στους επιμέρους υποπληθυσμούς, τα υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK παρατηρήθηκαν στα CD3+ T λεμφοκύτταρα

και στα CD56- κύτταρα, όπως ενδεικτικά φαίνεται στα Facs plots της εικόνας 5. Το ανωτέρω αφορά και στους τρεις υπό μελέτη πληθυσμούς σε όλες τις συνθήκες της μελέτης μας.



Εικόνα 5: Facs plots των PBMCs ασθενούς με χρόνια ανενεργό HBV λοίμωξη μετά από 60 λεπτά επώασης παρουσία του διεγέρτη arsenite. Στο διάγραμματα 3A και 3B φαίνεται ότι τα CD3⁺ και τα CD56⁻ κύτταρα αντίστοιχα εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό ενεργοποίησης της p38 MAPK (50.5% και 62.9% αντίστοιχα).

Συγκρίνοντας τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στους επιμέρους κυτταρικούς υποπληθυσμούς των PBMCs, δηλαδή τα CD3⁺, CD3⁻, CD56⁺ και CD56⁻ κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι οι ανενεργοί φορείς εμφάνιζαν τα υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης για όλες τις συνθήκες μελέτης. Τα χαμηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης παρατηρήθηκαν στους υγιείς μάρτυρες. Τα εύρηματα είναι ανάλογα με αυτά που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη παράγραφο για το σύνολο των PBMCs.

Τα ποσοστά της ενεργοποίησης της p38 MAPK στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς των PBMCs για τις τρεις ομάδες μελέτης παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες

3, 4 και 5. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται οι τιμές p που προέκυψαν από τη σύγκριση των ποσοστών ενεργοποίησης της $p38$ MAPK στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς μεταξύ των τριών ομάδων μελέτης.

Πίνακας 3: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στους 4 κυτταρικούς υποπληθυσμούς (% μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) στους ανενεργούς φορείς του HBV σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες.

Ανενεργοί φορείς (n=3)	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+ κύτταρα	30'	50.48±9.33	53.04±5.86	28.09±19.94	30.34±21.73
	60'	41.0±10.96	52.04±11.97	33.7±22.11	36.19±27.41
	120'	33.47±13.94	40.4±7.49	42.18±18.14	42.29±20.03
	240'	22.68±13.38	23.37±8.18	36.17±12.31	35.68±15.77
CD3- κύτταρα	30'	30.09±3.99	23.84±2.16	17.96±6.48	18.74±4.15
	60'	25.76±4.27	17.31±5.57	20.12±5.49	20.18±6.4
	120'	24.28±7.38	18.87±5.04	23.65±4.26	23.11±5.14
	240'	17.32±5.46	14.76±6.61	22.07±7.28	22.63±6.14
CD56+ κύτταρα	30'	13.57±9.98	8.20±4.72	5.51±4.92	5.51±4.92
	60'	11.45±8.97	5.36±3.89	10.15±10.1	10.15±10.1
	120'	10.35±7.63	4.47±3.87	10.81±9.29	9.1±7.31
	240'	7.24±5.58	1.73±1.19	8.33±6.41	9.95±6.99
CD56- κύτταρα	30'	70.93±5.67	71.34±8.35	39.75±22.11	42.04±25.81
	60'	59.42±12.03	62.73±13.17	49.05±28.85	49.05±28.85
	120'	51.32±17.77	55.04±8.71	55.91±16.14	56.46±19.19
	240'	43.49±27.05	34.8±13.24	46.03±13.15	54.68±21.77

Πίνακας 4: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στους 4 κυτταρικούς υποπληθυσμούς (% μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη στη φάση της αιμιάς σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη (n=10)	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+ κύτταρα	30'	38.93 \pm 14.92	32.58 \pm 17.6	3.09 \pm 2.93	3.93 \pm 2.52
	60'	16.36 \pm 9.33	30.43 \pm 18.05	9.61 \pm 7.4	9.07 \pm 6.33
	120'	14.72 \pm 18.06	17.32 \pm 11.58	14.76 \pm 9.16	14.84 \pm 9.09
	240'	9.09 \pm 1.61	4.25 \pm 3.10	6.8 \pm 5.02	8.17 \pm 5.58
CD3- κύτταρα	30'	15.99 \pm 3.99	8.6 \pm 1.68	2.79 \pm 0.97	4.22 \pm 1.37
	60'	8.85 \pm 4.18	6.93 \pm 2.4	7.99 \pm 3.66	7.45 \pm 3.16
	120'	6.82 \pm 4.2	3.59 \pm 1.27	8.31 \pm 3.35	7.81 \pm 3.73
	240'	4.58 \pm 3.22	2.1 \pm 0.95	6.67 \pm 5	6.17 \pm 3.42
CD56+ κύτταρα	30'	3.51 \pm 30.1	1.53 \pm 0.92	0.31 \pm 0.19	1.47 \pm 1.05
	60'	1.29 \pm 0.53	1.18 \pm 1.23	0.75 \pm 0.36	0.91 \pm 0.73
	120'	0.89 \pm 0.45	0.57 \pm 0.44	1.05 \pm 0.46	1.16 \pm 0.66
	240'	0.46 \pm 0.27	0.37 \pm 0.62	0.67 \pm 0.48	0.87 \pm 0.41
CD56- κύτταρα	30'	49.73 \pm 22.49	38.68 \pm 19.02	8.58 \pm 6.36	8.29 \pm 6.8
	60'	29.31 \pm 10.23	30.35 \pm 16.82	18.7 \pm 12.43	20.45 \pm 11.63
	120'	18.04 \pm 8.40	17.17 \pm 10.51	23.52 \pm 9.67	20.96 \pm 7.69
	240'	8.15 \pm 3.01	7.01 \pm 4.03	11.43 \pm 5.04	14.62 \pm 5.8

Πίνακας 5: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στους 4 κυτταρικούς υποπληθυσμούς (% μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) στους υγιείς μάρτυρες σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες.

Υγιείς μάρτυρες (n=3)	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+ κύτταρα	30'	36.29±5.89	27.71±4.25	2.69±2.6	3.06±2.48
	60'	11.52±6.62	18.53±4.32	8.46±3.19	6.35±3.6
	120'	5.04±1.72	8.20±5.73	8.22±5.88	8.13±6.63
	240'	1.7±0.61	1.01±0.04	3.43±0.09	2.83±0.88
CD3- κύτταρα	30'	13.02±5.13	8.44±4.89	2.25±1.7	3.21±0.56
	60'	4.49±1.37	5.76±3.91	6.16±1.39	4.38±1.52
	120'	3.63±1.77	2.18±0.59	3.32±0.97	3.45±0.8
	240'	2.39±0.09	0.96±0.07	3.47±0.76	2.83±0.52
CD56+ κύτταρα	30'	1.41±0.07	0.87±0.63	0.96±0.46	0.28±0.05
	60'	0.79±0.21	0.41±0.24	0.29±0.04	0.21±0.11
	120'	0.38±0.29	0.36±0.05	0.31±0.1	0.24±0.09
	240'	0.17±0.21	0.01±0.0	0.24±0.23	0.24±0.2
CD56- κύτταρα	30'	35.23±6.81	27.25±9.71	2.5±2.35	3.54±3.5
	60'	11.02±7.02	19.25±10.77	7.25±4.26	7.46±6.25
	120'	6.38±2.061	7.38±7.63	8.49±4.35	7.44±5.68
	240'	2.06±1.32	1.65±0.0	4.04±0.44	2.99±0.18

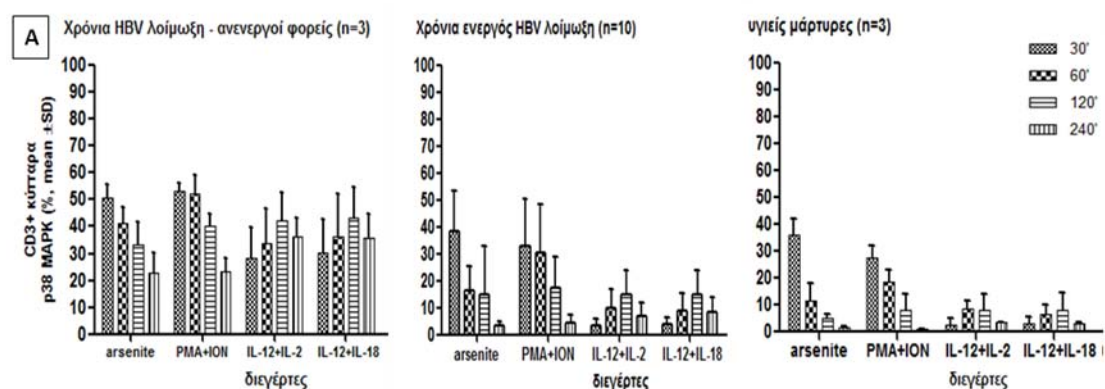
Πίνακας 6: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης που αφορούν στη σύγκριση των ποσοστών ενεργοποίησης της p38 MAPK στους 4 κυτταρικούς πληθυσμούς μεταξύ των ομάδων μελέτης για όλες τις συνθήκες μελέτης (δες δεδομένα πίνακα 3,4,5). Τα μαρκαρισμένα κελιά αφορούν στις στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

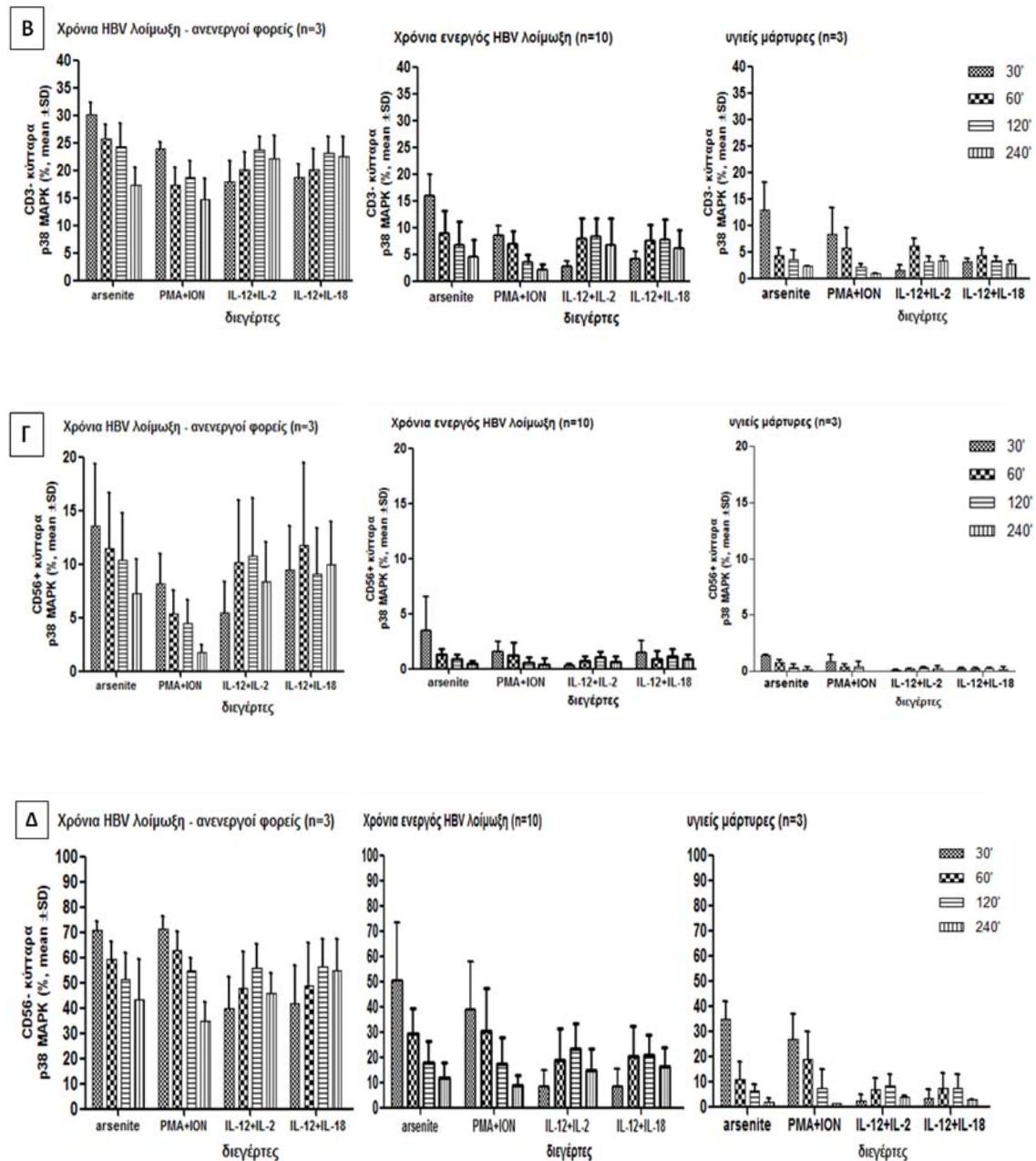
CD3+	Arsenite				PMA + ION				IL12+IL2				IL12+IL18			
	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs υγιείς μάρτυρες	0.821	0.422	0.390	0.278	0.656	0.091	0.234	0.195	0.838	0.122	0.281	0.038	0.616	0.504	0.27	0.228
Ανενεργοί φορείς vs υγιείς μάρτυρες	0.09	0.016	0.025	0.126	0.656	0.010	0.004	0.035	0.094	0.805	0.037	0.386	0.097	0.135	0.046	0.069
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs ανενεργοί φορείς	0.244	0.03	0.136	0.001	0.088	0.001	0.012	0.000	0.002	0.013	0.005	0.000	0.03	0.013	0.08	0.001
CD3-	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs υγιείς μάρτυρες	0.318	0.110	0.242	0.0382	0.933	0.559	0.107	0.147	0.131	0.429	0.033	0.408	0.255	0.145	0.079	0.000

Ανενεργοί φορείς vs υγιείς μάρτυρες	0.010	0.001	0.009	0.035	0.008	0.043	0.005	0.068	0.013	0.013	0.001	0.042	0.003	0.014	0.003	0.023
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs ανενεργοί φορείς	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.002	0.000	0.001	0.000	0.000
CD56+	Arsenite				PMA + ION				IL12+IL2				IL12+IL18			
	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs υγιείς μάρτυρες	0.267	0.150	0.087	0.195	0.283	0.322	0.535	0.603	0.087	0.028	0.02	0.263	0.084	0.139	0.041	0.068
Ανενεργοί φορείς vs υγιείς μάρτυρες	0.103	0.109	0.081	0.188	0.002	0.093	0.136	0.337	0.130	0.007	0.122	0.189	0.140	0.164	0.104	0.156
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs ανενεργοί φορείς	0.012	0.150	0.001	0.001	0.056	0.018	0.032	0.031	0.003	0.163	0.003	0.001	0.022	0.008	0.003	0.001
CD56-	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Ασθενείς με χρόνια	0.307	0.016	0.042	0.021	0.347	0.011	0.12	0.000	0.142	0.155	0.027	0.074	0.279	0.096	0.018	0.021

ενεργό HBV λοίμωξη vs υγιείς μάρτυρες																
Ανενεργοί φορείς vs υγιείς μάρτυρες	0.002	0.004	0.012	0.132	0.004	0.323	0.002	0.161	0.001	0.068	0.001	0.023	0.063	0.071	0.013	0.05
Ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη vs ανενεργοί φορείς	0.144	0.001	0.001	0.001	0.021	0.016	0.001	0.251	0.001	0.018	0.001	0.000	0.002	0.021	0.000	0.008

Συγκριτικά τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς στις επιμέρους συνθήκες μελέτης παρουσιάζονται επίσης στα διαγράμματα της εικόνας 6.





