Uloga mutanata virusa hepatitisa B u liječenju kronične HBV infekcije

Fileš, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:902946

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivana Fileš

Uloga mutanata virusa hepatitisa B u liječenju kronične HBV infekcije

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti na stručnom vodstvu, uloženom vremenu, strpljenju i ugodnoj suradnji prilikom izrade ovog diplomskog rada.
Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom cijelog školovanja.
Također, hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali studentsko razdoblje.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. OBRAZLOŽENJE TEME 3
3. MATERIJALI I METODE 4
4. REZULTATI I RASPRAVA 5
4.1. Virus hepatitisa B (HBV) 5
4.2. Akutni hepatitis B 10
4.3. Kronični hepatitis B 11
4.5. Epidemiologija 12
4.6. HBV klasifikacija 14
4.7. Dijagnostika 16
4.8. Prevencija 18
4.9. Liječenje 19
4.10. Mutacije 28
4.10.1. HBsAg mutacije 29
4.10.2. Mutacije gena Pre-C/C 30
4.10.3. Mutacije X gena 32
4.10.4. Mutacije rezistencije na antivirusne lijekove 33
4.10.5. HBV mutacije u HBV/HIV i HBV/HCV koinficiranih pacijenata 36
5. ZAKLJUČAK 37
6. LITERATURA 38
7. SAŽETAK/SUMMARY 44
7.1. Sažetak 44
7.2. Summary 45
8. Temeljna dokumentacijska kartica 46
9. Basic documentation card 47

1. UVOD

Hepatitis B je upala jetre koja nastaje infekcijom virusom hepatitisa B (HBV). Uglavnom počinje akutnom upalom jetre koja u 95% slučajeva prolazi spontano i bez posljedica. Kod vrlo malog postotka inficiranih osoba akutni hepatitis B prelazi u kronični oblik. Takva kronična infekcija predstavlja visok rizik za razvoj ciroze ili hepatocelularnog karcinoma, zbog čega je potencijalno smrtonosna.

Hepatitis B predstavlja jedan od najvećih zdravstvenih problema čovječanstva. Prema nekim procjenama trenutno je u cijelom svijetu kronično zaraženo oko 240 milijuna ljudi, a oko 1 milijun umire svake godine od posljedica infekcije (www.who.int).

Virus se prenosi isključivo s čovjeka na čovjeka putem tjelesnih tekućina kao što su krv, krvna plazma, slina, urin, sperma, vaginalni sekret i majčino mlijeko. Najčešći put prijenosa u Europi kod odraslih su seksualni kontakti s inficiranim osobama.

Od 1982. godine dostupno je cjepivo koje je 95% učinkovito u prevenciji infekcije i razvoja kronične bolesti jetre uzrokovane HBV virusom. U Republici Hrvatskoj se od 1999. godine, prema Programu obveznih cijepljenja, protiv hepatitisa B cijepe djeca u 6. razredu osnovne škole, a od početka 2007. godine i sva novorođenčad.

Akutni hepatitis B ne zahtjeva liječenje, osim ako se radi o ozbiljnoj akutnoj infekciji pri čemu se daju nukleoz(t)idni analozi koji poboljšavaju preživljavanje i smanjuju vjerojatnost reakcijskog hepatitisa. Cilj liječenja kronične infekcije je kontrola razmnožavanja virusa čime se pokušava kontrolirati stupanj oštećenja jetre. Više je lijekova koji dokazano imaju antivirusni učinak i koriste se u liječenju hepatitisa B, a to su: lamivudin, adefovir, entekavir, telbivudin, tenofovir, konvencionalni i pegilirani interferon-alfa.

Dijagnoza bolesti postavlja se nakon temeljitog pregleda bolesnika, putem rezultata krvnih pretraga i po mogućnosti učinjene biopsije jetre. Kliničkim pregledom utvrđuje se prisutnost simptoma osipa ili žutila kože, povećanje jetre ili slezene kao i nakupljanje suviška tekućine u tijelu. Krvne pretrage obuhvaćaju testove jetrene funkcije (ALT, AST, bilirubin, albumin i protrombinsko vrijeme) te serološke markere hepatitisa (antigeni HBsAg, HBeAg, HBcAg,

protutijela anti HBs, anti HBe, anti HBc, anti HBc-IgM te virusna HBV DNA). Biopsija jetre služi za kvalitativnu i kvantitativnu mikroskopsku procjenu stupnja bolesti (Včev i Begić, 2008).

Usprkos postojanju cjepiva, infekcija virusom hepatitisa B (HBV) još uvijek je visoko prisutna u cijelom svijetu i predstavlja značajan faktor morbiditeta i mortaliteta. Većina se pacijenata oporavi od akutne infekcije, dok oni kod kojih prijeđe u kronični oblik bolesti imaju veliki rizik od razvoja komplikacija kao što su hepatocelularni karcinom, ciroza i zatajenje jetre. Na infekciju hepatitisom B može utjecati mnogo čimbenika, kao što su imunološki status osobe, starost u vrijeme infekcije i razina virusne replikacije. Otkriće postojanja različitih genotipova i njihove povezanosti s različitim zemljopisnim podjelama kao i znanje vezano uz različite vrste mutanata pridonijelo je boljem razumijevanju prirode HBV infekcije i omogućilo bolju brigu za pacijente (http://www.hepatos.hr).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Infekcija virusom hepatitisa B glavni je uzrok akutne i kronične upale jetre te njenih dugoročnih komplikacija. To je najvarijabilniji virus među DNA virusima, najviše zbog svog jedinstvenog životnog ciklusa koji uključuje aktivnost reverzne transkriptaze, enzima sklonog pogreškama i vrlo visoku proizvodnju virusa po danu.

Mutacije virusa mogu nastati spontano ili pod utjecajem cjepiva, antivirusnih lijekova, monoklonskih protutijela, hepatitis B-imunoglobulina (HBIg), a opisane su u akutnom hepatitisu, fulminantnom hepatitisu, kroničnom hepatitisu, u reinfekciji nakon transplantacije jetre i u imunokompromitiranih osoba. Postoje 4 tipa klinički značajnih mutacija virusa: divlji HBV, pre-core-mutacija, core-promotor mutacija i YMDD mutacija (Bradarić i Vucelić, 2006).

Razumijevanje učestalosti i kliničkih implikacija različitih virusnih mutacija doprinosi poboljšanju dijagnostičkih postupaka, prikladnijem planiranju imunizacijskih programa i stvaranju najučinkovitijih terapijskih protokola (Lazarević, 2014).

3. MATERIJALI I METODE

Prilikom pisanja ovog diplomskog rada pretražena je literatura iz PubMed baze podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), te znanstveni radovi iz javno dostupnih znanstvenih časopisa.

Također su korištene smjernice Svjetske zdravstvene organizacije: *Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection*.

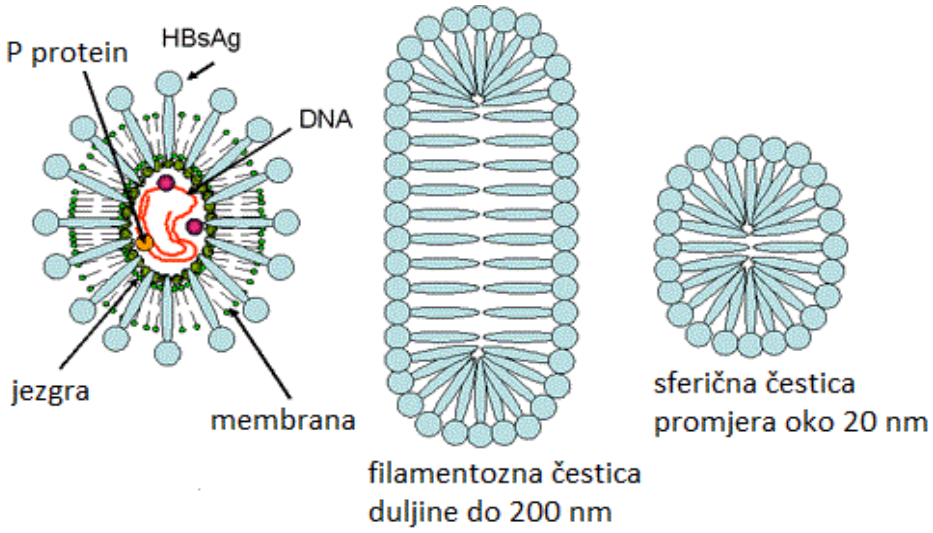
Kao izvor informacija korištene i su mrežne stranice:

http://www.hepatos.hr
http://www.microbiologybook.org
http://www.who.int
http://www.hzjz.hr
http://www.drugbank.ca

4. REZULTATI I RASPRAVA

Virus hepatitisa B (HBV)

Virus hepatitisa B pripada porodici Hepadnavirusa koja obuhvaća i različite vrste sličnih virusa sisavaca (Orthohepadnavirus) i ptica (Avihepadnavirus). HBV virion (Daneovo tjelešce) okrugla je čestica promjera 42 nm s vanjskom lipoproteinskom ovojnicom, unutar koje se nalazi virusna nukleokapsida ili jezgra (core) koja se sastoji od virusne DNA, HBcAg, DNA polimeraze/reverzne transkriptaze, protein kinaze i HBeAg. Osim viriona, serum i hepatociti inficiranih osoba sadržavaju veliku količinu subvirusnih čestica koje nisu infektivne jer ne sadržavaju virusnu DNA, no izrazito su imunogene te stimuliraju produkciju niza neutralizirajućih protutijela, što je iskorišteno u izradi cjepiva. Svi se Hepadnavirusi razmnožavaju uz DNA-polimerazu (Burek, 2005).



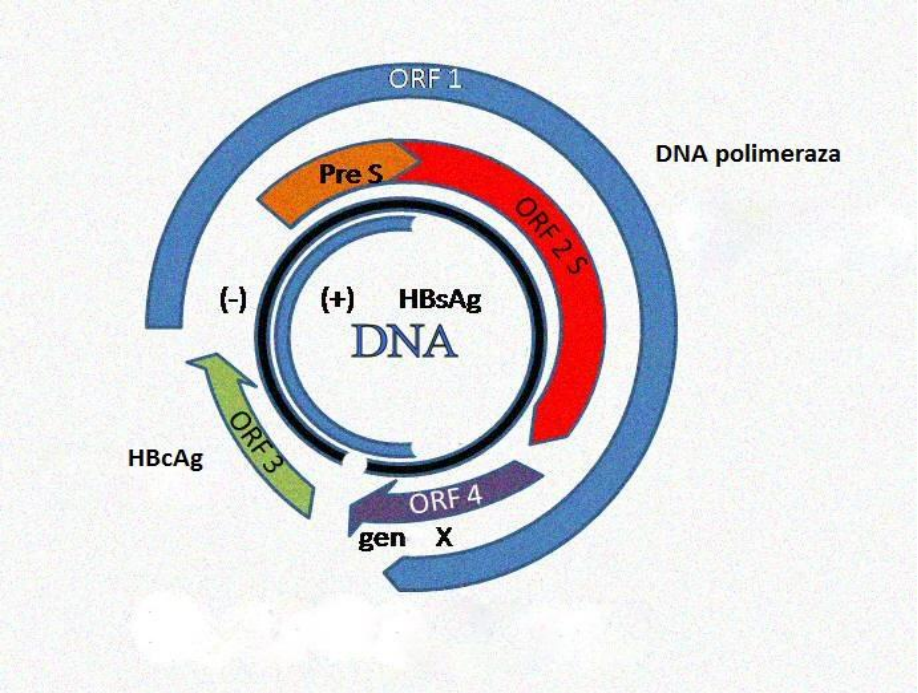
Slika 1. Virus hepatitisa B (Dane-ova čestica).