Εικόνα 6: Ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στους 4 κυτταρικούς υποπληθυσμούς (% μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) των 3 υπό μελέτη ομάδων- στους ανενεργούς φορείς του HBV (n=3), στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη πριν την έναρξη αγωγής (n=10) και στους υγιείς μάρτυρες (n=3). Συγκεκριμένα στα διαγράμματα A και B παρουσιάζονται τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK

στα CD3+ και CD3- κύτταρα αντίστοιχα, ενώ στα διαγράμματα Γ και Δ φαίνονται τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα CD56+ και CD56- κύτταρα αντίστοιχα.

4.4 Ενεργοποίηση της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs και στους επιμέρους υποπληθυσμούς αυτών, στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη πριν και μετά την έναρξη της αντι-ιικής αγωγής

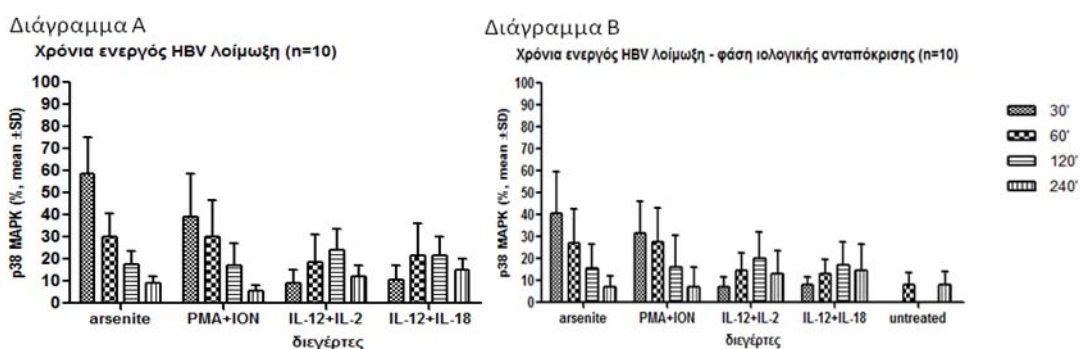
Δέκα ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη μελετήθηκαν τόσο στη φάση της ιαμίας (δες αποτελέσματα στην παράγραφο 4.3), όσο και μετά την έναρξη της αντι-ιικής αγωγής και εφόσον είχε επιτευχθεί ιολογική και βιοχημική ανταπόκριση.

Καταρχήν, συγκρίθηκαν συνολικά και για τους δέκα ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη, τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs ανάμεσα στη φάση της ιαμίας (προ θεραπείας) και στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης (κατά τη διάρκεια της θεραπείας). Διαπιστώθηκε μείωση του ποσοστού ενεργοποίησης στη δεύτερη φάση, αυτή της ιολογικής και βιοχημικής. Σημειώνεται πως για καμία από τις συνθήκες μελέτης η διαφορά των ποσοστών μεταξύ των δύο φάσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$).

Αναλυτικά τα ανωτέρω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7 και στα 2 διαγράμματα της εικόνας 7.

Πίνακας 7: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιαιμίας και στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη (n=10)	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
Φάση ιαιμίας	30'	59.11±17.01	42.89±20.55	8.83±6.02	10.81±6.13
	60'	31.26±11.13	30.19±16.16	18.82±12.24	21.76±12.26
	120'	18.58±7.19	16.98±10.02	24.22±9.46	21.82±8.13
	240'	9.13±3.24	5.40±2.46	11.92±5.08	14.97±4.96
Φάση ιολογικής και βιοχημικής ανταπόκρισης	30'	40.40±19.08	31.4±14.52	6.91±4.47	7.61±3.46
	60'	26.71±15.8	27.52±15.08	14.26±8.13	12.85±6.43
	120'	15.4±10.95	15.71±14.38	19.78±12.06	15.79±9.38
	240'	6.62±4.94	5.9±4.3	12±6.32	14.26±11.9



Εικόνα 7: Ενεργοποίηση της p38 MAPK (% , μέση τιμή±τυπική απόκλιση) στα PBMCs ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη (n=10) σε όλες τις συνθήκες μελέτης κατά τη φάση της ιαιμίας (προ θεραπείας) (Διάγραμμα A) και στη φάση της ιολογικής και

βιοχημικής ανταπόκρισης στους ίδιους ασθενείς (Διάγραμμα Β). $p > 0.05$ για όλες τις συγκρίσεις.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις στα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στους 4 επιμέρους κυτταρικούς υποπληθυσμούς των PBMCs, δηλαδή τα CD3+, CD3-, CD56+ και CD56- κύτταρα μεταξύ της φάσης της ιαμίας και της φάσης της ιολογικής ανταπόκρισης στους ίδιους ασθενείς.

Τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK ήταν, όπως και για τα PBMCs συνολικά, μειωμένα στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης σε σύγκριση με αυτά στη φάση της ιαμίας. Οι διαφορές των εν λόγω ποσοστών μεταξύ των δύο φάσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές για όλους τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς, σε όλες τις συνθήκες μελέτης ($p > 0,05$).

Τα ποσοστά της ενεργοποίησης της p38 MAPK στους επιμέρους κυτταρικούς υποπληθυσμούς στη φάση της ιολογικής και βιοχημικής ανταπόκρισης, για όλες τις συνθήκες μελέτης, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 8. Τα αντίστοιχα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στη φάση της ιαμίας έχουν ήδη παρουσιασθεί αναλυτικά στον πίνακα 4 (δες αποτελέσματα στην παράγραφο 4.3).

Πίνακας 8: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στους 4 κυτταρικούς πληθυσμούς (% , μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη (n=10) – Φάση ιολογικής ανταπόκρισης	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+ κύτταρα	30'	20,64±13,0	26,06±14,26	4,05±4	5,39±4,32
	60'	12,46±11,57	16,66±12,76	8,31±6,76	7,29±6,01
	120'	8,59±7,05	13,43±11,24	12,31±8,49	10,93±9,16
	240'	2,71±2,33	4,55±3,59	6,93±6,5	9,16±8,16
CD3- κύτταρα	30'	14,88±4,8	8,40±2,66	2,95±2,78	4,22±1,67
	60'	8,6±3,2	6,33±3,6	7,8±4,8	7,39±3,4
	120'	6,5±4,66	3,68±3,64	9,02±5,66	7,59±5,83
	240'	4,5±3,27	2,86±2,52	7,12±4,76	8,03±5,29
CD56+ κύτταρα	30'	2,36±2,6	1,66±1,7	1,4±1,3	0,8±0,65
	60'	1,91±1,42	1,7±0,41	1,55±0,68	0,86±0,71
	120'	1,26±0,8	1,2±1,3	1,76±2,26	0,86±0,7
	240'	0,83±0,64	0,47±0,77	0,5±0,34	0,6±0,4
CD56- κύτταρα	30'	40,83±17,70	29,98±13,59	5,19±2,7	5,76±2,81
	60'	26,84±14,76	25,31±14,89	11,66±5,59	11,34±5,69
	120'	15,23	15,33±13,39	18,15±11,29	15,59±10,63
	240'	6,14±4,1	6,78±8,92	11,62±9,82	12,94±11,31

4.5 Ενεργοποίηση της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs και στους επιμέρους υποπληθυσμούς αυτών στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη πριν και μετά την έναρξη της αντι-ϊικής αγωγής- σύγκριση μεταξύ αγωγής με PEG-IFN-α και νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα

Καταρχήν συγκρίθηκαν τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK για το σύνολο των 10 ασθενών με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη, τόσο στο σύνολο των PBMCs όσο και στους τέσσερις κυτταρικούς υποπληθυσμούς αυτών (CD3+, CD3-, CD56+, CD56) στη φάση της ιαμίας και στη φάση της ιολογικής και βιοχημικής ανταπόκρισης μετά την έναρξη της αντι-ϊικής αγωγής. Διαπιστώθηκε μείωση του ποσοστού της ενεργοποίησης της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs και στους επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς στην φάση της ιολογικής και βιοχημικής ανταπόκρισης των ασθενών με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη σε όλες τις συνθήκες με τις εν λόγω διαφορές όμως να μην είναι στατιστικά σημαντικές σε καμία συνθήκη (δες αποτελέσματα στην παράγραφο 4.4).

Στη συνέχεια έγινε επιμέρους ανάλυση και σύγκριση μεταξύ των 5 ασθενών που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2α και των 5 ασθενών που έλαβαν αγωγή με νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα (δες λεπτομέρειες στο κεφάλαιο με τίτλο «Ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β», παράγραφος 1.1).

Οι ασθενείς που έλαβαν NA κατά τη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης παρουσίαζαν χαμηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs σε σχέση με τη φάση της ιαμίας (εικόνα 8, Διάγραμμα A1 και A2). Οι εν λόγω διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο για δύο από τις συνθήκες μελέτης, την

ενεργοποίηση στα 30 λεπτά επώασης με arsenite και στα 120 λεπτά επώασης με τον συνδυασμό κυτταροκινών IL12 και IL18 (πίνακας 9 και 10).

Τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs των ασθενών που έλαβαν NA κατά τη φάση της ιαιμίας και κατά τη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 9 και σχηματικά στην εικόνα 8, στα διαγράμματα A1 και A2 αντίστοιχα. Στον πίνακα 10 δίνονται οι τιμές p που προέκυψαν από τη σύγκριση των ποσοστών ενεργοποίησης της p38 MAPK μεταξύ των δύο φάσεων (ιαιμίας και ιολογικής ανταπόκρισης) στους ασθενείς που έλαβαν αγωγή με NA.

Πίνακας 9: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με NA σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιαμίας και στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με NA (n=5)	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
Φάση ιαμίας	30'	66.07 \pm 7.94	58.34 \pm 21.16	10.04 \pm 5.2	12.37 \pm 7.43
	60'	36.64 \pm 3.37	34.41 \pm 20.92	19.33 \pm 8.97	24.49 \pm 12.26
	120'	21.79 \pm 7.56	19.04 \pm 9.42	28.48 \pm 8.24	25.75 \pm 5.00
	240'	9.35 \pm 2.76	5.88 \pm 3.33	10.87 \pm 5.42	15.17 \pm 5.42
Φάση ιολογικής ανταπόκρισης	30'	46.26 \pm 17.34	30.88 \pm 10.46	5.5 \pm 3.71	8.11 \pm 4.28
	60'	24.9 \pm 12.4	27.23 \pm 9.13	14.9 \pm 7.47	15.38 \pm 6.55
	120'	14.74 \pm 9.47	9.59 \pm 4.08	19.14 \pm 9.63	14.65 \pm 4.58
	240'	6.66 \pm 4.07	3.46 \pm 1.58	11.26 \pm 5.99	11.03 \pm 5.95

Πίνακας 10: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης που αφορούν στη σύγκριση των ποσοστών ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs των ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με NA ανάμεσα στη φάση της ιαμίας και της ιολογικής ανταπόκρισης για όλες τις συνθήκες μελέτης (δες δεδομένα πίνακα 9). Τα μαρκαρισμένα κελιά αφορούν στις στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$)

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με NA (n=5)																
	Arsenite				PMA + ION				IL12+IL2				IL12+IL18			
	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Φάση ιαμίας vs φάση ιολογικής ανταπόκρισης	0.049	0.075	0.231	0.257	0.037	0.608	0.081	0.191	0.153	0.421	0.138	0.917	0.299	0.181	0.006	0.284

Η επιμέρους ανάλυση των 5 ασθενών που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2α ανέδειξε δύο διαφορετικές τάσεις. Συγκεκριμένα, 3 από τους 5 ασθενείς (Ομάδα Α) παρουσίασαν αύξηση του ποσοστού ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs στη φάση της βιοχημικής και ιολογικής ανταπόκρισης (εικόνα 8, Διάγραμμα Β1 και Β2) σε αντίθεση με τους υπόλοιπους 2 (Ομάδα Β) που εμφάνισαν μείωση των ποσοστών ενεργοποίησης της p38MAPK (εικόνα 8, Διάγραμμα Γ1 και Γ2) σε τιμές ανάλογες με αυτές των υγιών μαρτύρων (δες παράγραφος 4.3).

Αναλυτικά τα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στις δύο ομάδες των ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-α, τόσο στη φάση της ιαμίας όσο και στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης παρουσιάζονται στον πίνακα 11. Στον πίνακα 12 φαίνονται οι τιμές p που προέκυψαν από τη σύγκριση των ποσοστών ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs μεταξύ των δύο φάσεων (ιαμία και

ιολογική ανταπόκριση) για κάθε μια ξεχωριστά από τις δύο ομάδες των ασθενών που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2α.

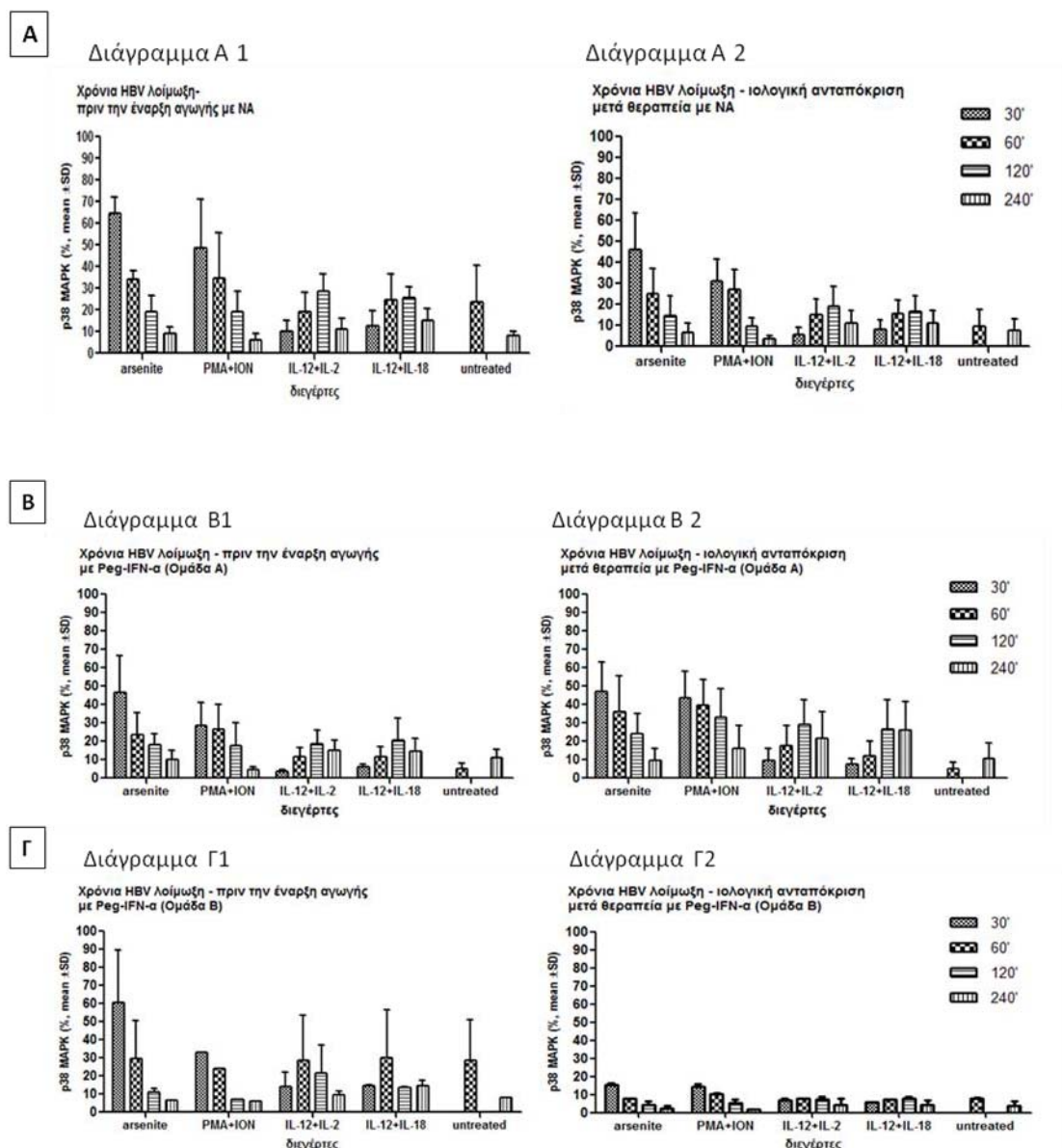
Πίνακας 11: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στις 2 ομάδες ασθενών με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη (ομάδα A και B) που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2α σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της αιμιάς και στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2α ΟΜΑΔΑ A (n=3)	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
Φάση αιμιάς	30'	46.39 \pm 20.04	29.04 \pm 17.21	3.37 \pm 1.06	5.85 \pm 1.58
	60'	23.49 \pm 12.03	30.16 \pm 17.11	11.44 \pm 4.9	11.79 \pm 5.20
	120'	18.10 \pm 6.12	22.95 \pm 12.04	18.75 \pm 7.47	20.77 \pm 11.80
	240'	10.33 \pm 4.91	5.41 \pm 0.92	15.19 \pm 5.60	14.78 \pm 6.90
Φάση ιολογικής ανταπόκρισης	30'	47.33 \pm 15.85	43.62 \pm 14.68	9.39 \pm 6.9	7.34 \pm 3.04
	60'	36.06 \pm 19.29	39.39 \pm 14.12	17.58 \pm 11.17	12.22 \pm 7.84
	120'	23.95 \pm 11.32	32.94 \pm 15.64	29.05 \pm 13.68	26.65 \pm 15.74
	240'	9.39 \pm 6.79	16.19 \pm 12.49	21.48 \pm 14.67	26.31 \pm 15.04
Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2α	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18

ΟΜΑΔΑ Β (n=2)					
Φάση ιαμίας	30'	60.77±28.61	33.22±0.02	13.99±8.17	14.37±0.96
	60'	29.53±21.17	28.64±17.64	28.64±24.94	29.9±26.6
	120'	11.3±1.53	6.92±0.02	21.77±15.16	13.59±0.36
	240'	6.76±0.02	6.16±0.03	9.62±1.95	14.77±2.87
Φάση ιολογικής ανταπόκρισης	30'	15.36±1.03	14.41±1.36	6.67±1.11	5.93±0.06
	60'	7.74±0.02	7.67±0.26	7.67±0.26	7.15±0.34
	120'	4.38±1.96	5.17±2.04	7.47±1.14	7.79±1.25
	240'	2.39±1.56	1.63±0.39	4.56±3.30	4.28±2.31

Πίνακας 12: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης που αφορούν στη σύγκριση των ποσοστών ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs των 2 ομάδων ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη (ομάδα Α και Β) που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2a ανάμεσα στη φάση της ιαιμίας και της ιολογικής ανταπόκρισης για όλες τις συνθήκες μελέτης (δες δεδομένα πίνακα 11). Τα μαρκαρισμένα κελιά αφορούν στις στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$)

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2a																
ΟΜΑΔΑ Α (n=3)																
	Arsenite				PMA + ION				IL12+IL2				IL12+IL18			
	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Φάση ιαιμίας vs φάση ιολογικής ανταπόκρισης	0.952	0.392	0.483	0.855	0.387	0.553	0.506	0.331	0.210	0.433	0.316	0.526	0.493	0.945	0.660	0.294
Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2a																
ΟΜΑΔΑ Β (n=2)																
	Arsenite				PMA + ION				IL12+IL2				IL12+IL18			
	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Φάση ιαιμίας vs φάση ιολογικής ανταπόκρισης	0.154	0.555	0.059	0.059	0.056	0.350	0.612	0.068	0.336	0.357	0.315	0.203	0.088	0.350	.,024	0.057



Εικόνα 8: Ενεργοποίηση της p38 MAPK (%) στα PBMCs ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη κατά τη φάση της αιμίας (προ θεραπείας) και στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης στους ίδιους ασθενείς ανάλογα με τη θεραπεία που έλαβαν.

Διάγραμμα A: Ενεργοποίηση της p38 MAPK (%) στα PBMCs ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη, που έλαβαν αγωγή με NA κατά τη φάση της αιμίας (διάγραμμα A1) και κατά τη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης (διάγραμμα A2), **Διάγραμμα B:** Ενεργοποίηση της p38 MAPK (%) στα PBMCs 3 ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη (Ομάδα A), που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-α κατά τη φάση της αιμίας (διάγραμμα

B1) και κατά τη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης (διάγραμμα B2), **Διάγραμμα Γ:** Ενεργοποίηση της p38 MAPK (%) στα PBMCs 2 ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη (Ομάδα Β), που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-α κατά τη φάση της ιαμίας (διάγραμμα Γ1) και κατά τη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης (διάγραμμα Γ2).

Η μελέτη των τεσσάρων κυτταρικών υποπληθυσμών, των CD3+, CD3-, CD56+ και των CD56- κυττάρων ανέδειξε τα ίδια ευρήματα με αυτά που περιγράφονται παραπάνω για το σύνολο των PBMCs. Συγκεκριμένα οι ασθενείς που έλαβαν αγωγή με NA κατά τη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης στο σύνολό τους παρουσίαζαν και για τους τέσσερις κυτταρικούς υποπληθυσμούς χαμηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK σε σχέση με τη φάση της ιαμίας (Πίνακες 13 και 14) ($p > 0,05$). Όσον αφορά στους ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-2α, οι ασθενείς της Ομάδας Α παρουσίασαν και για τους τέσσερις κυτταρικούς υποπληθυσμούς αύξηση του ποσοστού ενεργοποίησης της p38 MAPK στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς στη φάση της βιοχημικής και ιολογικής ανταπόκρισης (Πίνακες 15 και 16) σε αντίθεση με τους ασθενείς της Ομάδας Β που εμφάνισαν μείωση των ποσοστών τους (Πίνακες 17 και 18) ($p > 0,05$).

Πίνακας 13: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στους 4 κυτταρικούς υποπληθυσμούς των PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με NA σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιαμίας.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με NA (n=5)					
Φάση ιαμίας					
Κυτταρικός υποπληθυσμός	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+	30'	46.93 \pm 10.68	43.63 \pm 18.36	6.78 \pm 6.54	6.4 \pm 5.46
	60'	20.59 \pm 7.97	40.23 \pm 19.78	13.11 \pm 2.46	12.78 \pm 2.71
	120'	24.39 \pm 25.13	22.3 \pm 11.68	20.49 \pm 10.14	20.79 \pm 9.21
	240'	3.49 \pm 1.20	5.05 \pm 4.20	9.72 \pm 5.75	10.23 \pm 6.70
CD3-	30'	21.30 \pm 11.09	10.03 \pm 6.93	3.66 \pm 1.95	5.03 \pm 1.56
	60'	13.58 \pm 10.53	7.51 \pm 3.16	9.87 \pm 4.83	10.31 \pm 5.76
	120'	10.35 \pm 8.41	4.74 \pm 2.28	11.31 \pm 8.13	10.41 \pm 7.32
	240'	5.11 \pm 3.60	3.27 \pm 2.59	7.76 \pm 5.16	7.73 \pm 4.96
CD56+	30'	4.18 \pm 4.02	1.34 \pm 0.68	0.39 \pm 0.47	1.40 \pm 1.10
	60'	1.230.61	0.67 \pm 0.23	0.92 \pm 1.12	0.93 \pm 0.9
	120'	0.78 \pm 0.43	0.74 \pm 0.61	1.27 \pm 0.58	1.2 \pm 0.88
	240'	0.47 \pm 0.35	0.47 \pm 0.08	1.08 \pm 1.07	0.65 \pm 0.31
CD56-	30'	49.13 \pm 27.58	48.34 \pm 22.57	9.63 \pm 5.89	9.14 \pm 8.56
	60'	33.14 \pm 4.52	34.95 \pm 22.30	19.29 \pm 9.84	23.27 \pm 9.33
	120'	20.61 \pm 10.30	24.40 \pm 10.26	27.46 \pm 9.30	24.41 \pm 5.46
	240'	8.44 \pm 2.25	8.30 \pm 4.50	10.20 \pm 7.86	14.98

Πίνακας 14: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με NA σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με NA (n=5)					
Φάση ιολογικής ανταπόκρισης					
Κυτταρικός υποπληθυσμός	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+	30'	16.78 \pm 10.65	27.09 \pm 13.49	3.30 \pm 0.9	4.38 \pm 1.07
	60'	8.3 \pm 7.38	11.52 \pm 8.90	9.99 \pm 8.62	8.72 \pm 7.53
	120'	6.74 \pm 4.73	10.70 \pm 8.82	11.24 \pm 7.82	9.9 \pm 7.04
	240'	2.30 \pm 1.84	2.49 \pm 3.20	7.22 \pm 6.32	6.33 \pm 5.18
CD3-	30'	14.18 \pm 4.42	8.51 \pm 1.55	2.37 \pm 0.07	3.62 \pm 0.60
	60'	5.63 \pm 2.21	7.46 \pm 4.33	5.70 \pm 1.39	5.49 \pm 1.60
	120'	4.42 \pm 1.64	3.74 \pm 1.42	5.82 \pm 1.55	5.85 \pm 1.87
	240'	2.81 \pm 1.28	1.76 \pm 0.58	3.80 \pm 1.14	4.02 \pm 1.32
CD56+	30'	2.11 \pm 2.33	1.03 \pm 0.70	0.30 \pm 0.24	0.55 \pm 0.44
	60'	1.26 \pm 0.99	0.51 \pm 0.37	0.61 \pm 0.33	0.65 \pm 0.58
	120'	0.78 \pm 0.43	0.37 \pm 0.30	0.91 \pm 1.2	0.66 \pm 0.51
	240'	0.28 \pm 0.19	0.11 \pm 0.06	0.39 \pm 0.23	0.65 \pm 0.35
CD56-	30'	48.60 \pm 14.60	29.30 \pm 9.94	4.08 \pm 2.82	5.57 \pm 3.46
	60'	26.62 \pm 13.86	24.09 \pm 14.07	11.4 \pm 5.05	13.00 \pm 6.26
	120'	15.66 \pm 10.81	9.89 \pm 4.39	17.83 \pm 10.80	15.28 \pm 9.13
	240'	6.87 \pm 4.46	3.28 \pm 2.10	9.94 \pm 5.05	10.21 \pm 7.44

Πίνακας 15: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-a (ομάδα A, n=3) σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιαμίας.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-a – Ομάδα A (n=3)					
Φάση ιαμίας					
Κυτταρικός υποπληθυσμός	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+	30'	29.35 \pm 15.66	21.77 \pm 9.47	0.91 \pm 0.41	2.02 \pm 1.44
	60'	11.19 \pm 8.12	21.80 \pm 12.74	2.47 \pm 1.75	2.58 \pm 1.20
	120'	8.21 \pm 3.18	14.84 \pm 11.33	9.07 \pm 5.25	10.20 \pm 7.39
	240'	2.91 \pm 1.83	2.79 \pm 1.43	4.66 \pm 4.24	5.73 \pm 3.91
CD3-	30'	18.82 \pm 3.66	8.28 \pm 2.25	2.59 \pm 0.95	4.10 \pm 0.61
	60'	13.52 \pm 2.97	6.74 \pm 1.70	9.86 \pm 4.03	10.14 \pm 4.00
	120'	11.66 \pm 3.58	3.79 \pm 1.37	11.02 \pm 2.89	11.77 \pm 3.93
	240'	8.09 \pm 3.35	1.84 \pm 0.26	11.78 \pm 6.19	9.89 \pm 3.53
CD56+	30'	1.94 \pm 0.87	1.97 \pm 1.33	3.23 \pm 0.049	1.17 \pm 0.23
	60'	1.30 \pm 0.60	1.83 \pm 1.98	3.78 \pm 0.17	1.76 \pm 0.42
	120'	1.49 \pm 0.04	1.38 \pm 0.53	1.34 \pm 0.43	0.42 \pm 0.42
	240'	1.42 \pm 0.42	1.15 \pm 0.11	1.14 \pm 0.49	1.07 \pm 0.55
CD56-	30'	45.83 \pm 18.40	27.92 \pm 10.95	3.17 \pm 1.02	4.76 \pm 1.59
	60'	23.34 \pm 10.98	26.35 \pm 12.56	11.39 \pm 5.02	18.37 \pm 6.19
	120'	18.37 \pm 6.19	10.80 \pm 4.88	18.04 \pm 7.15	20.30 \pm 10.86
	240'	8.67 \pm 5.25	3.56 \pm 1.23	15.27 \pm 5.54	14.26 \pm 6.67