Genom virusa čini mala kružna DNA koja sadrži četiri gena (oko 3200 parova baza) s djelomično preklapajućim okvirima čitanja (ORF). ORF kodiraju protein polimeraze (P gen), tri površinska proteina – "surface" (pre-S/S gen), proteinski omotač nukleokapside – "core" (pre-C/C gen) i X-protein (X gen) (Pavić, 2005).
Pre-S/S gen kodira tri virusna površinska proteina: S, pre-S1 ili L-protein te pre-S2 ili M-protein. Najbrojniji je pre-S1 protein, poznatiji kao HBsAg, molekularne mase 24 kDa. Funkcija proteina M (pre-S2) nije poznata, dok L-protein (pre-S1) ima ključnu ulogu u vezanju virusa za receptore na stanici domaćina, u razlaganju virusa i njegovu oslobađanju u stanici (Vucelić i sur., 2005). Razvoj stanične i humoralne imunosti na HBsAg štiti od infekcije, a rekombinantni HBsAg je temelj trenutno dostupnog HBV cjepiva (Lee, 1997).

Gen pre-C/C kodira peptid nukleokapsidne virusne jezgre (HBcAg) i protein pre-C koji se posttranslacijski modificira u 16 kDa protein HBeAg. Kad su peptidi HBcAg eksprimirani na površini hepatocita, oni induciraju stanični imuni odgovor koji je ključan za uklanjanje inficiranih stanica. HBeAg je marker virusne replikacije, no nije nužan za replikaciju virusa, budući da su mutanti virusa s inhibiranim prijepisom „precore" sekvence podjednako replikativni (Vucelić, 2005).

P-regija genoma odgovorna je za kodiranje DNA polimeraze (P), koja ujedno ima ulogu reverzne transkriptaze (RT) za sintezu komplementarne DNA iz RNA kalupa. Unutar polimeraze nalazi se visokokonzervirani slijed aminokiselina YMDD (tirozin, metionin, aspartat, aspartat) koji ima ulogu u vezanju nukleozida, a mutacije u toj regiji imaju važne terapijske implikacije.

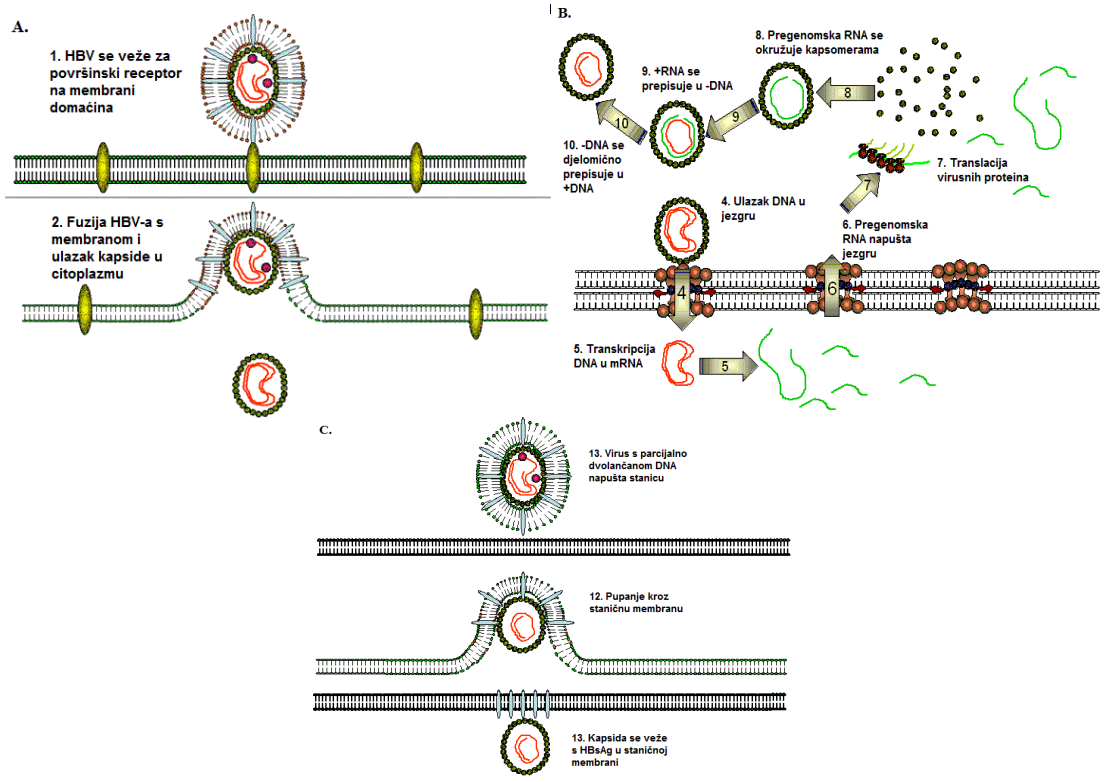
X-regija genoma kodira X-protein (HBx) koji modulira transdukcijske signale u stanici domaćina i aktivator je transkripcije genoma virusa, a pretpostavlja se da ima ulogu u razvoju hepatocelularnog karcinoma. Potreban je za replikaciju *in vivo* i širenje virusa (Bradarić i Vucelić, 2006).



Slika 2. Genom HBV. *Kružni DNA genom virusa hepatitisa B sadrži četiri gena: S gen koji kodira mali, veliki i srednji HBsAg, C gen kodira HBcAg i HBeAg, P gen kodira DNA polimerazu i X gen kodira HBxAg. Svi poznati ORF nalaze se na antisense (-DNA) lancu.*

Mehanizam kojim HBV i ostali Hepadnavirusi inficiraju hepatocite još nije potpuno razjašnjen. Životni ciklus virusa započinje vezanjem na nepoznat specifičan receptorski kompleks. Pokazano je da je pre-S1 domena potrebna za vezanje i početak infekcije. Nakon ulaska viriona i gubitka ovojnice, nukleokapside se prenose do stanične jezgre. U jezgri se virusna +DNA nit kompletira do postizanja potpune dvolančane DNA molekule i krajevi se spajaju tvoreći kovalentno zatvorenu kružnu DNA (cccDNA). cccDNA ima vrlo dugo poluvrijeme života unatoč činjenici da nije integrirana u stanični genom i ponaša se kao glavni transkripcijski uzorak virusa (Lazarević, 2014). Ta molekula služi kao mali kromosom po kojem se sintetizira kompletna molekula RNA, koju polimeraza zapakira u virusnu česticu unutar koje se uz aktivnost reverzne transkriptaze sintetizira novi DNA genom. Tako cccDNA u jezgri hepatocita može u svakom trenutku potaknuti replikaciju virusa. Većina antivirusnih lijekova ima malen ili nikakav utjecaj na cccDNA što je razlog ponovne pojave HBV DNA nakon prekida terapije (Burek, 2005). Virusna cccDNA se pomoću stanične RNA polimeraze II prepisuje u mRNA. Za razliku od retrovirusa, DNA virusa hepatitisa B se obično ne ugrađuje u staničnu DNA. Budući da virusna DNA sadrži četiri promotora, transkripcijom se dobivaju četiri mRNA različite dužine koje imaju isti kraj i poliadenilirani (poly A) rep. Jedna od tih mRNA duža je od genomske DNA te je istovremeno i pregenomska RNA i model za sintezu proteina jezgre. Dvije manje mRNA daju površinske proteine (HBsAg), imaju 3

različita startna kodona pa se prevode u tri proteina različite veličine (L, M i S). Najmanja mRNA od 700 baza kodira za protein HBx čija uloga nije u potpunosti razjašnjena. Pregenomska RNA napušta jezgru i u citoplazmi se kapsulira. Dolazi do reverzne transkripcije pomoću DNA polimeraze, pri čemu –DNA djelomično prepisuje u +DNA. Sama polimeraza se na kraju veže za 5'- kraj –DNA gdje i ostaje. Pupanjem kroz membranu endoplazmatskog retikuluma i/ili Golgijevog tijela virus stječe HBsAg te vezikularnim transportom izlazi iz hepatocita.



Slika 3. Replikacija HBV-a (Hunt, 2011)

A. Vezanjem za površinski receptor dolazi do spajanja virusne i stanične membrane te ulaska kapside u citoplazmu.

B. Virusna DNA ulazi u jezgru te se uz virusni enzim DNA polimerazu kompletira +DNA lanac, povezuju se krajevi i nastaje cccDNA. Pomoću stanične RNA polimeraze II prepisuje se cccDNA u mRNA. mRNA ulazi u citoplazmu gdje translacijom dobivamo virusni omotač, jezgru, polimerazu, HBx i HBcAg. Pregenomska RNA se kapsulira, nakon čega dolazi do reverzne transkripcije uz DNA polimerazu. Iz pgRNA sintetizira se –DNA, koja se zatim djelomično prepisuje u +DNA .

C. Pupanjem kroz membranu endoplazmatskog retikuluma i/ili Golgijevog tijela virus stječe HBsAg i napušta stanicu.

Klinička slika i ishod infekcije ovise o imunosnom odgovoru domaćina. Moguća su dva oblika infekcije: replikativni – formiranje kompletnih virusnih čestica i nereplikativni – sinteza samo HBsAg. Nereplikativni tip infekcije karakterizira pozitivan HBsAg i antiHBe, negativan HBeAg, niski nivo HBV DNA, minimalne upalne promjene u jetri ili bez njih, normalne aminotransferaze, uz dobru prognozu.
U 20-30% nositelja HBsAg razvije se reaktivacija hepatitisa B s porastom alanin-aminotransferaza (ALT) i HBV DNA, s HBeAg-serokonverzijom ili bez nje, sve često u asimptomatskom obliku, no katkada sa slikom koja imitira akutni virusni hepatitis. Aktivna replikacija virusa definirana je povišenim ALT ili pozitivnom HBV DNA. Sam virus nije citopatogen, već je hepatitis posljedica imune destrukcije stanica inficiranih virusom. Tome u prilog govori činjenica da imunodeficijentne osobe imaju blagi akutni hepatitis, no vrlo često ostaju kronični nositelji virusa (Vince, 2005).

Imuni odgovor uključuje glavni kompleks tkivne snošljivosti (MHC) tip II, CD4+ pomoćničke stanice i MHC tip I, CD8+ citotoksične T-limfocite (CTL). CTL je usmjeren na brojne epitope unutar jezgre virusa, polimerazu, proteine omotača, a djelovanje pomoćničkih T-limfocita na C i P-proteine u akutnoj infekciji. Za razliku od akutne infekcije, u kroničnoj infekciji stanični odgovor T-limfocita je oslabljen. Humoralni odgovor je snažan i trajan, premda u nositelja nema antiHBs jer u cirkulaciji prevladava HBsAg (Vucelić i sur., 2005).

Infekciju HBV-om možemo podijeliti u 4 faze. Prva faza je imunosna tolerancija na virus. U zdravih odraslih ljudi, ovo je period inkubacije koji traje dva do četiri tjedna. Nasuprot tome, kod neonatalne infekcije ovaj period često traje desetljećima. Ova faza karakterizirana je visokom razinom HBV DNA, s malo ili bez simptoma te normalnom razinom aminotransferaza. U drugoj fazi se imunološki odgovor pojačava što vodi do stimulacije citokina i direktne lize stanica te upalnog procesa. Sekrecija HBeAg se nastavlja, a razina HBV DNA opada sa smanjenjem broja inficiranih stanica. U slučaju akutne infekcije, ovo je faza simptomatskog hepatitisa i obično traje tri do četiri tjedna. Simptomi su nespecifični, a uključuju povišenu temperaturu, umor, bol u zglobovima i mišićima, žuticu, mučninu, gubitak apetita. Kod kronične infekcije faza 2 može trajati deset i više godina, vodeći do ciroze i njenih komplikacija. Razina ALT-a raste, a HBV DNA u krvi se smanjuje. Kad imuni sustav domaćina uspije eliminirati inficirane stanice ili uvelike smanjiti njihov broj, aktivna virusna replikacija završava i nastupa faza 3. U trećoj fazi HBeAg više nije prisutan, a protutijela na HBeAg se mogu detektirati. Dolazi do značajnog smanjenja virusne DNA, iako su mnogi

pacijenti pozitivni na HBV DNA koja se detektira pomoću PCR-a, metodom umnožavanja DNA lančanom reakcijom polimeraze. Razina aminotransferaza postaje normalna, a infekcija praktički završava. Unatoč tome, pacijenti ostaju HBsAg pozitivni, vjerojatno zbog integracije S gena u genom hepatocita domaćina. Četvrta faza je imuna faza, HBV DNA se više ne može detektirati i pacijent nije podložan reinfekciji. Faktori koji utječu na ove četiri faze infekcije su genetičke predispozicije domaćina, prisutnost drugih virusa, liječenje imunosupresivima, spol i pojava HBV mutanata (Lee, 1997).

Istraživanjima je pokazano da neke osobe koje imaju "dobar imuni odgovor" na infekciju HBV-om (produkciju antiHBs, antiHBe i antiHBc) imaju u jezgri hepatocita, stanicama gušterače i leukocitima periferne krvi cccDNA, koja se u uvjetima imunosupresije može reaktivirati i dovesti ponovno do replikativne faze bolesti u 20-50% kroničnih nositelja (Bradarić i Gošev, 1999).

AKUTNI HEPATITIS B

Otprilike u 70% pacijenata akutni hepatitis B prolazi asimptomatski. Inkubacijski period može varirati od 40 do 140 dana, nakon čega se javljaju nespecifični simptomi kao što su malaksalost, gubitak apetita, mučnina ili bol ispod desnog rebrenog luka. Temperatura je rijetko povišena i nikad ne prelazi 38°C. Žutica obično traje 2-3 tjedna, nakon čega slijedi oporavak. Ekstrahepatalni znakovi koji se javljaju su bol u zgobovima, svrbež te urtikarija. Tipični znakovi akutne infekcije uključuju lagano povećanu i bolnu jetru, blago povećanje slezene i limfnih čvorova. Inkubacijski period karakterizira visoka viremija, ali bez kliničkih i biokemijskih znakova oštećenja jetre što potvrđuje da HBV nije citopatogen, već do oštećenja dolazi razvojem imunog odgovora, koji uzrokuje nekrozu hepatocita. Nakon klirensa virusa nestaju HBsAg i HBeAg, a pojavljuje se cirkulirajući antiHBs.

Fulminantni hepatitis

U 0,1-1% pacijenata nastaje fulminantni hepatitis koji se javlja kao klinički sindrom hepatitisa B u akutnoj i kroničnoj latentnoj HBV infekciji te kao reaktivacijski hepatitis. Posljedica je snažnog imunog odgovora na jedan ili više virusnih antigena, hiperaktivaciji CD8+CTL i profilu proupalnih citokina i medijatora upale. Klinička slika uključuje akutno iznenadno zatajenje jetre s edemom mozga, poremećaj svijesti do kome, difuzna krvarenja, metaboličke

poremećaje, razvoj hepatorenalnog sindroma, kardiopulmonalne komplikacije i infekcije (Jindal i sur., 2013). Edem mozga je uobičajeni uzrok smrti kod fulminantnog hepatitisa. Mutanti hepatitisa B koji ne mogu sintetizirati HBeAg posljedično su odgovorni za nedostatak imunotolerancije prema divljem tipu virusa što može također pogodovati razvoju fulminantnog hepatitisa.

KRONIČNI HEPATITIS B

Kronični hepatitis B definira kontinuirana prisutnost HBsAg u krvi dulje od šest mjeseci. Prirodni tijek HBV infekcije određen je interakcijom između replikacije virusa i imunog odgovora domaćina. Ukoliko imuni odgovor nije dovoljno snažan, infekcija postaje kronična. To je slučaj kod perinatalno stečene infekcije koja u 95% slučajeva prelazi u kronični oblik. Markeri kronične infekcije su HBsAg, HBeAg i HBV DNA. Tijekom vremena infekcija prelazi u drugu fazu kada se razvija imuni odgovor i dolazi do jetrenog oštećenja koje može napredovati do ciroze. Smatra se da je perzistentna replikacija virusa mjerena vrijednostima HBV DNA u serumu ključna za procjenu rizika od razvoja ciroze i potrebu za liječenjem. Titar virusa obično je niži nego u akutnoj infekciji, a stalna viremija upućuje na stalnu replikaciju virusa s obzirom da je poluživot HBV-a približno 1 dan. Kod pacijenata koji razviju protutijela na HBeAg koncentracija virusa u krvi opada. Virus može mutirati u varijante koje ne eksprimiraju HBeAg (HBeAg negativni kronični hepatitis) i takvi pacijenti pokazuju visoku HBV replikaciju uz teže komplikacije bolesti. Oko 3-5% odraslih zaraženih osoba također može razviti kroničnu infekciju, koja slijedi isti obrazac kao perinatalno stečena kronična infekcija (D'Souza i Foster, 2004). Većina kronično inficiranih osoba desetljećima je asimptomatska i umire uslijed komorbidnih stanja (najčešće kardio i cerebrovaskularnih), a manji postotak inficiranih ima simptomatske egzacerbacije, u smislu akutizacije hepatitisa. Ipak u 15-25% ljudi s kroničnim hepatitisom B dolazi do razvoja ciroze ili HCC-a (Včev i Begić, 2008).

Okultni hepatitis B

Prema definiciji okultni hepatitis B (OBI) je stanje HBV infekcije u kojem se virus replicira, a u krvi zaraženih osoba nema osnovnog biljega, HBsAg. HBV-DNA je u krvi uglavnom nedokaziva, dok se može dokazati u jetri. Najčešći razlozi okultne HBV infekcije su: nereplikativna ili slabo replikativna faza HBV infekcije, mutacije, virusna interferencija,

perzistencija nakon ozdravljenja (Burek, 2008). Najveća učestalost okultnog hepatitisa B je u populacijama visokog rizika kao što su bolesnici na hemodijalizi ili anti HCV pozitivne osobe. Problem kod stanja okultnog hepatitisa je što su takve OBI infekcije uglavnom asimptomatske, a izuzetno je važno detektirati OBI u davatelja krvi, organa ili tkiva koji su opasni za imunokomprimitirane primatelje (Mihaljević, 2012).

Reaktivacijski hepatitis B

Reaktivacijski hepatitis javlja se u osoba s okultnom ili preboljelom HBV infekcijom. Očituje se nakon prestanka davanja imunosupresivne terapije i očituje se naglim porastom HBV-DNA u krvi. Simptomatski, bolest se javlja od stupnja asimptomatskog odgovora pa do fulminantnog hepatitisa. Smrtnost kod reaktivacijskog hepatitisa kreće se od 5-40%.

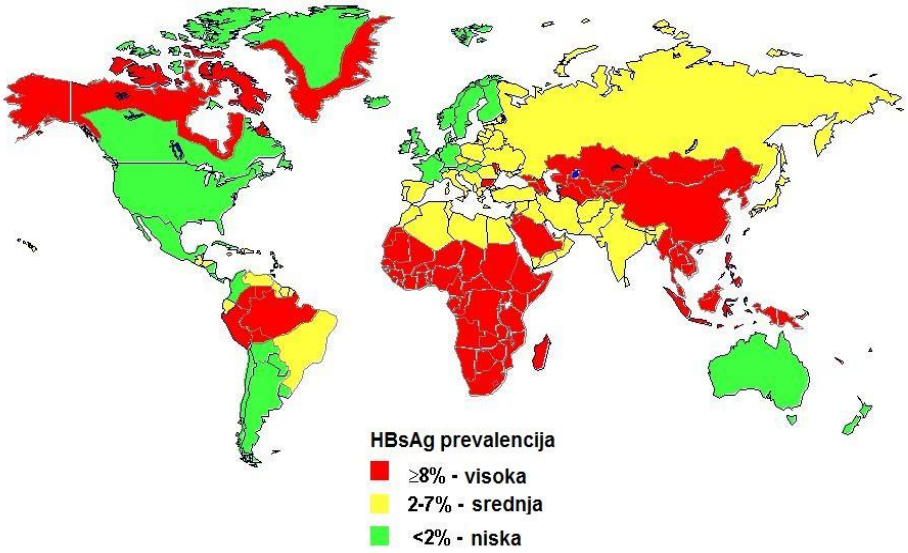
EPIDEMIOLOGIJA

Distribucija HBV-a značajno varira u različitim dijelovima svijeta. Prevalencija kronične HBV infekcije kategorizira se kao visoka, srednja ili niska. Dob u vrijeme infekcije utječe na učestalost infekcije.

U područjima s visokom prevalencijom, kao što su jugoistočna Azija, Kina i subsaharska Afrika 70-95 % populacije ima infekciju u nekom periodu života i više od 8% su kronični prenosioci virusa. U takvim područjima većina infekcija javlja se tijekom ranog djetinjstva.

Područja srednje prevalencije su istočna i južna Europa, Bliski istok, Japan i dio Južne Amerike, gdje 10-60% populacije ima dokaz prisutne ili preboljele infekcije, a 2-7% su kronični prenosioci. Ovdje je čest akutni hepatitis jer se mnoge infekcije javljaju kod adolescenata i odraslih, ali je također održana visoka učestalost kronične bolesti zbog infekcije novorođenčadi i djece. U ovim su područjima putovi prijenosa različiti i uključuju sve dobne skupine.