Πίνακας 16: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-a (ομάδα A, n=3) σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-a – Ομάδα A (n=3)					
Φάση ιολογικής ανταπόκρισης					
Κυτταρικός υποπληθυσμός	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+	30'	33.70 \pm 11.30	35.76 \pm 10.77	2.34 \pm 0.78	3.57 \pm 1.55
	60'	24.37 \pm 13.33	31.68 \pm 8.61	7.97 \pm 5.29	6.57 \pm 4.63
	120'	15.88 \pm 7.05	24.84 \pm 9.52	19.22 \pm 7.93	21.16 \pm 11.82
	240'	4.52 \pm 3.06	10.49 \pm 9.87	13.20 \pm 9.62	16.59 \pm 8.88
CD3-	30'	39.48 \pm 35.87	9.58 \pm 7.23	7.41 \pm 6.33	4.26 \pm 2.56
	60'	12.75 \pm 6.52	8.86 \pm 6.93	10.04 \pm 6.35	6.45 \pm 3.87
	120'	8.57 \pm 4.83	9.62 \pm 6.90	10.39 \pm 6.27	6.45 \pm 2.75
	240'	5.13 \pm 3.68	6.54 \pm 5.15	8.39 \pm 5.51	10.68 \pm 5.82
CD56+	30'	3.92 \pm 3.59	3.61 \pm 2.19	3.8 \pm 2.17	1.78 \pm 0.23
	60'	3.53 \pm 3.40	3.81 \pm 3.11	3.44 \pm 3.04	1.75 \pm 0.68
	120'	2.65 \pm 2.06	3.26 \pm 2.63	3.51 \pm 3.30	1.84 \pm 0.52
	240'	2.18 \pm 2.08	1.34 \pm 1.04	3.17 \pm 2.27	3.91 \pm 1.80
CD56-	30'	45.26 \pm 11.14	41.68 \pm 13.26	5.93 \pm 3.85	33.68 \pm 15.11
	60'	33.68 \pm 15.11	36.80 \pm 11.85	14.76 \pm 7.65	11.99 \pm 7.72
	120'	21.88 \pm 8.00	31.33 \pm 14.17	26.27 \pm 10.04	25.26 \pm 15.06
	240'	7.56 \pm 3.89	16.09 \pm 12.72	19.02 \pm 12.77	23.71 \pm 13.57

Πίνακας 17: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-a (ομάδα Β, n=2) σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιαμίας.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-a – Ομάδα Β (n=2)					
Φάση ιαμίας					
Κυτταρικός υποπληθυσμός	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+	30'	34.88 \pm 19.68	20.85 \pm 9.45	5.96 \pm 4.22	5.91 \pm 4.87
	60'	15.64 \pm 13.22	17.13 \pm 6.99	13.31 \pm 10.61	11.17 \pm 3.75
	120'	5.16 \pm 3.31	4.86 \pm 0.00	11.92 \pm 7.92	9.89 \pm 5.96
	240'	2.57 \pm 2.29	5.42 \pm 0.81	4.18 \pm 2.13	7.71 \pm 6.98
CD3-	30'	15.38 \pm 1.99	9.93 \pm 0.00	3.63 \pm 1.51	5.63 \pm 2.77
	60'	8.29 \pm 0.66	5.20 \pm 0.00	9.77 \pm 5.60	7.32 \pm 1.87
	120'	4.38 \pm 1.68	2.41 \pm 0.00	9.23 \pm 4.16	5.85 \pm 0.43
	240'	2.85 \pm 0.62	4.24 \pm 0.00	4.77 \pm 0.93	4.90 \pm 0.41
CD56+	30'	4.15 \pm 2.24	1.03 \pm 0.00	0.46 \pm 0.18	2.08 \pm 0.90
	60'	1.41 \pm 0.48	1.26 \pm 0.00	1.06 \pm 0.61	1.05 \pm 0.78
	120'	0.65 \pm 0.44	0.24 \pm 0.00	0.93 \pm 0.27	0.81 \pm 0.36
	240'	0.50 \pm 0.26	0.33 \pm 0.00	0.70 \pm 0.62	1.25 \pm 0.09
CD56-	30'	57.03 \pm 26.05	32.34 \pm 0.00	14.07 \pm 8.34	12.81 \pm 0.12
	60'	28.72 \pm 21.00	23.94 \pm 0.00	28.19 \pm 24.71	27.02 \pm 20.77
	120'	11.11 \pm 2.22	8.21 \pm 0.00	21.35 \pm 15.01	13.36 \pm 0.90
	240'	6.64 \pm 0.34	7.43 \pm 0.00	9.38 \pm 1.33	14.26 \pm 3.06

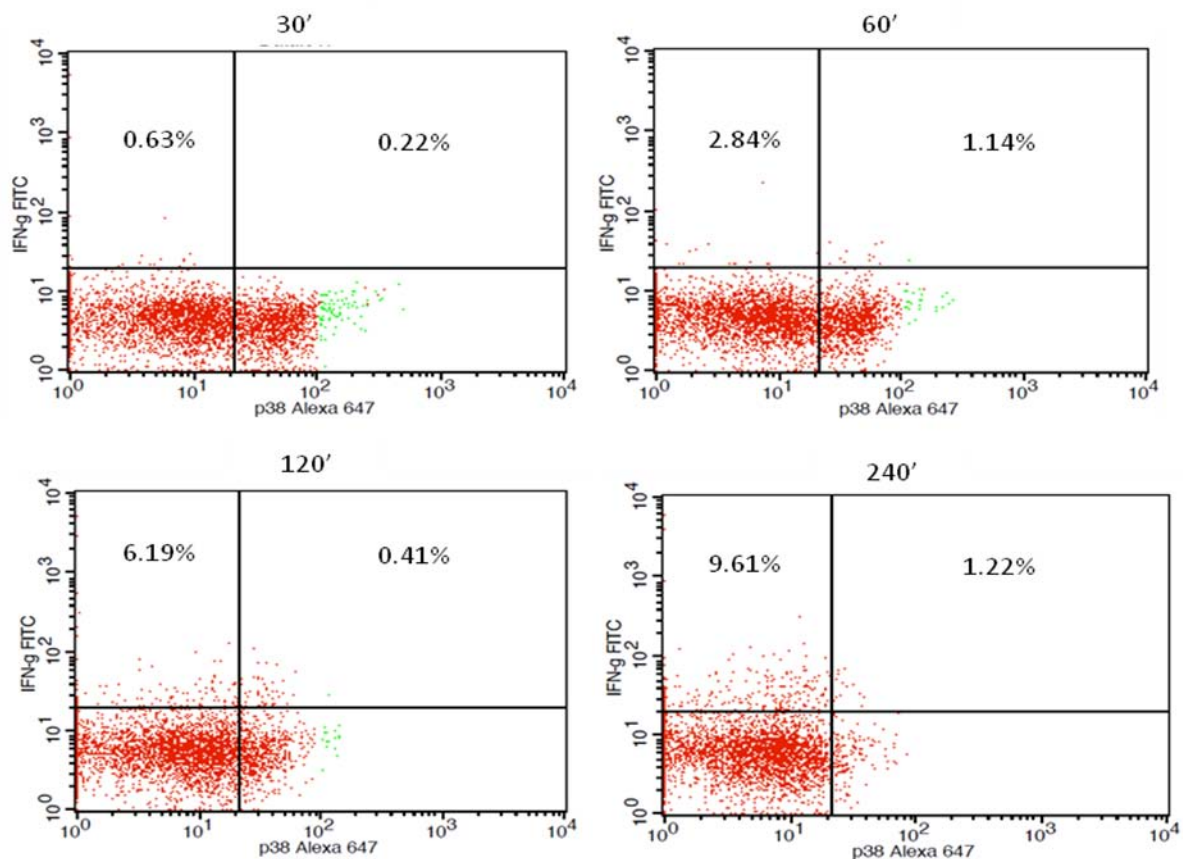
Πίνακας 18: Ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs (% , μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-a (ομάδα Β, n=2) σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με τους επιμέρους διεγέρτες στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης.

Χρόνια ενεργός HBV λοίμωξη – ασθενείς που έλαβαν αγωγή με PEG-IFN-a – Ομάδα Β (n=2)					
Φάση ιολογικής ανταπόκρισης					
Κυτταρικός υποπληθυσμός	Χρόνος επώασης	Arsenite	PMA+ION	IL12+IL2	IL12+IL18
CD3+	30'	10.72 \pm 5.40	9.40 \pm 3.61	4.75 \pm 3.88	4.69 \pm 3.86
	60'	5.00 \pm 2.85	6.99 \pm 1.95	4.60 \pm 4.03	4.43 \pm 3.71
	120'	2.27 \pm 1.58	3.16 \pm 2.45	4.62 \pm 3.43	3.31 \pm 1.68
	240'	1.01 \pm 0.26	0.81 \pm 0.32	1.84 \pm 1.23	1.03 \pm 0.00
CD3-	30'	8.62 \pm 3.26	7.88 \pm 2.33	4.48 \pm 2.46	4.66 \pm 2.45
	60'	5.88 \pm 4.13	4.72 \pm 1.13	6.66 \pm 4.78	5.54 \pm 3.11
	120'	3.80 \pm 2.85	2.14 \pm 1.43	6.27 \pm 4.43	6.17 \pm 3.55
	240'	2.01 \pm 1.37	1.39 \pm 0.65	3.61 \pm 2.17	B 2.03 \pm 0.00
CD56+	30'	0.68 \pm 0.31	0.34 \pm 0.14	0.36 \pm 0.18	0.43 \pm 0.31
	60'	0.35 \pm 0.01	0.37 \pm 0.32	0.30 \pm 0.19	0.50 \pm 0.45
	120'	0.37 \pm 0.25	0.33 \pm 0.24	0.36 \pm 0.11	0.38 \pm 0.15
	240'	0.19 \pm 0.06	0.08 \pm 0.01	0.51 \pm 0.43	0.73 \pm 0.72
CD56-	30'	14.75 \pm 0.82	14.1 \pm 1.30	6.53 \pm 1.22	6.05 \pm 0.45
	60'	7.41 \pm 0,04	9.90 \pm 0.92	7.62 \pm 0.38	7.56 \pm 0.48
	120'	4.16 \pm 1.89	4.95 \pm 1.97	6.76 \pm 0.50	6.72 \pm 0.07
	240'	2.22 \pm 1.52	1.58 \pm 0.43	4.10 \pm 2.90	3.59 \pm 1.63

4.6 Προσδιορισμός της ενδοκυττάριας έκφρασης IFN- γ στα PBMCs με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής

Παράλληλα μελετήθηκε η έκφραση της IFN- γ στα PBMCs ατόμων από τις 3 ομάδες με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Στο σκέλος αυτό της μελέτης χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός των διεγερτών PMA και ionomycin, βασιζόμενοι σε προγενέστερες μελέτες στις οποίες φάνηκε ότι σε αντίθεση με τους συνδυασμούς κυτταροκινών IL-12 με IL-2 και της IL-12 με την IL-18, ο συγκεκριμένος συνδυασμός επιτρέπει την πρόωμη παραγωγή της IFN- γ [150, 151].

Συγκεκριμένα, στα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε προοδευτική αύξηση της έκφρασης της IFN- γ παράλληλα με τον χρόνο επώασης. Τα μεγαλύτερα ποσοστά παρατηρήθηκαν μετά 240 λεπτά επώασης με PMA και ionomycin για όλες τις ομάδες ελέγχου (ενδεικτικό πείραμα σε ασθενή με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β στη φάση της ιαμίας παρουσιάζεται στην εικόνα 9. Αντίθετα, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο (παράγραφος 4.1), η ενεργοποίηση της p38 MAPK παρουσίασε μείωση με την αύξηση του χρόνου επώασης με τους εν λόγω διεγέρτες.



Εικόνα 9: Έκφραση (%) της IFN- γ σε PBMCs ασθενούς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη στη φάση της ιαμίας μετά διέγερση με τον συνδυασμό των PMA και ιονομυκίνη μετά 30, 60, 120 και 240 λεπτά. Η μέγιστη τιμή έκφρασης της IFN- γ επιτυγχάνεται στα 240' επώασης σε αντίθεση με την ενεργοποίηση της p38 MAPK που συν τω χρόνω μειώνεται.

Συγκρίνοντας τις επιμέρους ομάδες ως προς τα μέγιστα ποσοστά έκφρασης της IFN- γ στα PBMCs στα 240 λεπτά επώασης με PMA και ιονομυκίνη διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη (τόσο οι ανενεργοί όσο και οι ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β) εμφάνιζαν τα υψηλότερα ποσοστά έκφρασης της IFN- γ συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Αναλυτικά, οι ανενεργοί φορείς του ιού είχαν

σημαντικά υψηλότερα ποσοστά έκφρασης IFN- γ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ($14,13\% \pm 7,06\%$ vs $4,50\% \pm 1,80\%$, $p=0,014$), ενώ δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές με τους ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β ($14,13\% \pm 7,06\%$ vs $13,70\% \pm 5,01\%$, $p>0,05$). Επίσης δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την έκφραση της IFN- γ ανάμεσα στους ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β και τους υγιείς μάρτυρες (δες τιμές παραπάνω).

Στο σύνολο των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β, που έλαβαν αντιική αγωγή, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης της IFN- γ στην φάση της ιολογικής ανταπόκρισης στη θεραπεία συγκριτικά με τη φάση της ιαμίας ($8,78\% \pm 6,76\%$ έναντι $13,75\% \pm 5,01\%$ αντίστοιχα, $p=0,095$).

Αναλύοντας τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β ανάλογα με το είδος της αντιικής αγωγής που έχουν λάβει (NA έναντι Peg-IFN-a), αυτοί που έλαβαν αγωγή με NA δεν εμφάνιζαν σημαντική διαφορά ανάμεσα στη φάση της ιαμίας και στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης στην αγωγή ($13,16\% \pm 5,03\%$ έναντι $12,99\% \pm 7,21\%$, $p=0,9$), ενώ αντίθετα οι ασθενείς που έλαβαν αγωγή με Peg-IFN-2a παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση των ποσοστών έκφρασης IFN- γ κατά τη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης συγκριτικά με τη φάση της ιαμίας ($4,57\% \pm 2,59\%$ έναντι $14,25\% \pm 5,69\%$ αντίστοιχα, $p=0,01$).

4.7 Προσδιορισμός της παραγωγής της IFN- γ με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISpot με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580.

Για τον προσδιορισμό της παραγωγής IFN- γ με τη μέθοδο ELISpot, τα PBMCs καλλιεργήθηκαν με τους συνδυασμούς των ανασυνδυασμένων κυτταροκινών IL-12 και IL-2 και της IL-12 με IL-18 καθώς και μετά την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580.

Σε κάποια πειράματα παρατηρήθηκε πολύ υψηλό “background”, έτσι ώστε να μην μπορούν να αναλυθούν αξιόπιστα τα αποτελέσματα κάποιων ασθενών. Αυτά τα πειράματα δεν μπόρεσαν να επαναληφθούν λόγω της έλλειψης PBMCs από τους εν λόγω ασθενείς στις δεδομένες χρονικές στιγμές. Τελικά αναλύθηκαν τα δεδομένα από 3 υγιείς μάρτυρες και 4 ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β στη φάση της ιαμίας και στη φάση της ανταπόκρισης στην αγωγή.