Pojavnost HBV-a niska je u većini razvijenih zemalja Sjeverne Amerike, zapadne i sjeverne Europe i u Australiji, gdje samo 5-7% ljudi dolazi u kontakt s virusom, od čega je 0.5-2% kronično oboljelih. Većina infekcija javlja se kod adolescenata i odraslih ljudi, i to kod rizičnih skupina kao što su ovisnici o intravenskim drogama, homoseksualci, zdravstveni djelatnici i pacijenti na hemodijalizi ili transfuziji krvi (Hou i sur., 2005).



Slika 4. Geografska distribucija kronične HBV infekcije

Virus hepatitisa B prenosi se kontaktom sa zaraženim tjelesnim tekućinama, a jedini prirodni domaćin je čovjek. Trenutno su poznata 3 načina prijenosa: perinatalni, spolni i parenteralni/perkutani prijenos. Najvažnije sredstvo prijenosa je krv, a značajni su i sjemena tekućina i slina. HBV se ne prenosi zaraženom vodom, hranom, insektima i ostalim vektorima, a nije dokazan ni prijenos zrakom ili fecesom.

Prije nego što je cjepivo protiv HBV-a uključeno u rutinski imunizacijski program, udio djece zaražene perinatalnim prijenosom s HBsAg pozitivnih, ali HBeAg negativnih majki bio je 10-30%. Prijenos s majki koje su HBsAg i HBeAg pozitivne bio je 70-90%. Tri su načina prijenosa s inficirane majke na dijete: transplacentarni prijenos u uterusu, natalni prijenos pri porodu i postnatalni prijenos preko majčinog mlijeka. S obzirom da do transplacentarnog prijenosa dolazi prije rođenja, HBV cjepivo i HBIg ne mogu spriječiti ovaj put zaraze. Djeca zaražena perinatalno imaju 90% šanse za razvoj kronične infekcije, vjerojatno zbog nerazvijenog imunog sustava. Također se transplacentarnim prijenosom HBeAg može razviti imunološka tolerancija na HBV u fetusu (Xu, 1985).

Spolni način prijenosa virusa čest je u svim dijelovima svijeta, posebno u područjima niske prevalencije kao što je Sjeverna Amerika (Alter, 2003). Rizični faktori su homoseksualnost kod muškaraca, česta promjena spolnih partnera, druga spolna bolest i pozitivan serološki nalaz na sifilis (Alter i Mast, 1994).

Parenteralni prijenos uključuje transfuziju krvi, dijalizu, akupunkturu, intravensku upotrebu droga, tetoviranje. Iako se prijenos putem transfuzije zadnjih godina uvelike smanjio zbog

provjere krvi na HBV markere i isključivanjem rizičnih davatelja krvi, prijenos je moguć ukoliko je nositelj virusa HBsAg negativan i nema simptome. U Sjedinjenim Američkim Državama i Zapadnoj Europi upotreba intravenskih droga važan je put prijenosa. Do zaraze može doći i za vrijeme operacija, dentalnih zahvata, obrezivanja i sl. (Margolis i sur., 1991). Rizik za razvoj kroničnih komplikacija kod spolnog i parenteralnog prijenosa je nizak, manje od 5% (Hyams, 1995).

HBV KLASIFIKACIJA

Zbog velike genetičke varijabilnosti HBV se klasificira u 10 genotipova (A-J) i oko 40 subgenotipova koji se razlikuju po geografskoj distribuciji, načinu prijenosa, progresiji bolesti, odgovoru na antivirusnu terapiju ili cjepivo te klinički ishod bolesti. Različiti genotipovi razlikuju se u slijedu nukleotida za više od 7,5%, a subgenotipovi za najmanje 4%.

Prije molekularne analize i otkrića PCR-a klasifikacija HBV sojeva temeljila se na imunološkoj heterogenosti HBsAg. HBV sojevi bili su podijeljeni na 9 serotipova (subtipova): ayw1 do ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq-, adrq+. Razvojem DNA sekvenciranja otkriveno je da su specifične aminokiseline na poziciji 122 (d ili y) i 160 (r ili w) u velikoj hidrofilnoj regiji (MHR) HBsAg-a zaslužne za tu vrstu podjele (Kramvis i sur., 2008). Subtipovi d i w imaju lizin na obje pozicije, dok arginin na obje pozicije upućuje na subtip y ili r. Ostale aminokiseline koje određuju subtip nalaze se na pozicijama 127, 144, 145, 158, 159, 177 i 178.

Tijekom zadnjeg desetljeća ova klasifikacija zamijenjena je genotipiziranjem (Kidd-Ljunggren i sur., 2002). Najpouzdanija metoda određivanja genotipa i subgenotipa HBV-a filogenetska je analiza nukleotidnih sljedova cijelog genoma. Može se izvoditi i na pojedinačnim genima umjesto na cijelom genomu, posebno HBV površinskom (S) genu, ali rezultati parcijalnog sekvenciranja nisu prikladni za određivanje subgenotipa (Hardie i Williamson, 1997).

Razlike između genotipova primijećene su na više razina. Virološke razlike nastale su prilagodbom i evolucijom sojeva kroz vrijeme te insercijom i delecijom slijeda u genomu. Duljina HBV genoma varira od 3182 bp kod najkraćih (genotip D) do 3248 bp kod najdužih genotipova (G). Kod genotipa G postoje 2 stop kodona u središnjoj („core“) regiji zbog čega

ovaj soj virusa nema mogućnost sekrecije HBeAg. Također G1896A precore (PC) mutacija koja onemogućuje ekspresiju HBeAg zbog stop kodona u „precore“ regiji najčešće se javlja kod genotipa D, dok je rijetka kod genotipova A, F i H. Nadalje, A1762T and G1764A/T „basal core promoter“ (BCP) mutacije povezane s napredovalom bolešću jetre češće su kod genotipa A i D. Nukleotidne varijacije i delecije u pre-S regiji također su vezane uz specifični genotip. Veća prevalencija uočena je kod genotipa C u usporedbi s genotipom B. Genotipovi A, B, C, D i F imaju veću genetičku raznolikost unutar skupine i dijele se na subgenotipove, dok genotipovi E, H, G i I nemaju dovoljnu heterogenost da bi bili podijeljeni u podskupine (Pourkarim i sur., 2014).

Epidemiološke studije pokazuju razlike u geografskoj distribuciji i putu prijenosa između različitih genotipova.

HBV genotip A većinom je pronađen u sjeverozapadnoj Europi i Sjevernoj Americi, a neki sojevi genotipa A pronađeni su na Filipinima, Hong Kongu i Jugoistočnoj Africi, što je posljedica bliskog kontakta sa Sjevernom Amerikom, posebno tijekom prošlog stoljeća.

Genotip B i C pripada domorodačkom stanovništvu Jugoistočne Azije. Genotip C je posebno čest kod populacije južnih pacifičkih otoka gdje je prevalencija HBV-a visoka.

Genotip D je najšire rasprostranjen i pronađen posvuda, s najvećom prevalencijom u pojasu koji se proteže od Južne Europe i Sjeverne Afrike do Indije, u zapadnoj i južnoj Africi te među korisnicima intravenskih droga u cijelom svijetu.

Genotip E nađen je u zapadnoj i južnoj Africi. Genetski je najsličniji genotipu D, a glavna je razlika što nema deleciju 33. nukleotida na početku pre-S1 regije, koja je zajednička svim sojevima genotipa D.

Najrazličitiji genotip F pronađen je u Južnoj i Središnjoj Americi. Vjeruje se da je to originalni genotip Novog Svijeta jer pokazuje najmanje homologije s dosad opisanim sojevima primata.

Genotip G pronađen je u Francuskoj i Sjedinjenim Američkim Državama, a genotip I u istočnoj Indiji. Najnoviji genotip J utvrđen je u Japanu, a sekvenciranje HBV DNA pokazalo je da se filogenetski nalazi između humanih sojeva i sojeva primata, što može pomoći u otkrivanju podrijetla HBV-a. Prevalencija različitih genotipova ovisi i o migracijama stanovništva, pa čak i obrascima ponašanja (HIV koinfekcija) pri čemu se neočekivano javlja genotip koji nije prevladavajući na tom području.

Općenito se HBV prenosi preko zaraženih tjelesnih tekućina, no put prijenosa ovisi i o genotipu virusa. Dokazano je da HBV genotip utječe i na progresiju bolesti te kreiranje

prikladne antivirusne terapije. Nema generalne suglasnosti o stupnju virulentnosti pojedinog genotipa, no smatra se da genotip C koji ima najveću prevalenciju u jugoistočnoj Aziji, uzrokuje teže posljedice nego drugi genotipovi (Kidd-Ljunggren i sur., 2002).

DIJAGNOSTIKA

Akutni virusni hepatitis obično je samoograničavajućeg tijeka bez rezidua jetrene lezije i virusne replikacije, a manifestira se na sljedećim razinama:

1. Kliničkom slikom sa tipičnom simptomatologijom
2. Biokemijskim nalazima: naglim porastom bilirubina i aminotransferaza
3. Serološkim markerima: virusnim antigenima i protutijelima
4. Patohistološkim promjenama u jetri

Danas se dijagnostika kroničnog virusnog hepatitisa B sastoji od klasične serološke dijagnostike kojom se dokazuju antigeni virusa (HBsAg, HBeAg, HBcAg) i protutijela domaćina (antiHBs, antiHBe, antiHBc) nastala na antigenski podražaj, te dijagnostike virusnog genoma (HBV DNA) u serumu metodama molekularne biologije. Patohistološki nalaz jetre izuzetno je važna dijagnostička metoda jer upućuje na stupanj funkcionalnog oštećenja jetre, a time određuje terapijski pristup (Včev i Begić, 2008).

Serološki biljezi koji se mogu utvrditi adekvatnim testovima (RIA, ELISA, PCR), mogu pomoći ne samo u utvrđivanju etiološke dijagnoze HBV infekcije već u velikoj mjeri ukazati na stadije akutne infekcije, stupanj infektivnosti te progresiju prema ozdravljenju ili kronicitetu. Osim dokazivanja biljega bitna je i dinamika njihovog pojavljivanja i nestajanja. Temelj dijagnoze akutnog virusnog hepatitisa su povišeni jetreni enzimi alanin-aminotransferaze i aspartat-aminotransferaze (20 do 100 puta), obično s koncentracijama ALT>AST. Enzimi aminotransferaze su dobar pokazatelj aktivnosti bolesti, a bilirubin i protrombinsko vrijeme se određuju za procjenu težine bolesti.

HBsAg se kao prvi biljeg HBV-infekcije pojavljuje u serumu 1-12 tjedana nakon ekspozicije, odnosno 2-8 tjedana prije pojave prvih kliničkih znakova bolesti i najrelevantniji je biljeg za dijagnozu HBV-infekcije. U vrijeme pojave HBsAg 75-100% hepatocita inficirano je virusom. Titar virusa u akutnoj infekciji je vrlo visok, često 10^9-10^{10} viriona po mililitru.

HBsAg nestaje u 90-95% odraslih osoba koje su oboljele od akutnog hepatitisa B u nekoliko tjedana do 6 mjeseci od početka bolesti, dok u ostalih ostaje trajno, što označava perzistentnu infekciju. U 5-8% kroničnih nositelja HBsAg dolazi do spontane eliminacije HBsAg, nakon čega se uz ranije prisutan anti-HBc pojavi i anti-HBs. U oko 10% osoba s akutnim hepatitisom B HBsAg se ne pojavljuje na početku bolesti, pa je za postavljanje dijagnoze važan pozitivni antiHBc-IgM, rastući titar antiHBc ili kasnija pojava antiHBs. U kronično inficiranih osoba nađene su fluktuacije titra HBsAg te se u pojedinim fazama infekcije najosjetljivijim testovima (RIA) ne može u serumu dokazati biljeg infekcije iako infekcija perzistira.

HBcAg je vezan uz jezgru HBV-a. Ovaj antigen se ne može direktno dokazati u serumu zato jer je obavijen HBsAg. Svaki neobloženi HBcAg reagirati će sa svojim specifičnim protutijelom (antiHBc) čime se blokira njegova detekcija. Premda se određenim postupcima ovakav HBcAg iz seruma može izdvojiti u čistoj formi i dokazati, to za praktične dijagnostičke svrhe nema potrebe.

IgM antiHBc pojavljuje se brzo nakon infekcije i nestaje za 6-24 mjeseca, no može se ponovno pojaviti u egzacerbaciji kroničnog hepatitisa. U pravilu, pozitivan IgM antiHBc uz patološke jetrene testove upućuje na akutnu HBV-infekciju, dok negativan IgM antiHBc znači da akutni hepatitis nije uzrokovan HBV-om.

IgG antiHBc također se može naći rano, prije pojave simptoma bolesti, i može perzistirati duže od 10 godina nakon izlječenja te je najvažniji biljeg prethodne infekcije. Pozitivan je u fazi "prozora" kada je HBsAg postao negativan, a antiHBs se još nije pojavio.

Pojava **antiHBs** u akutnoj infekciji označava ozdravljenje, a pojavljuje se neposredno nakon nestanka HBsAg. U rijetkim slučajevima se, u akutnoj infekciji i u kroničnoj bolesti, mogu dokazati istodobno HBsAg i antiHBs. U cijepljenih se osoba antiHBs nalazi kao jedini marker HBV-a. Titar antiHBs je nakon prirodne infekcije u pravilu viši nego u cijepljenih osoba.

HBeAg se javlja istodobno ili brzo nakon HBsAg. Važan je biljeg replikacije virusa i infektivnosti, a ima i prognostičko značenje. U akutnoj infekciji obično nestaje za 1-2 mjeseca. Perzistencija HBeAg duže od 10 tjedana upućuje na kronicitet, a uz perzistentan HBsAg i pozitivnu HBV DNA znači kroničnu bolest jetre.

AntiHBe ima obično niži titar od antiHBc i antiHBs. Dijagnostičko značenje antiHBe razjašnjeno je otkrićem mutacije DNA HBV na poziciji 1896 u pre-core regiji, što rezultira nemogućnošću sinteze HBeAg. Osobe inficirane ovom mutacijom HBV-a često imaju višu HBV-viremiju i teži klinički oblik bolesti. HBV-viremija karakterizira replikativnu fazu bolesti.

Cirkulirajuća **HBV DNA** dokazuje se metodama amplifikacije karakterističnih slijedova DNA. PCR-metoda dopušta identifikaciju i vrlo niske razine HBV DNA u serumu, leukocitima periferne krvi i u drugim stanicama. U akutnoj infekciji je određivanje HBV DNA rezervirano samo za situacije kada ostali biljezi HBV infekcije ne mogu riješiti dijagnostički problem. Kod kronične infekcije pozitivna HBV DNA dokaz je replikativne faze bolesti u HBeAg-pozitivnim i HBeAg-negativnim bolesnicima, a posebno je važno praćenje viremije kod procjene odgovora na antivirusnu terapiju (Lesnikar, 2005, Ganem i Prince 2004).

PREVENCIJA

Širenje hepatitisa B može se prevenirati provjerom donirane krvi, plazme, organa, sjemena, inaktivacijom virusa u produktima dobivenim iz plazme, savjetovalištima za smanjenje rizika te uvođenjem prakse kontrole infekcije. Međutim, najučinkovitija metoda prevencije je rutinska imunizacija novorođenčadi. Sigurno i učinkovito cjepivo protiv hepatitisa B dostupno je od 1982. godine. Primjena cjepiva protiv HBV-a ima tri cilja: prevenciju klinički manifestne bolesti, prevenciju razvoja kroničnog hepatitisa i prevenciju transmisije virusa.

U Republici Hrvatskoj se od 1999. godine, prema Programu obveznih cijepljenja, protiv hepatitisa B cijepe djeca u 6. razredu osnovne škole, a od početka 2007. godine i sva novorođenčad. Cijepljenje se provodi u tri doze. Prvom dozom cjepiva novorođenče se cijepi nakon poroda, najbolje već tijekom prva 24 sata života, što se može primijeniti istodobno s BCG cjepivom. Druga doza slijedi u drugome mjesecu života uz HiB cjepivo, a treća je predviđena s navršenih šest mjeseci (Včev i Begić, 2008). U ožujku 2015. godine donesena je odluka da se odmah nakon poroda cijepe samo djeca HBsAg pozitivnih majki, uz primjenu HBIg prema postekspozicijskoj shemi, a ostala djeca se cijepe s navršena 2 mjeseca života, zatim 4 i 6 mjeseci. Pri tome se koristi kombinirano cjepivo protiv difterije, tetanusa, hripavca, hemofilusa tipa b, dječje paralize i hepatitisa B (http://www.hzjz.hr).

U početku je cjepivo dobivano iz pročišćene plazme kao HBsAg, no danas se primjenjuje rekombinantna DNA tehnologija. Rekombinantnom tehnologijom i korištenjem kloniranih HBV S gena koje eksprimira Saccharomyces cerevisiae dobivene su dvije formulacije cjepiva protiv HBV. Za populaciju odraslih primjenjuje se 3x1.0 ml Engerix B ili Recombivax cjepiva u deltoidni mišić intramuskularno prema shemi 0,1,6 mjeseci. U preko 90% cijepljenih je serokonverzija uspješna, što znači da je postignuti titar protutijela na HBsAg >10 mIU/ml. Neki čimbenici domaćina kao što su pušenje, debljina ili starija dob mogu

utjecati na slabljenje imunog odgovora. U slabih se reaktora može s dodatne 2-3 doze cjepiva u 50% slučajeva dobiti zadovoljavajuća serokonverzija. U tih je osoba preporučljivo rabiti višu dozu cjepiva, isto kao i kod bolesnika na hemodijalizi i imunodeficijentnih osoba.

Hepatitis B cjepivo se koristi i kao postekspozicijska profilaksa u novorođenčadi HBsAg pozitivnih majki. Ako se primjeni hepatitis B cjepivo u tri doze s imunoglobulinima (HBIg) u novorođenčadi majki koje su HBsAg i HBeAg pozitivne, sprečava se akutna ili kronična infekcija hepatitis B virusom u 89-98% slučajeva. Osobama koje su došle u slučajni kontakt s HBsAg-pozitivnim biološkim materijalom daje se cjepivo po shemi 0, 1, 6 (unutar 24 sata do 7 dana nakon ekspozicije). Cijepe se samo HBsAg, antiHBc i antiHBs-negativne osobe. Može se primijeniti i HBIg u dozi od 0,07 ml/kg za odrasle, no efikasnost nije sa sigurnošću dokazana u prevenciji seksualnog prijenosa HBV-a (Včev i Begić, 2008).

U zemljama niske i srednje prevalencije cijepe se samo ciljane skupine s povećanim rizikom: medicinski djelatnici i ostali koji su u kontaktu sa zaraženim osobama, djeca kronično inficiranih žena, intravenski narkomani, homoseksualci i heteroseksualci s više partnera (http://www.who.int).

LIJEČENJE

Za akutni hepatitis B obično nije indicirana antivirusna terapija zbog niskog rizika od razvoja kronične bolesti, osim eventualno u bolesnika starijih od 60 godina i imunokompromitiranih bolesnika. Liječenje fulminantnog hepatitisa temelji se na istim principima kao i liječenje akutne insuficijencije jetre druge etiologije: sprečavanje hipoglikemije, ograničenje unosa bjelančevina, "sterilizacija" crijeva, hemodijaliza kod kreatinina >400 μmol/L, primjena hipertoničnih otopina, antagonista benzodiazepina, kardiotonika, antiaritmika, antisekretornih lijekova i hiperventilacija (sprečavanje edema mozga). Sve navedeno ne mijenja bitno prognozu bolesti, stoga se obavlja transplantacija jetre (Bradarić i Vucelić, 2006).
Cilj liječenja kroničnog hepatitisa B je supresija replikacije HBV-a te indukcija remisije jetrenih bolesti prije nego se razvije ciroza ili hepatocelularni karcinom.

Danas postoje dvije vrste lijekova koji se koriste u terapiji kronične hepatitis B virusne infekcije:

- Pegilirani interferon alfa-2a kao monoterapija je jedina vremenski ograničena terapija koja traje 48 tjedana, odnosno godinu dana

- Nukleoz(t)idni analozi – lamivudin, adefovir, entekavir, tenofovir, telbivudin – lijekovi koji dužom primjenom dovode do rezistencije i podrazumijevaju doživotnu terapiju

Iako svi nukleoz(t)idni analozi djeluju na HBV polimerazu, njihov mehanizam djelovanja je različit. Adefovir inhibira „priming" reverzne transkripcije; lamivudin, tenofovir i telbivudin inhibiraju sintezu virusnog (-) lanca DNA; entekavir inhibira tri glavne faze HBV replikacije. Osim mehanizma djelovanja razlikuju se i u farmakokinetici, kapacitetu inhibicije i razvoju rezistencije. Prednosti NA u odnosu na terapiju interferonom su smanjen broj nuspojava i oralna primjena jedne doze lijeka dnevno. Iako je sigurnosni profil i podnošljivost NA općenito dobra, pri dugotrajnoj upotrebi do izražaja dolazi mitohondrijska toksičnost. Kliničke manifestacije mogu biti hematološki poremećaji, periferna neuropatija, miopatije i laktična acidoza. S obzirom da se svi NA izlučuju putem bubrega potrebno je prilagođavati njihovu dozu prema klirensu kreatinina.