Ο αριθμός κηλίδων που παράγουν IFN- γ στους ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β στη φάση της ιαμίας σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες τόσο μετά τη διέγερση με τον συνδυασμό IL-12 με IL-2 (369 ± 91 έναντι 299 ± 67 ανά 10^6 PBMCs αντίστοιχα, $p=0,21$) όσο και με το συνδυασμό IL-2 με IL-18 (309 ± 90 έναντι 273 ± 15 ανά 10^6 PBMCs αντίστοιχα, $p=0,41$) δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διαφορά, αν και οι ασθενείς παρουσίαζαν υψηλότερους αριθμούς κηλίδων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των κηλίδων που παράγουν IFN- γ στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης σε σύγκριση με τη φάση της ιαμίας τόσο με τον συνδυασμό IL-12 με IL-2 (444 ± 66 έναντι 369 ± 91 ανά 10^6 PBMCs, $p=0,28$) όσο και με

το συνδυασμό IL-2 με IL-18 (368 ± 86 έναντι 309 ± 90 ανά 10^6 PBMCs, $p=0,42$), αν και οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Η προσθήκη του SB 203580 είχε σαν αποτέλεσμα της μείωση της παραγωγής της IFN- γ σε όλες τις συνθήκες μελέτης (πίνακας 19).

Πίνακας 19: Αριθμός κηλίδων που παράγουν IFN- γ στους υγιείς μάρτυρες και στους ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β σε φάση ιαιμίας και σε φάση ιολογικής ανταπόκρισης μετά από διέγερση με τους συνδυασμούς των IL12+IL12, IL-12+IL18 με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή κηλίδων (\pm διακύμανση ανά 10^6 PBMCs) και οι τιμές p αφορούν στη σύγκριση των κηλίδων ανά συνθήκη με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα.

	IL-12+IL+2	IL-12+IL2 +SB	IL-12+IL+18	IL-12+IL18 +SB
Υγιείς μάρτυρες (n=3)	299 \pm 67	260 \pm 140	273 \pm 15	138 \pm 70
	p=0.21		p=0.11	
ΧΗΒ-ιαιμία (n=4)	369 \pm 91	313 \pm 53	309 \pm 90	184 \pm 76
	p=0.33		p=0.80	
ΧΗΒ-ανταπόκριση στην αγωγή (n=4)	444 \pm 66	286 \pm 106	368 \pm 86	205 \pm 172
	p=0.09		p=0.21	

4.8 Παραγωγή IFN- γ σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών PBMCs με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580.

Μελετήθηκε η παραγωγή της IFN- γ σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών PBMCs των τριών ομάδων μελέτης μετά ενεργοποίηση αυτών με τους μη ειδικούς διεγέρτες rhIL-12 και rhIL-2, rhIL-12 και rhIL-18 με ή χωρίς τη παρουσία του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580.

Η διέγερση των PBMCs με το συνδυασμό κυτταροκινών rhIL-12 και rhIL-18 για όλες τις υπό μελέτη ομάδες, τόσο με όσο και χωρίς τη προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK, σχετίζονταν με μεγαλύτερη παραγωγή IFN- γ σε σύγκριση με την ενεργοποίηση με το συνδυασμό των κυτταροκινών rhIL-12 και rhIL-2.

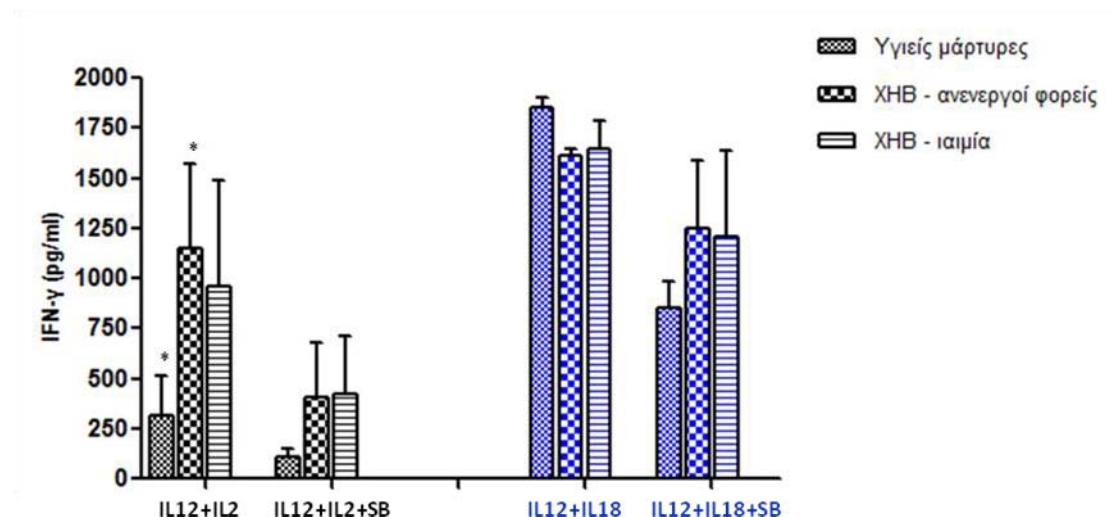
Η προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της IFN- γ σε όλες τις ομάδες μελέτης και με τους δύο συνδυασμούς διεγερτών.

Οι συγκεντρώσεις της IFN- γ για όλες τις ομάδες ελέγχου και για τους δύο συνδυασμούς διεγερτών με ή χωρίς την προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK παρουσιάζονται συγκριτικά ως μέση τιμή \pm διακύμανση (mean \pm SD) στον πίνακα 20 και στο διάγραμμα της εικόνας 10. Στατιστικά σημαντικές ήταν οι διαφορές των συγκεντρώσεων της IFN- γ μεταξύ της ομάδας των υγιών μαρτύρων και των ανενεργών φορέων της ηπατίτιδας B μετά διέγερση με τον συνδυασμό των IL12+IL2 χωρίς τη προσθήκη του SB203580 (υγιείς έναντι ανενεργών φορέων, 314 \pm 200 vs 1153 \pm 418, $p=0.035$). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην ομάδα των ανενεργών φορέων του HBV και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B στη

φάση της ιαμίας, ούτε μεταξύ των υγιών φορέων και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β στη φάση της ιαμίας.

Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις IFN- γ (pg/ml, mean \pm SD) στα υπερκείμενα των καλλιεργειών PBMCs των ατόμων από τις 3 ομάδες μελέτης (3 υγιείς μάρτυρες, 3 ανενεργοί φορείς της ηπατίτιδας Β, 10 ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη στη φάση της ιαμίας).

	IL12+IL2	IL12+IL2+SB		IL12+IL18	IL12+IL18+SB
Υγιείς μάρτυρες	314 \pm 200	109 \pm 41		1856 \pm 44	957 \pm 610
ΧΗΒ-Ανενεργοί φορείς	1153 \pm 418	406 \pm 273		1609 \pm 34	1245 \pm 340
ΧΗΒ-ιαμία	982 \pm 556	447 \pm 292		1650 \pm 146	1252 \pm 432



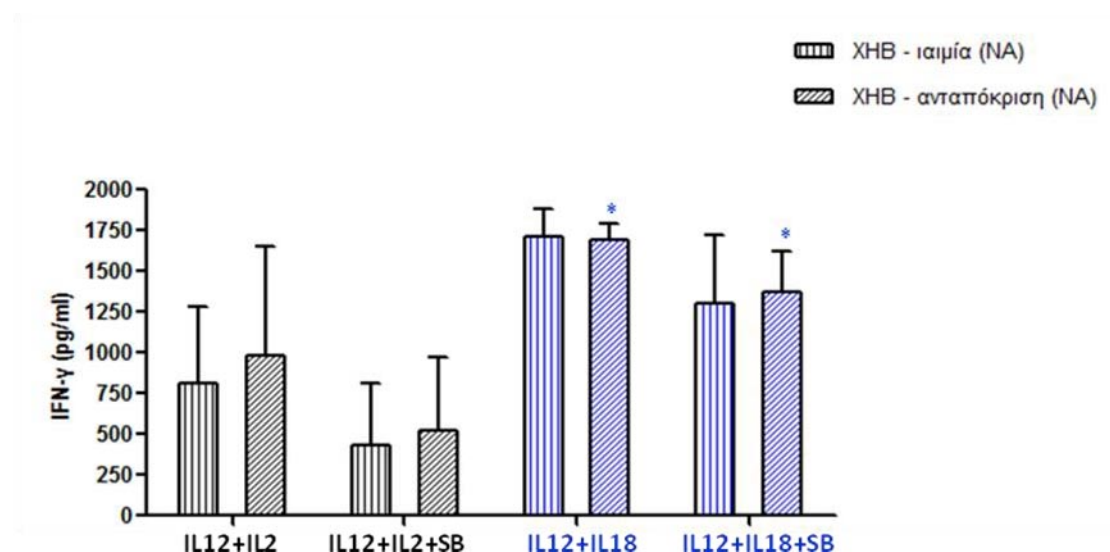
Εικόνα 10: Συγκεντρώσεις IFN- γ (pg/ml, mean \pm SD) στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών PBMCs από τις 3 ομάδες μελέτης (3 υγιείς μάρτυρες, 3 ανενεργοί φορείς της ηπατίτιδας Β, 10 ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη στη φάση της ιαιμίας). Με (*) σημειώνονται οι συνθήκες με τη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$).

Στους ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη η συγκέντρωση της IFN- γ στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών προσδιορίσθηκε τόσο στη φάση της ιαιμίας όσο και στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης στην αγωγή. Για το σύνολο των δέκα ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της IFN- γ μεταξύ των φάσεων της ιαιμίας και της ιολογικής ανταπόκρισης τόσο μετά τη διέγερση με το συνδυασμό των IL12+IL18 (φάση ιαιμίας έναντι φάσης ιολογικής ανταπόκρισης: 1643 \pm 139 έναντι 1646 \pm 84 αντίστοιχα, $p=0.9$) όσο και μετά τη διέγερση με το συνδυασμό των IL12+IL2 (φάση ιαιμίας έναντι φάσης ιολογικής ανταπόκρισης: 962 \pm 528 έναντι 984 \pm 546 αντίστοιχα, $p=0.9$). Η προσθήκη δε του αναστολέα της p38 MAPK σχετιζόταν με μείωση της παραγόμενης

IFN- γ και με τους δύο συνδυασμούς διεγερτών, των IL12+IL18 (φάση ιαιμίας έναντι φάσης ιολογικής ανταπόκρισης: 1206 ± 432 έναντι 1412 ± 220 , $p=0.68$) και των IL12+IL2 (φάση ιαιμίας έναντι φάσης ιολογικής ανταπόκρισης: 425 ± 284 έναντι 553 ± 421 αντίστοιχα, $p=0.85$).

Στη συνέχεια αναλύθηκαν οι ασθενείς ανάλογα με το είδος της αντιικής αγωγής που έλαβαν (NA έναντι PEG-IFN-a).

Οι ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν NA δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις IFN- γ στις 2 φάσεις μελέτης (φάση ιαιμίας και ιολογικής ανταπόκρισης) τόσο χωρίς όσο και με τη προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK (δες αναλυτικά δεδομένα στον πίνακα 21). Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που προέκυψε ήταν μεταξύ των συγκεντρώσεων IFN- γ στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης μετά από διέγερση με το συνδυασμό των IL12+IL18 χωρίς και με τη προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK (1758 ± 126 έναντι 1432 ± 244 , $p=0.021$) (πίνακας 21, εικόνα 11).



Εικόνα 11: Συγκεντρώσεις IFN- γ (pg/ml, mean \pm SD) στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών PBMCs των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα που έλαβαν αγωγή με NA (n=5) στη φάση της αιμίας και της ιολογικής ανταπόκρισης στην αγωγή. Με (*) σημειώνονται οι συνθήκες με τη στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

Οι ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη που έλαβαν PEG-IFN-a δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις IFN- γ στις δύο φάσεις μελέτης (φάση αιμίας και ιολογικής ανταπόκρισης) τόσο χωρίς όσο και με τη προσθήκη του αναστολέα της p38 MAPK (δες αναλυτικά δεδομένα στον πίνακα 21).

Η ανάλυση των συγκεντρώσεων της IFN- γ στους ασθενείς που έλαβαν PEG-IFN-a έγινε στη συνέχεια βάσει του προτύπου ενεργοποίησης της p38MAPK (δες παράγραφο 4.5). Οι ασθενείς (ομάδα A) με υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs στη φάση της ανταπόκρισης στην αντι-ιϊκή αγωγή στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής είχαν και υψηλότερες συγκεντρώσεις IFN- γ , κυρίως μετά από διέγερση με το συνδυασμό IL-12+IL-2, σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας B, που χαρακτηρίζονταν από χαμηλά ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK, οι οποίοι είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις IFN- γ (πίνακας 21). Καμιά από τις διαφορές μεταξύ των 2 υποομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στον μικρό αριθμό ασθενών που μελετήθηκαν ανά ομάδα.

Συγκεντρωτική παρουσίαση των επιπέδων IFN- γ στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών των PBMCs ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα B στη φάση της αιμίας και της ιολογικής ανταπόκρισης γίνεται στον πίνακα 21.

Πίνακας 21: Συγκεντρώσεις IFN- γ (pg/ml, mean \pm SD) στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών PBMCs ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β ανάλογα με την αντι-ική αγωγή (5 ασθενείς που έλαβαν αγωγή με NA και 5 με Peg-IFN-2a). Οι ασθενείς που έλαβαν αγωγή με Peg-IFN-2a διακρίθηκαν σε δύο υποομάδες, την ομάδα Α – τρεις ασθενείς και την ομάδα Β-δύο ασθενείς, βασιζόμενοι στα δεδομένα ενεργοποίησης της p38 MAPK στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής.