Glavne prednosti interferona pred NA su odsutnost rezistencije i veća stopa snižavanja HBeAg i HBsAg. Međutim, nedostaci su nizak odgovor na terapiju (manje od 50%), visoki troškovi, injekcijska primjena te česte nuspojave, zbog čega je isključena primjena kod velikog broja ljudi, pogotovo u okolnostima limitiranih sredstava (www.who.int). Tijekom liječenja interferonom redovite su nuspojave kao što je sindrom sličan gripi, umor, agresivnost, ispadanje kose, depresija, sklonost bakterijskim infekcijama, dok ozbiljnije nuspojave uključuju dekompenzaciju aktualne bolesti jetre, disfunkciju štitnjače, pernicioznu anemiju, sistemski lupus eritematodes, kardijalne, plućne, metaboličke, neurološke i psihijatrijske bolesti (Lesnikar, 2005). Kontraindikacije za primjenu interferona su dekompenzirana ciroza i povećana slezena, bolest štitnjače, autoimune bolesti, teške bolesti koronarnih arterija, transplantacija bubrega, trudnoća, psihičke bolesti, upotreba određenih lijekova, retinopatija, trombocitopenija i leukopenija. Također, interferoni se ne mogu koristiti kod djece mlađe od godinu dana i kod trudnica (www.who.int).
Prema kriterijima EASL-a (European Association for the Study of the Liver) terapija kroničnog hepatitisa B evaluira se na osnovi 3 kriterija: razine serumskih aminotransferaza, serumske razine HBV DNA i stupnju odnosno stadiju histoloških promjena (Morović i Hrstić, 2013).

Terapija je preporučljiva:

a) u bolesnika s trajno povišenim ALT-om (>2x od normalne razine) i dokazanom viremijom

b) u bolesnika s blagim povišenjem ALT-a i cirozom jetre

c) u bolesnika s HDV-superinfekcijom, koinfekcijom HCV-om i HIV-om, s teškim ekstrahepatalnim manifestacijama bolesti te u bolesnika na imunosupresivnoj terapiji kod kojih postoji ozbiljan rizik od reaktivacije B-hepatitisa

Terapija nije indicirana:

a) u bolesnika s niskom viremijom (<105 kopija/ml) i normalnim ALT-om

b) u bolesnika s blagim povišenjem ALT-a bez ciroze (uz trajno praćenje ALT-a)

c) u akutnom hepatitisu B u imunokompetentnih osoba

d) u trudnica (Vucelić i sur., 2005)

HB ANTIVIRUSNI LIJEKOVI

Pegilirani interferon alfa-2a

Interferon alfa je prirodni citokin s imunomodulatornim antivirusnim djelovanjem. U liječenju se primjenjuje pegilirani oblik, što znači da ima vezanu molekulu polietilen glikola, kako bi imao duže djelovanje. Proizvodi se rekombinantnom tehnologijom, a primjenjuje se supkutano jednom tjedno.

Bolesnike za interferonsku terapiju treba odabrati prema vjerojatnosti terapijskog odgovora. U HBeAg pozitivnih bolesnika značajno veća vjerojatnost terapijskog odgovora (u oko trećine bolesnika) može se očekivati ako je razina ALT-a visoka, razina HBV DNA niska i kod genotipova A i B. U HBeAg negativnih bolesnika terapijski odgovor je češći u slučaju niske razine HBV DNA, visoke razine ALT-a, u žena i kod genotipova B i C (bolesnici s genotipom D imaju slabi terapijski odgovor). U praćenju terapijskog odgovora na pegilirani interferon od prognostičke je koristi određivanje razine HBsAg titra (nakon 12 i 24 tjedana terapije), koji je u korelaciji s razinama HBV DNA i HBeAg odnosno kovalentno vezanom cirkularnom DNA (cccDNA). Prednost terapije pegiliranim interferonom alfa-2a je svakako u ograničenom vremenu terapije (48 tjedana), odsustvu rezistencije i mogućnosti klirensa HBeAg, ali i HBsAg u određenih bolesnika i spada u terapiju prvog izbora u liječenju kroničnog hepatitisa B.

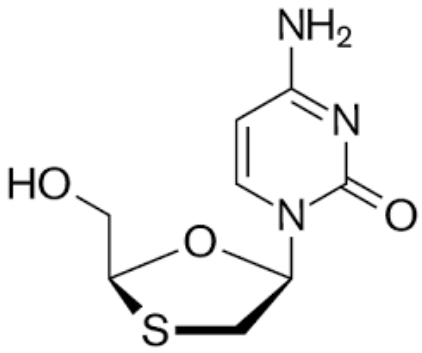
Njegova nedovoljna uporaba pripisuje se nuspojavama koje može izazvati i prepreka su za mnoge bolesnike, pa se terapija češće provodi peroralnim analozima nukleotida i nukleozida.

Od 1992. godine kada je FDA odobrila interferon alfa-2b, koji je tada bio prvi antivirusni lijek, do danas ih je odobreno još šest: pegilirani interferon alfa-2a, lamivudin, adefovir-dipivoksil, entekavir, telbivudin i tenofovir. Neinterferonski lijekovi se primjenjuju peroralno, a doza za odrasle je 1 tableta dnevno.

Lamivudin

Lamivudin (3TC) je analog citozina koji se ugrađuje na njegovo mjesto i dovodi do terminacije sinteze DNA lanca i tako zaustavlja replikaciju HBV. Intracelularno se fosforilira u aktivni 5'-trifosfatni metabolit, lamivudin-trifosfat, koji se ugrađuje u virusnu DNA pomoću HBV polimeraze. Zbog nedostatka 3'-OH skupine ugrađenog nukleozidnog analoga, ne dolazi do stvaranja 5'-3' fosfodiesterske veze koja je potrebna za produljenje DNA lanca, a time se prekida sinteza virusne DNA, odnosno replikacija virusa. Dnevna doza za odrasle je 100 mg, u obliku tablete ili oralne otopine.

Učinkovit je u bolesnika s fibrozom i uznapredovalom cirozom. Pokazano je da se učestalost fibroze i nastanak hepatocelularnog karcinoma može značajno smanjiti. Liječenje lamivudinom je dugotrajno i potrebno je nekoliko godina da se postigne HBe serokonverzija, a liječenje se prekida tek kada HBV DNA u krvi bude nedetektabilna. Terapija lamivudinom nije više terapija izbora zbog visokog potencijala rezistencije, do 70% nakon 5-godišnje terapije, iako se HBeAg serokonverzija javlja čak u oko 50% bolesnika nakon 5 godina. U slučaju nastanka rezistencije alternativna terapija izbora je tenofovir.



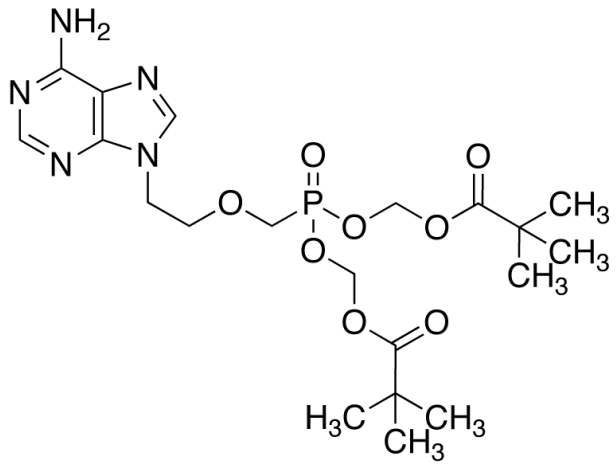
Slika 5. Struktura lamivudina

Adefovir dipivoksil

Adefovir dipivoksil je prolijek adefovira. Adefovir je aciklički nukleotidni analog adenozin monofosfata, koji se uz stanične kinaze fosforilira u aktivni metabolit adefovir-difosfat.

Adefovir-difosfat inhibira HBV DNA polimerazu, tako što se ugrađuje u virusnu DNA i dovodi do terminacije sinteze DNA lanca. Dnevna doza za odrasle je 10 mg.

Prvi od nukleotidnih analoga odobren za terapiju kroničnog hepatitisa B danas je stavljen u drugi terapijski red, jer poput lamivudina uzrokuje visoku učestalost rezistencije (do 30% nakon 5 godina terapije). U slučaju nastanka rezistencije alternativna terapija izbora je entekavir ili tenofovir ako bolesnik nije ranije primao nukleoz(t)idne analoge.

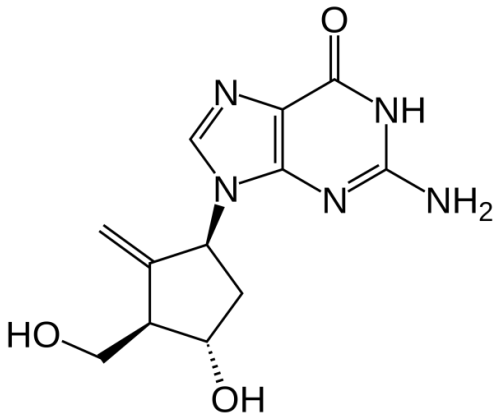


Slika 6. Struktura adefovir dipivoksila

Entekavir

Entekavir je analog gvanina sa selektivnim djelovanjem protiv HBV-a. U stanici se fosforilira do aktivnog trifosfatnog oblika te ugrađuje u DNA, inhibirajući tako sve tri aktivnosti HBV polimeraze: pripremanje HBV polimeraze (eng. priming), reverznu transkripciju negativnog lanca iz pregenomske mRNA i sintezu pozitivnog lanca HBV DNA. Dnevna doza za odrasle je 0.5 mg, ili 1 mg u slučaju prijašnje rezistencije na lamivudin ili telbivudin. U obliku tablete ili oralne otopine uzima se na prazan želudac jer hrana bitno smanjuje apsorpciju lijeka.

Ranije je opisana učinkovitost i prednost nukleozidnog analoga entekavira u odnosu na lamivudin, a pokazalo se i da je znatno učinkovitiji od adefovira u postizanju brze virusne supresije i klirensu HBV-a nakon 48 tjedana terapije. Entekavir posjeduje visoku genetsku barijeru i vrlo rijetko nastaje rezistencija - nakon 6 godina terapije u 1,2% bolesnika. U slučaju nastanka rezistencije alternativna terapija izbora je tenofovir. Entekavir spada u terapiju prvog izbora u liječenju kroničnog hepatitisa B.

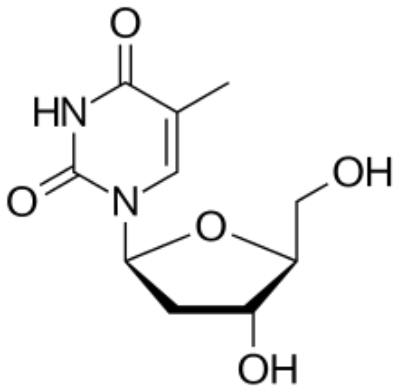


Slika 7. Struktura entekavira

Telbivudin

Telbivudin je analog timidina sa specifičnim djelovanjem protiv hepatitis B virusa. U stanici se fosforilira u aktivni metabolit, telbivudin-5'-trifosfat, koji se ugrađuje umjesto prirodnog supstrata, timidin-5'-trifosfata i dovodi do terminacije sinteze DNA te prekida replikacije virusa. Primjenjuje se u obliku tableta ili oralne otopine u dozi od 600 mg dnevno.

Telbivudin je posljednji iz serije nukleozidnih analoga odobren za terapiju kroničnog hepatitisa B, a pokazao je značajnu supresiju HBV DNA nakon 2 godine terapije i u HBeAg pozitivnih (60%) i HBeAg negativnih bolesnika (88%). U tom smislu telbivudin se pokazao učinkovitijim i od lamivudina i adefovira. Međutim, učestalost rezistencije nakon 2 godine terapije je oko 22% u HBeAg pozitivnih i oko 9% u HBeAg negativnih bolesnika. U slučaju nastanka rezistencije alternativna terapija izbora je tenofovir.

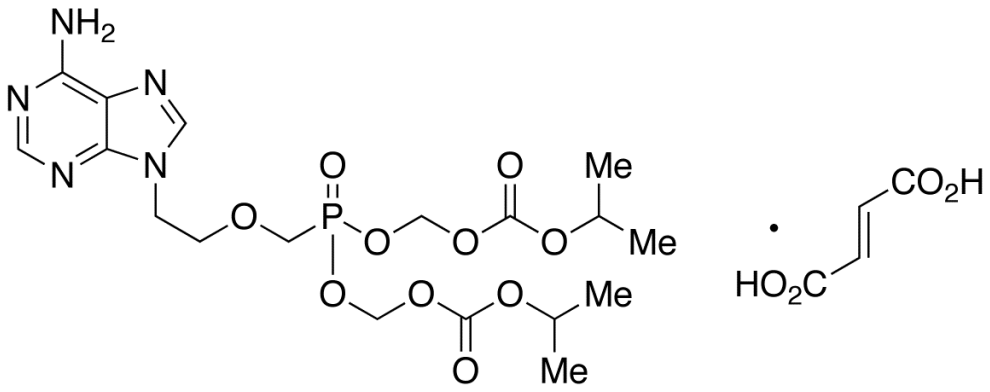


Slika 8. Struktura telbivudina

Tenofovir disoproksil fumarat

Tenofovir disoproksil fumarat je prolijek tenofovira. Tenofovir je analog adenozina, koji zahtjeva inicijalnu diestersku hidrolizu prolijeka, a zatim uzastopnu fosforilaciju do aktivnog metabolita, tenofovir-difosfata. Kao i drugi NA ugrađuje se u virusnu DNA umjesto prirodnog supstrata, a zbog nedostatka 3'-OH skupine uzorokuje terminaciju sinteze DNA i zaustavlja replikaciju virusa. Za liječenje kroničnog hepatitisa B dnevna doza za odrasle je 600 mg, u obliku tablete ili praška za oralnu primjenu. Biodostupnost se povećava ako se lijek uzima uz obrok bogat mastima.

Tenofovir je nukleotidni analog koji je pokazao najbolju trajnost antivirusnog odgovora sa supresijom HBV DNA u gotovo 100% i HBeAg pozitivnih i HBeAg negativnih bolesnika nakon 4 godina terapije. Do danas nije dokazana rezistencija na tenofovir. Tenofovir disoproksil fumarat spada u terapiju prvog izbora u liječenju kroničnog hepatitisa B (Morović i Hrstić, 2013, www.drugbank.ca).



Slika 9. Struktura tenofovir disoproksil fumarata

Liječenje posebnih populacija:

a) Trudnice

Cilj terapije kroničnog hepatitisa B u trudnoći je održavanje jetrene funkcije i sprječavanje prijenosa HBV infekcije na dijete. U pravilu se antivirusna terapija preporuča u slučaju visoke razine HBV DNA (> 6-7^{10} kopija/ml) u odsustvu ciroze, osobito u zadnjem trimestru trudnoće, a u slučaju ciroze odmah, s nastavljanjem iste terapije i redovitih kontrola i nakon poroda. U slučaju neplanirane trudnoće tijekom terapije kroničnog hepatitisa B terapija se može prekinuti i pratiti razine HBV DNA i ALT ili se može prijeći na lijekove dozvoljene u trudnoći. S obzirom da nema dovoljno pokazatelja o prijenosu nukleoz(t)idnih analoga

mlijekom, dojenje ostaje upitno. Lijekovi dozvoljeni u trudnoći koji pripadaju kategoriji B su lamivudin, telbivudin i tenofovir. Cijepljenje protiv hepatitis B u trudnoći je potpuno sigurno (Han i sur., 2012).

b) Djeca

Općenito je prihvaćeno da se liječe samo djeca s aktivnom, progresivnom ili težom bolesti, s cirozom, u slučaju koinfekcije s HDV ili u slučaju imunokompromitiranosti. Ostalu djecu s kroničnom HBV infekcijom se redovito kontrolira. Kod djece mlađe od 18 godina odobreni su lamivudin (kod starijih od 1 godine) i entekavir (kod starijih od 16 godina), adefovir dipivoksil i tenofovir disoproksil fumarat (kod starijih od 12 godina) te interferon alfa-2b (kod starijih od 1 godine) (Jonas i sur., 2010).

c) Koinfekcija

HCV koinfekcija javlja se u 7-15% bolesnika s kroničnim hepatitisom B, a praćena je obično težim tijekom bolesti i većom učestalosti ciroze i hepatocelularnog karcinoma u odnosu na monoinfekcije. U slučaju dominantne HCV infekcije prva linija terapije je pegilirani interferon i ribavirin, ali uz redovito praćenje HBV replikacije za vrijeme i nakon završetka terapije jer može doći do HBV reaktivacije nakon eradikacije HCV. Istodobno se mogu primjenjivati nukleoz(t)idni analozi što je u slučaju bolesnika s cirozom pokazalo dobre rezultate. U slučaju koinfekcije s HDV-om terapija izbora je pegilirani interferon tijekom 48 do 72 tjedana, a u slučaju visoke koncentracije HBV DNA u terapiju se može uključiti potentni nukleotidni analog kao što je tenofovir. Koinfekcija s HIV-om je, kao i s HCV-om, najčešća kod intravenskih ovisnika, a nerijetko se javlja i trojna infekcija. Smatra se da je oko 25% HIV bolesnika koinficirano s HCV-om i 5-10% s HBV-om. U slučaju koinfekcije i s HDV dolazi do supresije replikacije HBV i HCV te brze progesije fibroze jetre. Terapijske indikacije u slučaju HIV/HBV koinfekcije su iste kao u HBV monoinfekciji. Učinkovitost protiv oba virusa pokazali su lamivudin, tenofovir i emtricitabin - nukleozidni analog koji se koristi u obliku lijeka zajedno s tenofovirom. Kombinacija tenofovira i emtricitabina je ujedno i terapija izbora u HIV/HBV koinfekciji (Morović i Hrstić, 2013).

d) Bolesnici na imunosupresivnoj ili citostatskoj terapiji

Kod kroničnih nosioca virusa koji su ujedno na imunosupresivnoj ili citostatskoj terapiji u 20-50% slučajeva javit će se reaktivacija HBV infekcije. U povećanom riziku su hematološki

bolesnici (akutne i kronične leukemije, limfomi, multipli mijelom i drugi), reumatološki bolesnici, bolesnici s kroničnim crijevnim upalama (osobito ako su na biološkoj terapiji) i bolesnici s tumorima solidnih organa na kemoterapiji. Kod spomenutih bolesnika prije početka specifične terapije potrebno je kontrolirati HBV status. Ukoliko su svi biljezi negativni u bolesnika se može provesti protokol cijepljenja protiv B hepatitisa. Kod HBsAg pozitivnih bolesnika može se odmah započeti antivirusna profilaksa, bez obzira na razinu HBV DNA, a terapija se u pravilu započinje 1-2 tjedna prije i završava 6-12 mjeseci nakon završetka kemoterapije. U slučaju niske HBV viremije koristi se lamivudin, a u slučaju visoke razine HBV DNA treba koristiti učinkovitije lijekove s manjim rizikom nastanka rezistencije kao što su entekavir i tenofovir. Interferon kao imunomodulacijski agens nije indiciran u slučaju HBV reaktivacije i može uzrokovati teži hepatitis (Mandala i sur., 2013).

e) Bolesnici na hemodijalizi i bolesnici s transplantiranim organima

Za liječenje kroničnog hepatitisa B najčešće se koristi lamivudin s visokom razinom klirensa HBV, dok je terapija pegiliranim interferonom slabo podnošljiva. Kod bolesnika s transplantiranim bubregom terapija izbora su entekavir ili tenofovir. U slučaju presađivanja jetre, za sprječavanje infekcije transplantanata primjenjuje se hepatitis B imunoglobulin (HBIg) uz nukleoz(t)idne analoge, a doza HBIg, terapijski protokol i učinak ovise o pretransplantacijskoj razini HBV DNA i postojanju ili odsustvu rezistencije na nukleoz(t)idne analoge.

f) Bolesnici sa cirozom jetre

Terapija izbora u tih bolesnika su entekavir i tenofovir, visoko potentni nukleoz(t)idni analozi s najmanjim potencijalom za nastanak HBV rezistencije. Cilj terapije je postizanje što niže ili nemjerljive razine HBV DNA nakon 24 odnosno 48 tjedana terapije. Ukoliko nije postignuta nemjerljiva razina viremije nakon 48 tjedana dodaje se još jedan analog, bez križne rezistencije s prvim (Morović i Hrstić, 2013).

MUTACIJE

HBV je najvarijabilniji virus među DNA virusima, najviše zbog svog jedinstvenog životnog ciklusa koji uključuje aktivnost reverzne transkriptaze, enzima sklonog pogreškama i vrlo visoku proizvodnju viriona po danu (oko 10^{12}). S obzirom na visoku stopu pogreške reverzne transkripcije DNA polimeraze tijekom aktivnog stadija infekcije generira se velik broj

pogrešaka. Procjenjuje se da približna stopa pogreške tijekom replikacije HBV-a iznosi 1 na 10^7 baza. Pacijenti s kroničnim hepatitisom B često imaju 10^8-10^{11} HBV čestica/ml na dan pri čemu se stvara velik broj različitih varijanti HBV-a (Horvat, 2011).

Mutacije virusa mogu nastati spontano ili pod utjecajem cjepiva, antivirusnih lijekova, monoklonskih protutijela, hepatitis B-imunoglobulina (HBIg), a opisane su u akutnom hepatitisu, fulminantnom hepatitisu, kroničnom hepatitisu, u reinfekciji nakon transplantacije jetre i u imunokompromitiranih osoba. Genetička varijabilnost virusa utječe na brzinu progresije bolesti, pouzdanost dijagnostičkih metoda, uspjeh antivirusne terapije i imunizacije. Dokazano je da mutacije u specifičnim regijama HBV genoma mogu biti odgovorne za neželjene kliničke ishode ili neuspješnu detekciju dijagnostičkim metodama. Također, uspješna prevencija cijepljenjem postaje upitna otkrićem mutanata virusa koji imaju zamijenjen aminokiselinski slijed u površinskom antigenu HBsAg (Lazarević, 2014).

a) HBsAg mutacije

Površinski antigen (HBsAg) virusa hepatitisa B je glavni protein ovojnice koji sadrži 226 aminokiselina, a uključuje regije koje sudjeluju u vezanju virusa za hepatocite te glavni epitop koji prepoznaju neutralizirajuća protutijela. Centralni dio sadrži aminokiseline 99-169 i naziva se glavna hidrofilna regija (MHR). Struktura MHR sastoji se od dvije petlje. Postoje dva alternativna modela dvostruke petlje koji uključuju dva para cisteina tvoreći disulfidne mostove na kraju svake petlje. Model koji je generalno prihvaćen predviđa disulfidne mostove između C124 i C137 te između C139 i C147. MHR je izložena na površini te je uključena u vezanje na protutijela usmjerenih protiv HBsAg. Protutijela pronađena u cijepljenih osoba usmjerena su protiv ove regije, točnije klaster epitopa B-stanica nazvan „a“ determinanta. Determinanta „a“ locirana je na poziciji aminokiselina između 100 i 160. Mutacije koje induciraju konformacijske promjene unutar „a“ determinante rezultirat će proteinima sa značajnim promjenama u trodimenzionalnoj strukturi antigenog epitopa. Takve konformacijske promjene dovode do nastanka HBsAg koji se ne može detektirati dijagnostičkim metodama i/ili ne dovodi do stvaranja imuniteta cijepljenjem.