	IL12+IL2	IL12+IL2+SB	IL12+IL18	IL12+IL18+SB
Ασθενείς με ΧΗΒ συνολικά (n=10)				
ΧΗΒ – ιαιμία	962 \pm 528	425 \pm 284	1643 \pm 139	1206 \pm 432
ΧΗΒ-ανταπόκριση	984 \pm 546	553 \pm 421	1646 \pm 84	1412 \pm 220
Ασθενείς που έλαβαν αγωγή με NA				
ΧΗΒ – ιαιμία (NA)	821 \pm 543	488 \pm 411	1747 \pm 176	1432 \pm 354
ΧΗΒ-ανταπόκριση (NA)	848 \pm 684	532 \pm 516	1758 \pm 126	1432 \pm 244
Ασθενείς που έλαβαν αγωγή με Peg-IFN-2a				
ΧΗΒ-ιαιμία (Peg-IFN-2a)	1110 \pm 592	414 \pm 201	1573 \pm 50	1108 \pm 470
ΧΗΒ-ανταπόκριση (Peg-IFN-2a)	985 \pm 475	587 \pm 443	1600 \pm 42	1457 \pm 217
Ομάδα Α - ιαιμία	1215 \pm 490	431 \pm 131	1583 \pm 30	1247 \pm 494
Ομάδα Α - ανταπόκριση	1131 \pm 401	681 \pm 558	1621 \pm 44	1543 \pm 12
Ομάδα Β - ιαιμία	954 \pm 918	388 \pm 355	1558 \pm 93	899 \pm 501
Ομάδα Β - ανταπόκριση	765 \pm 648	447 \pm 311	1570 \pm 12	1307 \pm 337

Συζήτηση

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της p38 MAPK σε ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β. Τα ευρήματα που προέκυψαν είναι τα ακόλουθα: 1) οι ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη (τόσο οι ανενεργοί φορείς όσο και οι ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη) εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι ανενεργοί φορείς παρουσίαζαν τα υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης από τις τρεις ομάδες ελέγχου, 2) οι ανενεργοί φορείς του ιού παρουσίαζαν τα υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK τόσο στο σύνολο των PBMCs όσο και στους κυτταρικούς T υποπληθυσμούς, και ιδιαίτερα στα CD3⁺ (T λεμφοκύτταρα) και CD56⁻ κύτταρα (non-NK cells), 3) οι ανενεργοί φορείς παρουσίαζαν μεγαλύτερη παραγωγή IFN-γ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες αλλά και τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, 4) η παραγωγή/έκφραση IFN-γ φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση της p38 MAPK, δεδομένου ότι η επώαση των PBMCs με τον αναστολέα της p38MAPK οδήγησε στη μείωσή της, 5) η επίτευξη ιολογικής ανταπόκρισης σχετίστηκε με μείωση της ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs και ιδιαίτερα στα CD3⁺ (T λεμφοκύτταρα) και τα CD56⁻ κύτταρα (non-NK cells).

Στην παρούσα μελέτη, η ενεργοποίηση της p38 MAPK προσδιορίστηκε με τη τεχνική της κυτταρομετρίας ροής και τη χρήση φωσφοειδικών αντισωμάτων χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί στο πρόσφατο παρελθόν κατά το οποίο PBMCs επάζονται σε 4 χρονικές στιγμές (30, 60, 120 και 240 λεπτά) με μη ειδικούς διεγέρτες [151]. Με τη χρήση του πρωτοκόλλου αυτού είναι δυνατή

η ταυτόχρονη μέτρηση της ενεργοποίησης της p38 MAPK και της ενδοκυττάριας έκφρασης κυτταροκινών, όπως της IFN- γ . Ως διεγέρτες, χρησιμοποιήθηκαν το arsenite καθώς και ο συνδυασμός PMA με ionomycin. Το arsenite αποτελεί παράγοντα stress που επάγει την ισχυρή ενεργοποίηση του μονοπατιού της p38 MAPK και αποτελεί ιδανικό *in vitro* διεγέρτη σε πειράματα στα οποία επιδιώκεται υψηλής έντασης διέγερση που επιτυγχάνεται ταχέως (σε 15 με 30 λεπτά) [152]. Ωστόσο, η επαγόμενη από το arsenite ενεργοποίηση της p38 MAPK διαρκεί για μικρό χρονικό διάστημα (<60 λεπτά). Για το λόγο αυτό, όταν επιδιώκεται ταυτόχρονα υψηλής έντασης και μεγάλης διάρκειας διέγερση του μονοπατιού της p38 MAPK, απαιτείται ερεθισμός του μονοπατιού με άλλης φύσης διεγέρτες, από τους οποίους ιδανικότερος είναι ο συνδυασμός του PMA με ionomycin [151]. Οι διεγέρτες αυτοί προκαλούν άμεση, δυνατή και παρατεταμένη ενεργοποίηση της p38 MAPK, ενώ παράλληλα επάγουν την πρωιμότερη έκφραση IFN- γ στα PBMCs και σε υποπληθυσμούς αυτών, όπως τα CD3 και CD56 κύτταρα [149, 153]. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα στον ερευνητή να μελετήσει *in vitro* το ρόλο της p38 MAPK στην παραγωγή κυτταροκινών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή απόκριση του ξενιστή κατά τη διάρκεια της λοίμωξης.

Ωστόσο τόσο το arsenite όσο και ο συνδυασμός PMA με ionomycin αποτελούν μη φυσικούς διεγέρτες που δεν προσομοιάζουν του περιβάλλοντος που δημιουργείται από την ενεργοποίηση κυτταροκινών που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της p38 MAPK υπό φυσιολογικές συνθήκες stress (π.χ. λοίμωξης). Για το λόγο αυτό, μελέτες ενεργοποίησης της p38 πρέπει να συμπεριλαμβάνουν συνδυασμό κυτταροκινών που διεγείρουν με φυσιολογικό τρόπο το μονοπάτι της. Στο πρωτόκολλό μας

χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα και κυτταροκίνες, όπως ο συνδυασμός rIL-12 και rIL-2 και ο συνδυασμός rIL-12 και rIL-18, όπως έχουμε χρησιμοποιήσει με επιτυχία σε ανάλογα πειράματα στο παρελθόν [149]. Ο συνδυασμός rIL-12 με rIL-18 έχει δείξει ότι ρυθμίζει την παραγωγή IFN- γ σε διεγερμένους ανθρώπινους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, διαμέσου σταθεροποίησης της κυτταροκίνης σε μεταγραφικό επίπεδο [150]. Συμπερασματικά, το πρωτόκολλό μας και οι διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν μας προσέφεραν την ιδανική μέθοδο για την εις βάθος μελέτη της ενεργοποίησης της p38 MAPK σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β.

Στην παρούσα μελέτη, η κινητική της ενεργοποίησης της p38 MAPK ήταν ίδια τόσο στους υγιείς μάρτυρες όσο και στους ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη και ανάλογη με αυτή σε προγενέστερες μελέτες μας σε ασθενείς που έπασχαν από αυτοάνοσα νοσήματα και όχι λοιμώδη νοσήματα [149]. Συγκεκριμένα, με τη χρήση των ισχυρών μη ειδικών διεγερτών arsenite και PMA με ionomycin τα μέγιστα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK επιτεύχθηκαν στα 30 λεπτά επώασης με σταδιακή μείωση των ποσοστών αυτών συν τω χρόνω. Αντίθετα για τους συνδυασμούς των κυτταροκινών rIL-12 με rIL-2 και rIL-12 με rIL-18 τα μεγαλύτερα ποσοστά ενεργοποίησης παρατηρήθηκαν στα 60 και 120 λεπτά επώασης.

Από την ανάλυση των δεδομένων που αφορούν στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της p38 MAPK, οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (τόσο οι ανενεργοί φορείς του ιού όσο και οι ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β) εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η λοίμωξη από τον HBV οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της p38, ανεξάρτητα από το στάδιο της λοίμωξης.

Μέχρι στιγμής ο ρόλος της σηματοδοτικής οδού της p38 MAPK στην λοίμωξη από τον HBV δεν είναι σαφής δεδομένου ότι οι υπάρχουσες μελέτες είναι λίγες και με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ο σχεδιασμός αυτών αφορούσε κυρίως στη διερεύνηση του ρόλου της p38 MAPK στην ηπατοκαρκινογένεση και όλες έχουν χρησιμοποιήσει πειραματικά μοντέλα με διαγονιδιακά ποντίκια και καρκινικές κυτταρικές σειρές [136-145].

Οι Chang και συνεργάτες έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της p38 MAPK είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του HBV σε καρκινικά ηπατοκύτταρα Huh-7 [143]. Επιπλέον, η φαρμακευτική καταστολή της p38 MAPK στα μολυσμένα με HBV Huh7 κύτταρα οδήγησε στην αναστολή της έκκρισης πρωτεϊνών του HBV, της σύνθεσης RNA, καθώς και του ιικού πολλαπλασιασμού, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης του cccDNA [143]. Επίσης η παρουσία της πρωτεΐνης HBx σε κυτταρικές σειρές Huh7 φάνηκε ότι μπορεί να αναστείλει την απόπτωση και να επάγει μιτογόνους μηχανισμούς που μπορεί να σχετίζονται με τη πρόοδο και τη χρονιότητα της νόσου μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού της p38 MAPK [140, 144-145].

Ωστόσο, ο βαθμός ενεργοποίησης της p38 MAPK σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα που έχουν μολυνθεί με τον ιό της ηπατίτιδας Β παραμένει άγνωστος. Παρόλα αυτά, όπως πειστικά καταδεικνύεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, περιφερικά λεμφοκύτταρα από ασθενείς με ηπατίτιδα Β χαρακτηρίζονται από αυξημένο βαθμό ενεργοποίησης της p38 MAPK.

Η ενεργοποίηση της p38 MAPK στα κύτταρα αυτά προφανώς απαιτεί τη διαμεσολάβηση κυτταροκινών, που παράγονται άμεσα ή έμμεσα από την επίδραση

του λοιμογόνου παράγοντα. Σε μια μελέτη σε μακροφάγα μολυσμένα από τον ιό, η ικανότητα παραγωγής τους προφλεγμονωδών κυτταροκινών ήταν άμεσα συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση της p38 MAPK και άλλων μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών [136].

Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων μας έδειξε ότι ανενεργοί φορείς του HBV παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK συγκριτικά με τους ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β. Το αποτέλεσμα αυτό χρήζει περαιτέρω συζήτησης. Βάσει των προαναφερομένων, η παρουσία ιαμίας είναι στενά συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση της p38 MAPK. Απότοκος της παραδοχής αυτής θα ήταν η ανεύρεση, σε πειραματικό επίπεδο, μεγαλύτερης ενεργοποίησης της p38 MAPK σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β παρά σε ανενεργούς φορείς του ιού. Παραδόξως αυτό δεν ανευρέθη στη δική μας μελέτη, καταδεικνύοντας την πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης του ιού με μοριακούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς, όπως η p38 MAPK. Δεν αποκλείεται ο ρόλος της p38 MAPK να είναι διαφορετικός σε επίπεδο ηπατοκυττάρων από ότι αυτός που βλέπουμε στην περιφέρεια των ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη. Σε ηπατοκύτταρα ενεργών φορέων μπορεί να υπάρχει μειωμένη ενεργοποίηση της p38 MAPK που να οδηγεί σε έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού στο μολυσμένο ηπατοκύτταρο διαμέσου έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών, που ωστόσο επάγουν την ενεργοποίηση της p38 MAPK στην περιφέρεια.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης απορρέει από τη δυνατότητα που μας δίνει το συγκεκριμένο πρωτόκολλο στα πειράματα της κυτταρομετρίας ροής να εκτιμήσουμε την ενεργοποίηση της p38 MAPK σε επιμέρους κυτταρικούς

υποπληθυσμούς. Συγκεκριμένα, από την ανάλυση των δεδομένων μας προκύπτει ότι το υψηλότερο ποσοστό ενεργοποίησης της p38 MAPK παρατηρήθηκε στα CD3+ λεμφοκύτταρα και τα CD56- κύτταρα.

Όπως είναι γνωστό το CD56 αποτελεί το βασικό δείκτη που χαρακτηρίζει τα NK κύτταρα. Επομένως, στη δική μας μελέτη ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός με ενεργοποιημένο p38 MAPK δεν μπορεί να είναι τα NK και τα NKT κύτταρα. Δεδομένου ότι το CD3 είναι ο κύριος δείκτης που χαρακτηρίζει τα T λεμφοκύτταρα (pan-T) συμπεραίνεται ότι τα κύτταρα με το μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποίησης p38 MAPK δεν μπορεί να είναι άλλα από τα CD4+ ή/και τα CD8+ T λεμφοκύτταρα. Προηγούμενες μελέτες έχουν τονίσει ότι ο ρόλος της p38 MAPK είναι ειδικός για τον τύπο του κυττάρου (cell-type specific) [154, 155]. Για παράδειγμα, ενώ η έκφραση της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF-α στα μυελοειδή κύτταρα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω του p38 MAPK μονοπατιού, στα T λεμφοκύτταρα η έκφραση αυτής της κυτταροκίνης δεν εξαρτάται από αυτό το μονοπάτι [154, 155]. Επίσης σε σπληνικά κύτταρα ποντικού η επαγόμενη από CD3 και CD3/CD28 έκφραση της IL-4 εν μέρει καταστέλλεται από τον αναστολέα της p38 MAPK [156]. Όταν ανθρώπινα CD4+ T κύτταρα διεγείρονται από CD3 και/ή CD28, η καταστολή του p38 MAPK με φαρμακευτικό αναστολέα οδηγεί στην δραματική μείωση της έκφρασης της IL-4 καθώς και των IL-5 και IL-13 [154, 155]. Τα παραπάνω αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της p38 MAPK στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ Th1 και Th2 κυτταρικής ανοσίας. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από δεδομένα σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα, στα οποία το μονοπάτι της p38 MAPK φαίνεται ότι επιλεκτικά μπορεί να τροποποιήσει την επαγόμενη από IL-12 έκφραση της IFN-γ και όχι τόσο

από διέγερση μέσω του TCR (T-cell receptor) [154, 155]. Ανάλογα με ότι συμβαίνει στα CD4+ T λεμφοκύτταρα, η επίμονη ενεργοποίηση της p38 MAPK επάγει την παραγωγή IFN- γ στα CD8+ T λεμφοκύτταρα, ενώ η καταστολή της p38 MAPK φαίνεται να οδηγεί σε μείωση της παραγωγής IFN- γ από τα κύτταρα αυτά [157]. Τελικά, η υπάρχουσα βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι η σηματοδοτική οδός της p38 MAPK ρυθμίζει την παραγωγή IFN- γ στα CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα με παρόμοιο τρόπο [158]. Σε συνάφεια με τα παραπάνω, ασθενείς με HIV λοίμωξη χαρακτηρίζονται από υψηλή φωσφορυλίωση της MAPK. Από ότι φαίνεται τα υψηλότερα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p38 MAPK ανευρίσκονται στα CD8+ T λεμφοκύτταρα [159]. Επίσης η p38 MAPK είναι απαραίτητη για τον ιικό πολλαπλασιασμό στην λοίμωξη από τον CMV, τόσο στα πρωίμα όσο και στα όψιμα στάδια της λοίμωξης [160].

Ο σχεδιασμός της μελέτης μας δεν περιελάμβανε απάντηση στο λογικό ερώτημα, εάν η φωσφορυλίωση της p38MAPK είναι χαρακτηριστικό των CD4+, των CD8+ T λεμφοκυττάρων ή και των δύο. Η πολυπλοκότητα των πειραμάτων με πολλαπλούς διεγέρτες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές σε συνδυασμό με τη σχετικά περιορισμένη διαθεσιμότητα βιολογικού υλικού δεν μας έδωσε τη δυνατότητα να απαντήσουμε σε μια τέτοια υπόθεση. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι η παρούσα εργασία, απ' όσο γνωρίζουμε, είναι η πρώτη μέχρι τη στιγμή στη διεθνή βιβλιογραφία, που έχει μελετήσει το ρόλο της p38 MAPK σε επίπεδο λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα σε ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη. Πειράματα κυτταρομετρίας ροής που βασίζονται σε συζευγμένα με

φθοριόχρωμα CD4 και CD8 αντισώματα θα μας δώσουν τη δυνατότητα να παράξουμε αποτελέσματα προς αυτή την κατεύθυνση σε μελλοντικές μελέτες.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση της p38 MAPK στα CD56+ κύτταρα δεν ήταν αμελητέα. Προηγούμενες μελέτες τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς με φλεγμονώδη νοσήματα (λοιμώδη και αυτοφλεγμονώδη) υποστηρίζουν τον ρόλο της p38 MAPK επαγόμενης παραγωγής κυτταροκινών και κυρίως IFN- γ ως εργαλείο του μηχανισμού της εγγενούς ανοσίας [128, 129, 149]. Όπως προκύπτει από τα μέχρι τώρα δεδομένα, τα NK κύτταρα ασθενών με οξεία HBV λοίμωξη είναι δυσλειτουργικά και ανίκανα να παράξουν IFN- γ στη φάση της μέγιστης ιαιμίας [116]. Δεν αποκλείεται η μειωμένη ενεργοποίηση της p38 MAPK στα NK κύτταρα να εξηγεί εν μέρει την αδυναμία τους να συμμετέχουν επαρκώς στην ανοσιακή απάντηση έναντι του ιού.

Στους ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β διαπιστώθηκε μείωση της ενεργοποίησης της p38 MAPK στο σύνολο των PBMCs και στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων στη φάση της βιοχημικής και ιολογικής ανταπόκρισης στην αντι-ϊική αγωγή σε σύγκριση με αυτή της ιαιμίας. Το γεγονός ότι οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές μπορεί να αποδοθεί κυρίως στο ότι ο συνολικός αριθμός ασθενών που αναλύθηκε ήταν σχετικά μικρός. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με αυτά των Chang και συνεργατών, που διαπίστωσαν ότι η καταστολή της p38 MAPK σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων από ηπάτωμα (Huh7 κύτταρα) οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού του HBV [143]. Δεδομένα για το ρόλο των αντι-ικκών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των NA και της Peg-IFN- α δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Μελέτη, όμως, σε CD34+

κύτταρα ασθενών με αληθή πολυκυτταραιμία τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία διάφορων μορφών IFN- α , ανέδειξε πως η χορήγηση της Peg-IFN-2a μειώνει τον αριθμό των JAK2V617F θετικών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της p38 MAPK [161]. Βέβαια πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί σε τέτοιου είδους μελέτες, γιατί χρειάζεται μεγάλος αριθμός μελετών για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και γιατί η κινητική του βαθμού ενεργοποίησης της p38 MAPK πρέπει να μελετηθεί σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Η IFN- γ διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στην επαγωγή μη κυτταρολυτικών μηχανισμών για το έλεγχο του πολλαπλασιασμού του HBV [95-97]. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η παραγωγή/έκφραση IFN- γ φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση της p38 MAPK, δεδομένου ότι η επώαση των PBMCs με τον αναστολέα της p38 MAPK οδήγησε στη μείωσή της τόσο στα πειράματα με ELISpot, όσο και σε αυτά με ELISA. Ωστόσο, η παραγωγή της IFN- γ φαίνεται να εξαρτάται και από μηχανισμούς ανεξάρτητους από το μονοπάτι της p38 MAPK μια και ο αναστολέας μπορεί μόνο μερικώς να αναστείλει την παραγωγή της.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας δείχνει για πρώτη φορά τον σημαίνοντα ρόλο της p38 MAPK στην ανοσιακή απόκριση σε ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη.

Βιβλιογραφία

1. World Health Organization (WHO), Hepatitis B, 2015
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Hepatitis B, 2012
3. Cainelli et al, Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries, *World J of Hepatology* 2012 (4): 73-80
4. Lavanchy et al, Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment and current and emerging prevention and control measures, *Journal of Viral Hepatitis* 2001 (11): 97-107
5. ΚΕΕΛΠΟ, Ιογενείς Ηπατίτιδες, Newsletter 2012
6. Stefos et al, Descriptive epidemiology of chronic hepatitis B by using data from a hepatitis registry in Central Greece, *Eur J of Internal Medicine* 20 (1): 35-43.
7. Zervou et al, Intrafamilial spread of hepatitis B virus infection in Greece, *Eur J of Gastroenterology and Hepatology* 2005 (17): 911-15
8. Raptopoulou et al, Epidemiology, course and disease burden of chronic hepatitis B infection. HEPNET study for chronic hepatitis B: a multicenter Greek study, *Journal of Viral Hepatitis* 2008 (10):1-8
9. Askarian et al, Precautions for Health Care Workers to Avoid Hepatitis B and C Virus Infection, *Int J of Occup Medicine* 2011 (2): 191-198
10. Allain et al, Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis virus infection, *Transfusion* 2012: 1-11
11. Candotti et al, Transfusion - transmitted hepatitis B virus infection, *Journal of Hepatology* 2009 (51): 798-809

12. Schreiber et al, The risk of transfusion-transmitted viral infections, *The New England J of Med* 1996 (334): 1685-90
13. Fehr et al, Chronic hepatitis virus in patients on renal replacement therapy, *Nephrol Dial Transplant* 2004 (19): 1049-53
14. Hou, Epidemiology and prevention of Hepatitis B Virus infection, *Intern J of Medical Sciences* 2000 (1): 50-57
15. Chang et al, Hepatitis B virus infection, *Seminars in fetal & neonatal medicine* 2007 (12): 160-167
16. Matthews et al, Quantitative HbsAg and HbeAg predict hepatitis B seroconversion after initiation of HAART in HIV-HBV coinfecting individuals, *PLOS ONE* 2013 (8):1-8
17. Topka et al, Prevalence of hepatitis B in haemodialysis nursing staff in Athens, *J of Renal Care* 2012: 76-81
18. Vos et al, Needlestick injury and accidental exposure to blood: the need for improving the hepatitis B vaccination rate among health care workers outside the hospital, *Am J of Inf Control* 2006: 610-12
19. National Academy of Sciences, *The hepatitis B story, Beyond Discovery* 2000
20. Liang et al, Hepatitis B: The virus and Disease, *Hepatology* 2009 (49): 1-17
21. Delius et al, Structure of the Hepatitis B virus genome, *J of Virology* 1983 (47):337-343
22. Wen Y, Structural and functional analysis of full-length hepatitis B genomes in patients: implications in pathogenesis, *J of Gastroenterology and Hepatology* 2004 (19): 485-89

23. Beck et al, Hepatitis B virus replication, *World J Gastroenterology* 2007 (13):48-64
24. Murakami S, Hepatitis B Virus X protein: structure, function and biology, *Intervirology* 1999 (42):81-99
25. Lee et al, Hepatitis B virus infection, *The N Engl J of Medicine* 1997 (337): 1733-45
26. Don Ganem et al, Hepatitis B virus infection-Natural history and clinical consequences, *The N Engl J of Medicine* 2004 (350): 1118-29
27. Lin et al, Hepatitis B virus nucleocapsid but not free core antigen controls viral clearance in mice, *J of Virology* 2012 (86): 9266-72
28. Chang et al, The innate immune response to hepatitis B virus infection: implications for pathogenesis and therapy, *Antiviral Research* 2012 (96): 405-13
29. Benhenda et al, Hepatitis B virus X protein: molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis, *Advances in Cancer Research* 2009: 75-109
30. Kan et al, Intracellular transport of hepatitis B virus, *World J Gastroenterol* 2007 (13): 39-47
31. Mahtab et al, Hepatitis B virus genotypes: an overview, *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008 (7): 457-464
32. Huy et al, New Complex Recombinant Genotype of Hepatitis B Virus Identified in Vietnam, *J of Virology* 2008 (82): 5657-63
33. Tatematsu et al, A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J, *J of Virology* 2009 (83): 10538-47

34. Ohba et al, Relationships between serotypes and genotypes of hepatitis B virus: genetic classification of HBV by use of surface genes, *Virus Research* 1995 (39): 25-34
35. Kao et al, Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B, *Gastroenterology* 2000 (118): 554-59
36. Shi et al, Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes, *Jpn J Infect Dis* 2012 (65): 476-482
37. Kumar et al, Hepatitis B virus genotype is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D, *Indian J of Gastroenterology* 2005 (24): 19-22
38. Sterneck et al, Hepatitis B virus genomes of patients with fulminant hepatitis do not share a specific mutation, *Hepatology* 1996 (24): 300-6
39. Zhang et al, Genotypes, mutations and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma, *Hepat Mon* 2011 (11): 86-91
40. Girlanda et al, Hepatitis B virus genotype A and D and clinical outcomes of liver transplantation for HBV-related disease, *Liver Transplantation* 2004 (10): 58-64
41. Westland et al, Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase II studies adefovir dipivoxil, *Gastroenterology* 2003 (126): 107-116
42. Dienstag et al, Hepatitis B virus infection, *The New Engl J of Med* 2008 (359): 1486-500
43. Liaw et al, Hepatitis B virus infection, *Lancet* 2009 (373): 582-92
44. Lok et al, Chronic hepatitis B, *Hepatology* 2007 (45): 507-539

45. Ocama et al, Hepatitis B virus infection: current status, *The American J of Med* 2005 (118): 1413e15-22
46. Wang et al, Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress, *American J of Pathology* 2003 (163): 2441-49
47. Ahn et al, Chronic hepatitis B: whom to treat and for how long? Propositions, challenges and future directions, *HepatoI Int* 2010 (4): 386-395
48. Michitaka et al, Gianotti-Crosti syndrome caused by acute hepatitis B virus genotype D infection, *Internal Medicine* 2004 (43): 696-699
49. Han et al, Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis B, *Clin Liver Dis* 2004 (2): 403-18
50. Gocke et al, Association between polyarteritis and Australina antigen, *Lancet* 1970 (2): 1149-53
51. Garcia et al, Polyarteritis nodosa and mixed cryoglobulinaemia related to hepatitis B and C virus coinfection, *Ann Rheum Dis* 2001 (60): 1068-69
52. Lai et al, Membranous nephropathy related to HBV in adults, *N Engl J of Medic* 1991 (21): 1457-62
53. Elewa et al, Treatment of Hepatitis B virus-associated nephropathy, *Nephron Clin Pract* 2011 (119): c41-49
54. Bhimma et al, Hepatitis B virus associated nephropathy 2004 (24): 198-211
55. Apler et al, The pathogenesis of arthritis associated with viral hepatitis. Complement – component studies, *N Engl J of Medicine* 1971 (285): 185-189
56. Hadziyannis SJ, Hepatitis D, *Clin Liver Dis* 1999: 309-325

57. Makino et al, Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA, *Nature* 1987 (329): 343–6.
58. Sureau et al, The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2005 (307): 113–31
59. Fauquet et al, Deltavirus: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London 2005: 735–8.
60. Rizzetto et al, Hepatitis D: thirty years after, *J Hepatol* 2009 (50): 1043-1050.
61. Pascarella et al, Hepatitis D virus: an update, *Liver Int.* 2011 (31): 7-21
62. Caredda et al, Hepatitis B virus-associated coinfection and superinfection with delta agent: Indistinguishable disease with different outcome, *J Infect Dis* 1985: 925-928.
63. Fattovich et al, Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B, *J Infect Dis* 1987 (155): 931-935.
64. Fattovich et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B, *The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep)*, *Gut* 2000 (46): 420-426.
65. Niro et al, Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta, *Hepatology* 2006 (44): 713-720.
66. Castelnau C et al, Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up, *Hepatology* 2006 (44): 728-735.
67. Wedemeyer H et al, Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta, *N Engl J Med* 2011 (364): 322-331

68. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection, *J of Hepatology* 2012 (57): 167-85
69. Keating G, Peginterferon-2a, a review of its use in chronic hepatitis B, *Drugs* 2009 (18): 2633-2660
70. Lau et al, Peg-IFN-2a, lamivudine and the combination for HbeAg-positive chronic hepatitis B, *N Engl J of Med* 2005 (26): 2682-2695
71. Banino et al, Predicting response to Peg-IFN-2a, lamivudine and the two combined for HbeAg-negative chronic hepatitis B, *Gut* 2007 (56): 699-705
72. Marcellin et al, Peg-IFN-2a alone, lamivudine alone and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B, *N Engl J of Med* 2004 (351): 1206-17
73. Janeway et al, Innate Immune recognition, *Annu Rev Immunology* 2002 (20):172-216
74. Ezekowitz et al, Innate Immunity, *Curr Opin Immunol* 1996 (8): 29-35
75. Dustin et al, Coordination of T cell activation and migration through formation of immunological synapse, *Ann Y Acad Sci* 2003 (987): 51-9
76. Janeway et al, Signals and signs for lymphocyte response, *Cell* 1994 (2): 275-85
77. Rajewsky et al, Clonal selection and learning in the antibody system, *Nature* 1996 (381):75-8
78. Chang et al, The innate immune response to hepatitis B virus infection: implications for pathogenesis and therapy, *Antiviral Research* 2012 (96): 405-413

79. Don Ganem et al, Hepatitis B virus infection-Natural history and clinical consequences, *The N Engl J of Medicine* 2004 (350): 1118-29
80. Hare et al, Novel paradigms of innate sensing of viral infections, *Cytokine* 2013 (63): 219-224
81. Koyama et al, Innate immune response to viral infection, *Cytokine* 2008 (43): 336-341
82. Oldstone M, How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players, *Virology* 1997 (234): 179-185
83. Sant et al, The role of CD4+ T cells in viral immunity, *J of Experimental Med* 2012 (209): 1391-95
84. Biron C, Interferons alpha and beta as immune regulators – a new look, *Immunity* 2001 (14): 661-64
85. Webster et al, Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms, *Hepatology* 2000 (32): 1117–1124
86. Gripon et al, Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus, *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 (24): 15655-60
87. Dunn et al, Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection, *Gastroenterology* 2009 (4): 1289-300
88. Wieland et al, Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 101(17): 6669-74
89. Yu S et al, Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening

- the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3, *J Gen Virol* 2010 (8): 2080-90
90. Guidotti et al, Viral clearance without destruction of infected hepatocytes during acute HBV infection, *Science* 1999 (284): 825-9
91. Thimme et al, CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection, *J Virol* 2003 (77): 68-79
92. Ferrari et al, Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection, *J Immunol* 1990 (10): 3442-3
93. Chisari et al, Hepatitis B virus immunopathogenesis, *Annu Rev Immunol* 1995 (13): 29-60
94. Reherman et al, The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis, *J Exp Med* 1995 (181): 1047-58
95. Maini et al, The role of virus-specific CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection, *J Exp Med* 2000 (19): 1269-80
96. Guidotti et al, Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 (91): 3764-8
97. Guidotti et al, Intracellular inactivation of hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes, *Immunity* 1996 (1): 25-36
98. Mueller et al, High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009 (106): 8623–8628 (2009).

99. Schurich et al, Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection, *Hepatology* 2011(53): 1494–1503
100. Cao et al. Intrahepatic expression of programmed death-1 and its ligands in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure. *Inflammation* 2013 (36): 110–120.
101. Mühlbauer et al, PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon- α and - γ and mediates T cell apoptosis, *J. Hepatol* 2006 (45): 520–528.
102. Evans et al, CD8+ T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and non cytolytic functions, *J Immunol* 2010 (184): 287-95
103. Das et al, IL-10–producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection, *J. Immunol.* 2012 (189): 3925–3935
104. Guidotti et al, Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu. Rev. Pathol.*2006 (1): 23–61
105. Das et al, Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection, *J Exp Med* 2008 (205): 2111-24
106. Boni et al, Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspective for immune therapy, *Hepatology* 2001 (4): 963-71
107. Rehermann B, Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells, *Nat Med.* 2013 (7): 859-68.

108. Webster et al, Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000 (32): 1117–1124
109. Grégoire et al, The trafficking of natural killer cells, *Immunol. Rev.* 2007 (220), 169–182
110. Bonorino et al, Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C, *J. Hepatol.* 2009 (51), 458–467
111. Peppas et al, Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection, *PLoS Pathog.* 2010 (6), e1001227
112. Heise et al, Hepatitis B virus RNA-binding proteins associated with cytokine-induced clearance of viral RNA from the liver of transgenic mice, *J. Virol.* 1999 (73), 474–481
113. Radaeva et al, Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners, *Gastroenterology* 2006 (130), 435–452
114. Isogawa et al, Oscillating CD8+ T cell effector function after antigen recognition in the liver, *Immunity* 2005 (23): 53–63
115. Wieland et al, Expansion and contraction of hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 (7): 2129–2134
116. Dunn et al, Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection, *Gastroenterology* 2009 (4): 1289–13000

117. Widmann et al, Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human, *Physiological Reviews* 1999 (79): 143-180
118. Roux et al, ERK and p38-MAPK activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004: 320-344
119. Cohen P, The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells, *Cell Biology* (7): 353-361
120. Cuadrado et al, Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling, *Biochem J* 2010 (429): 403-417
121. Feng et al, p38 mitogen-activated protein kinase and hematologic malignancies, *Arch Pathol Lab Med* 2009 (13): 1850-1856.
122. King et al, Role of p38 and JNK in liver ischemia and reperfusion, *J Hepatobiliary Pancreata Surg* 2009 (16): 763-770
123. Rose et al, Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale, *Physiol Rev* 2010 (90): 1507-1546
124. Huang et al, Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal intergration, propagation and termination, *Cytokine* 2009 (3): 161-169
125. Lee et al, A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis, *Nature* 1994 (372): 739-46
126. Cuenda et al, SB 203580 is a specific inhibitor of a MAPK kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1, *FEBS Letters* 1995 (364): 229-233

127. Fabian et al, A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors, *Nature Biotechnology* 2005 (23): 329-337
128. Mavropoulos et al, The role of p38 MAPK in the aetiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis, *Clin Dev Immunol* 2013 (2013): 1-8
129. Mavropoulos et al, p38 MAPK signaling in pemphigus: implications for skin autoimmunity, *Autoimmune Dis* 2013 (2013): 1-11
130. Pramanik et al, p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun: the determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity, *J Biol Chem.* 2003
131. Kyriakis et al, Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001 (81): 807–869.
132. Dong et al, MAP kinases in immune response, *Annu Rev Immunol* 2002 (20): 55–72
133. Rincon M, Davis RJ. Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol Rev* 2009 (228): 212–224
134. Sumbayev et al, Role of MAP-kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection, *Scandinavian J of Immunology* 2006 (63): 391-400
135. Yu et al, Regulation of proinflammatory cytokine expression in primary mouse astrocytes by coronavirus infection, *J Virology* 2009 (23): i2204-14
136. Cooper et al, Cytokine induction by hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparin sulfate and involves TLR2, *J Immunol* 2005 (175): 3165-76

137. Xiang et al, Hepatitis B virus protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway, *J of Hepatology* 2011 (54): 26-33
138. Hung et al, Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase, *J of Biological Chemistry* 2004 (46): 46384-92
139. Kalra et al, c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p-38 mitogen-activated protein kinase pathway, *J Biol Chem* 2004 (11): 25313-9
140. Kuo et al, Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating SATB1 and HURP expression, *Bioch Pharmacology* 2010 (80): 1093-1102
141. Wang WH et al, Sustained activation of p38 MAPK and c-Jun N-Terminal kinase pathways by hepatitis B virus X protein mediated apoptosis via induction of Fas/FasL and Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor 1/TNF- α expression, *Molecular and cellular biology* 2004 (24): i0352-65
142. Wang et al, Hepatitis B virus X protein via the p38 MAPK pathway induces E2F1 release and ATR kinase activation mediating p53 apoptosis, *J of Biological Chemistry* 2008 (37): 25455-67
143. Chang et al, Suppression of p38-MAPK inhibits hepatitis B virus replication in human hepatoma cells: the antiviral role of nitric oxide, *Journal of Viral Hepatitis* 2008 (15): 490-497
144. Tarn et al, Hepatitis B virus X protein activates the p38 MAPK pathway in dedifferentiated hepatocytes, *J of Virology* 2002: 9763-9772

145. Kim et al, Hepatitis V virus X protein induces perinuclear mitochondrial clustering in microtubule and dynein-dependent manners, *J of Virology* 2007: 1714-26
146. Κατευθυντήριες οδηγίες θεραπευτικής παρέμβασης σε ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδα Β, ΚΕΕΛΠΝΟ Φεβρουάριος 2013
147. Lau et al, Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen, *Gastroenterology* 2002 (3): 614-24
148. Rigopoulou et al, Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity, *Hepatology* 2005 (5): 1028-36
149. Mavropoulos et al, Flow cytometric detection of p38 MAPK phosphorylation and intracellular cytokine expression in peripheral blood subpopulations from patients with autoimmune rheumatic diseases, *J of Immunology Res* 2014: 1-13
150. Mavropoulos et al, Stabilization of IFN- γ mRNA by MAPK p38 in IL-12 and IL-18 stimulated human NK cells, *Blood* 2005 (105): 282-288
151. Mavropoulos et al, Human peripheral blood mononuclear cell culture for flow cytometric analysis of phosphorylated mitogen-activated protein kinases. *Methods Mol Biol.*, 2012 (806):275-85
152. Ludwig et al, The stress inducer arsenite activates MAPK extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase6/p38 dependent pathway, *J Biochem*, 1998 (4): 1917-22

153. Montag et al, Successful simultaneous measurement of cell membrane and cytokine induced phosphorylation pathways [CIPP] in human peripheral blood mononuclear cells, *J Immunol Methods*, 2006 (313): 48-60
154. Dodeller et al, The p38 mitogen-activated protein kinase regulates effector functions of primary human CD4 T cells, *Eur J Immunol* 2005(12):3631-42.
155. Schafer et al, p38 alpha mitogen-activated protein kinase is activated by CD28-mediated signaling and is required for IL-4 production by human CD4+CD45RO+ T cells and Th2 effector cells, *J Immunol* 1999(12): 7110-9.
156. Zhang et al, p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells, *J Immunol* 1999(7): 3819-29.
157. Merritt C et al, Activation of p38 mitogen activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells, *Mol Cell Biol* 2000(20): 936–946.
158. Rincón et al, JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells, *Immunol Rev.* 2003 (192):131-42.
159. Schweneker et al, HIV-induced changes in T cell signaling pathways, *J Immunol.* 2008(10): 6490-500.
160. Johnson et al, Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38, *J Virol.* 2000(3): 1158-67.
161. Lu M et al, Interferon-alpha targets JAK2V617F-positive hematopoietic progenitor cells and acts through the p38 MAPK pathway, *Exp Hematol* 2010 (38): 472-80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μηχανισμών σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες

Μπακαρόζη Μαρία

Παθολογική κλινική και Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο

Τμήμα Ιατρικής – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

(Διευθυντής: Καθ. Γ.Ν. Νταλέκος)

Η εγγενής και η ειδική ανοσιακή απάντηση έναντι του HBV έχει δειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού και στην παθογένεια της ηπατικής βλάβης. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια και κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι στην HBV λοίμωξη ενεργοποιούνται αρκετοί ενδοκυτταριοί σηματοδοτικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παραγωγή κυτταροκινών και τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένου αυτού της p38 MAPK.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συμβολής της ενδοκυττάριας οδού της p38 MAPK σε διάφορα στάδια της χρόνιας HBV λοίμωξης. Μελετήθηκαν 10 ασθενείς με χρόνια ενεργό HBV λοίμωξη στις φάσεις της ιαιμίας και της ανταπόκρισης στην αγωγή (5 έλαβαν νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα (NA) και οι υπόλοιποι έλαβαν PEG-IFN-2a), 3 ανενεργοί φορείς του HBV και 3 υγιείς μάρτυρες. Συγκεκριμένα, στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) και σε T κυτταρικούς υποπληθυσμούς (CD3+, CD3-, CD56+, CD56-) των ανωτέρω υπό μελέτη ομάδων προσδιορίστηκαν: α) η ενεργοποίηση της p38 MAPK στα PBMCs με

τη τεχνική της κυτταρομετρίας ροής μετά την καλλιέργεια των κυττάρων με τους μη ειδικούς διεγέρτες arsenite, PMA και ionomycin, rIL-12 και rIL-18, rIL-12 και rIL-2 σε τέσσερις χρονικές στιγμές επώασης (30', 60', 120', 240'), β) η παραγωγή IFN-γ μετά επώαση των PBMCs με τους συνδυασμούς των rIL-12 με rIL-18 και rIL-12 με rIL-2 με ή χωρίς την παρουσία του ειδικού αναστολέα της p38 MAPK, SB203580, με τις τεχνικές της ELISA και της ELISpot. Παράλληλα μελετήθηκε η ενδοκυττάρια έκφραση της IFN-γ με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής μετά διέγερση με PMA και ionomycin.

Οι ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β στη φάση της ιαιμίας εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης της p38 MAPK στα PBMCs σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Οι ανενεργοί φορείς της νόσου εμφάνιζαν τα υψηλότερα ποσοστά και από τις τρεις ομάδες. Κατά τη φάση της ανταπόκρισης στην αντι-ικκή αγωγή, οι ασθενείς που έλαβαν NA και 2 από τους ασθενείς που έλαβαν PEG-IFN-α παρουσίαζαν μείωση των ποσοστών ενεργοποίησης της p38 MAPK σε σχέση με αυτά στη φάση της ιαιμίας. Οι εν λόγω διαφορές αφορούσαν τόσο το σύνολο των PBMCs όσο και στους κυτταρικούς Τ υποπληθυσμούς και ιδιαίτερα στα CD3+ (T λεμφοκύτταρα) και στα CD56- (non-NK cells) σε όλες τις επιμέρους συνθήκες, δηλαδή όλους τους διεγέρτες και στις τέσσερις χρονικές στιγμές επώασης.

Με τις τεχνικές ELISA και ELISpot διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη εμφάνιζαν μεγαλύτερη παραγωγή IFN-γ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα που αφορούσαν στην ενδοκυττάρια έκφραση IFN-γ με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Στη φάση της ιολογικής ανταπόκρισης στην αντι-ικκή αγωγή, οι ασθενείς με ενεργό HBV λοίμωξη εμφάνιζαν

τάση αύξησης της παραγόμενης IFN- γ . Η επώαση των PBMCs με τον αναστολέα της p38 MAPK οδήγησε στη μείωση της παραγωγής IFN- γ σε όλες της συνθήκες μελέτης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η παραγωγή/έκφραση IFN- γ φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της p38 MAPK στη χρόνια ηπατίτιδα Β.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας δείχνει για πρώτη φορά τον σημαίνοντα ρόλο της p38 MAPK στην ανοσιακή απόκριση σε ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη.

ABSTRACT

The role of intracellular signaling pathways in patients with chronic viral hepatitis

Bakarozi Maria

Department of Medicine and Research Laboratory

School of Medicine – University of Thessaly

(Director: Prof. G.N. Dalekos)

Innate and adaptive immune responses against HBV have been shown to play a pivotal role in the control of viral replication as well as in the causation of liver damage. Studies in transgenic mice and human cell lines have shown that during HBV infection several intracellular signaling pathways, including p38 MAPK, are involved in cytokine production and T-cell differentiation.

The aim of this study was to investigate the role of p38 MAPK signaling pathway in different phases of the natural history of chronic HBV infection. Thirteen patients with chronic HBV infection were studied. Ten patients had chronic active hepatitis and 3 were inactive carriers of HBV. Patients with chronic active hepatitis were studied before antiviral treatment and at the time of virological response (5 were treated with nucleos(t)ide analogues (NA) and 5 were treated with Peg-IFN- α). Three healthy individuals were studied as controls. Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used to determine: a) phosphorylation of p38 MAPK (p-p38) in PBMCs by flow cytometry after incubation with arsenite, PMA and ionomycin and combination of rhIL-12 + rhIL-2 and rhIL-12 + rhIL-18 for 30, 60, 120

and 240 min and b) IFN- γ production from PBMCs after culture with rhIL-12 + rhIL-2 and rhIL-12 + rhIL-18 in the presence or absence of the p38 MAPK inhibitor, SB203580 with ELISA and ELISpot. Also expression of intracellular IFN- γ was estimated by flow cytometry after incubation with PMA and ionomycin.

Both patients with active hepatitis B and inactive carriers had significantly higher percentages of p-p38 MAPK positive PBMCs compared to healthy donors. Inactive carriers had the highest percentages of p-p38 positive PBMCs amongst the 3 groups. Patients receiving NA and 2 out of the 5 patients treated with PEG-IFN- α demonstrated reduced percentages of p-p38 MAPK positive PBMCs at the time of virological response compared to those observed before treatment. Similar results were obtained in PBMCs and T-cell subpopulations, especially in CD3⁺ (T cells) and CD56⁻ (non-NK cells) independent of the stimulus used.

Patients with chronic hepatitis B had higher IFN- γ concentrations compared to healthy controls as demonstrated both in ELISA and ELISpot experiments. Similarly, intracellular IFN- γ expression assessed by flow cytometry was higher in patients with active hepatitis B infection compared to healthy controls. Chronic hepatitis B patients tended to have higher IFN- γ concentrations at the time of virological response compared to those observed before treatment. Pharmacological inhibition of p38 MAPK with SB203580 resulted in reduction of IFN- γ production at all time points in all studied groups. These findings indicate that IFN- γ production/expression correlates with activation of the p38 MAPK intracellular signaling pathway in patients with chronic hepatitis B virus infection.

In conclusion, our study demonstrates for the first time the pivotal role of p38 MAPK signaling pathway in the immune responses during chronic HBV infection.