Prvi HBsAg mutanti primjećeni su kod djeteta zaraženog preko majke pri čemu je došlo do prijenosa HBV-a unatoč brzoj primjeni HBIg i cjepiva. Daljnja su istraživanja pokazala da je takav virus imao mutaciju na poziciji aminokiselina 145 gdje je umjesto glicina translatiran arginin. Posljedica ove zamjene bila je promijenjena konformacija proteina, odnosno antigeni epitop neprepoznat od strane protutijela antiHBs u HBIg-u. To je bio razlog razvoja infekcije i „bijega“ od HBV protutijela. Pacijent je ostao HBV DNA pozitivan još najmanje dvanaest

godina. Nakon toga otkrivene su druge mutacije unutar „a“ determinante u HBsAg-u, a procijenjeno je da je prevalencija HBsAg varijanti kod nasumičnih kroničnih nositelja između 6 i 12%. Opisani „escape“ mutanti uzrokuju infekcije kod cijepljenih osoba što utječe na uspjeh imunizacijskih programa (Horvat, 2011). Za sad pojava ovih mutanata još uvijek nema negativan utjecaj na imunizaciju, ali je razumljivo očekivati da će mutirani sojevi postati dominantni u određenim populacijama tijekom nekoliko desetljeća korištenja cjepiva. Matematičko modeliranje predviđa da je potrebno više od 50 godina da neki „escape“ mutant postane predominantan.

Mutacije u „a“ determinanti S gena mogu rezultirati i prethodno spomenutom okultnom HBV infekcijom (OBI). Klinički značaj OBI najviše je povezan s problemima transfuzijske medicine s obzirom da sojevi iz OBI pacijenata predstavljaju potencijalnu prijetnju za sigurnost zaliha krvi. Prevalencija OBI među donorima krvi u različitim europskim državama varira između 0.0002 i 0.084%, dok je u Kini, državi visoke prevalencije HBV-a, oko 0.18%. Nema dovoljno informacija o mutacijama povezanim s okultnom HBV infekcijom jer se istražuju samo limitirani dijelovi genoma, no prema istraživanju iz 2012. godine prevalencija mutacija specifičnih za OBI kretala se od 8.3 do 20.8% u pacijenata s OBI, a samo od 0 do 3.7% u pacijenata s aktivnim hepatitisom (Svicher i sur., 2012, Huang i sur., 2012).

Također promjene u „a“ determinanti mogu dati lažno negativne ili slabo reaktivne rezultate prilikom nekih dijagnostičkih postupaka. Varijacije između 121 i 124 rezultirat će smanjenom imunogenošću, dok će zamjena cisteina, posebno serinom, rezultirati smanjenjem ili gubitkom imunoreaktivnosti u laboratorijskim testovima. Istraživanjem je dokazano da C695T mutacija dovodi do stop kodona na aminokiselini 181 HBs gena u sojevima izoliranim iz uzoraka jetre. Stop kodon HBs gena mogao bi biti uzrok smanjenoj produkciji virusa što onemogućava detekciju HBsAg kod okultne infekcije. Autori preporučaju testiranje mononuklearnih stanica periferne krvi i uzoraka jetre za dijagnozu serum-negativne okultne infekcije kako bi se dokazala smanjena replikacija virusa. Delecije u Pre-S regiji također imaju značajnu ulogu u razvoju OBI jer utječu na ekspresiju, sintezu i sekreciju S proteina (Huang i sur., 2013, Cassini i sur.,2013).

Većina dijagnostičkih HBsAg testova koristi monoklonska protutijela usmjerena na imunodominantnu „a“ determinantu, a mutacijama se gubi sposobnost detekcije proteina monoklonskim protutijelima. Potencijalno rješenje ovog problema je korištenje dobro definiranih poliklonskih protutijela usmjerenih na HBsAg, no teško je održati konzistenciju takvih komercijalno dostupnih testova. Zbog toga bi se uz HBsAg test trebala napraviti provjera krvi na antiHBc, kako bi se osiguralo da donori krvi negativni na HBsAg nisu

inficirani „escape“ mutantima. Uz to se u nekim državama Europe i SAD-a molekularnim testovima provjerava HBV DNA. Donori pozitivni na HBV DNA i antiHBc, a negativni na HBsAg dalje se provjeravaju na potencijalnu infekciju „escape“ mutantima (Horvat, 2011).

b) Mutacije gena Pre-C/C

„Core“ i „precore“ proteini kodirani su Pre-C/C okvirom čitanja, s tim da „precore“ počinje s prvim, a „core“ s drugim inicijalnim mjestom. Zbog toga „precore“ protein inicijalno sadrži sve sekvence „core“ proteina uz dodatnih 29 aminokiselina na N-kraju. Prvih 19 od 29 aminokiselina služi kao signalni peptid za usmjeravanje proteina do endoplazmatskog retikuluma gdje dolazi do njegovog cijepanja. Za vrijeme transporta na staničnu površinu ovaj protein dalje sazrijeva i na kraju se izlučuje kao topljivi antigen HBeAg. Uloga tog antigena još uvijek nije razjašnjena, no moguće je da modulira imuni odgovor i olakšava nastajanje kronične infekcije (Kay i Zoulim, 2007). Otkako su serološki markeri postali presudni za dijagnozu HBV infekcije, mislilo se da je gubitak HBeAg marker završetka aktivne virusne replikacije i kraja hepatitisa. Unatoč tome, prvi puta je opisano u mediteranskom području da je gubitak HBeAg praćen aktivnom virusnom replikacijom i progresijom bolesti jetre. Danas je HBeAg negativan hepatitis svjetski poznat fenomen koji ne predstavlja posebnu bolest već se javlja zbog selekcije specifičnih bazalnih „core“ promotor (BCP) i „precore“ mutacija u HBV genomu. Mutacije BCP regije moduliraju sekreciju HBeAg na translacijskoj razini (Funk i sur., 2002). Tipična dvostruka mutacija često nađena u BCP, A1762T i G1764A, odgovorna je za smanjenu precore mRNA sintezu. Unatoč činjenici da HBeAg negativan hepatitis karakterizira niska razina HBV DNA, dokazano je da BCP mutacije povećavaju virusnu replikaciju u staničnim kulturama. Aktivnost replikacije također je povećana kad su prisutne neke od 3 dodatne BCP mutacije (T1753C, C1766T, T1768A). HBeAg-negativni hepatitis često je povezan s ozbiljnijim bolestima jetre koje mogu biti posljedica povećane virusne replikacije u hepatocitima.

Najčešća među precore mutacijama je zamjena G za A na položaju 1896 (G1896A) koja vodi do translacijskog stop kodona na aminokiselinskom položaju 28 u sekvenci HBeAg, što rezultira inhibicijom sinteze proteina. Ova mutacija je često udružena s „missense“ mutacijom kodona 29-G1899A. Prevalencija 1896 stop kodon mutacije značajno je povezana s HBV genotipovima koji imaju T nukleotid na položaju 1858 (genotipovi B, D, E i dijelom genotipovi C i F) što je objašnjeno na strukturnoj podlozi. Naime, ključna regija za pgRNA enkapsidaciju (epsilon) preklapa se s precore regijom i tvori sekundarnu strukturu nalik petlji. Zbog toga se mutacija zamjene G u A na položaju nukleotida 1896 može stabilno upariti s

nukleotidom 1858 u genotipu koji ima T, ali ne i s onim koji ima C na tom mjestu. To također objašnjava dominaciju ovih mutanata u mediteranskom području gdje je genotip D predominantan.

Primjećeno je da su bazalni core promotor i stop kodon mutanti često povezani. Istraživanjem je pokazano da su BCP mutacije detektibilne u kasnoj fazi HBeAg pozitivne infekcije, dok se precore mutacije javljaju tijekom antiHBe serokonverzije. Stoga se pretpostavlja da virus najprije reducira ekspresiju HBeAg putem BCP mutacija, a nakon toga se ekspresija HBeAg u potpunosti ukida zbog precore mutacija (Baumert i sur., 1996, Parekh i sur., 2003). Mnoge studije ukazuju na povezanost BCP i Pre-C mutacija s ozbiljnijim ishodima hepatitisa kao što je pojava fulminantnog akutnog hepatitisa ili razvoj HCC-a. Vjeruje se da HBV-om induciran HCC uključuje kompleksnu interakciju između virusnih faktora i višestrukih faktora domaćina. HBV mutacije asocirane s ovim ishodom mapirane su u različite regije genoma. Neke su studije pokazale da pacijenti zaraženi virusom s A1762T/G1764A dvostrukim mutacijama ili mutacijama u precore regiji imaju veće predispozicije za HCC od onih zaraženih divljim tipom virusa. Nedavne meta analize pokazale su da precore mutacija G1896A značajno povećava rizik od HCC-a i progresije hepatitisa, osobito kod Azijata. Također ova studija pokazala je povezanost druge učestale precore mutacije G1899A, česte mutacije u BCP A1762T/ G1764A, T1553V i C1653T, kao i pre-S1 i Pre-S2 delecija s povećanim rizikom od HCC. Općenito se fulminantni tijek HBV infekcije više pripisuje abnormalnom imunom odgovoru domaćina nego samim značajkama virusa. Unatoč tome, sve regije genoma široko se istražuju nebi li se pronašao utjecaj na ishod bolesti. Hou i suradnici dokazali su da je precore mutacija G1862T pet puta češća u pacijenata s fulminantnim hepatitisom nego u kroničnih nositelja. Inoue i suradnici izolirali su fulminantni HBV soj iz pet uzastopnih slučajeva fulminantnog hepatitisa, koji je sadržavao BCP dvostruku mutaciju A1762T/G1764A, precore stop mutacije G1896A i G1862T, locirane na izbočenom dijelu epsilona, signalnoj regiji za pakiranje (eng. packaging signal region). Može se zaključiti da sve pronađene mutacije zajednički pridonose retenciji i ova otkrića mogu imati važnu ulogu u razumijevanju mehanizama koji dovode do fulminantnog hepatitisa (Hou i sur., 2002, Inoue i sur., 2009).

c) Mutacije X gena

X protein je prilično nepoznat HBV protein, a potreban je za uspješnu infekciju i replikaciju *in vivo.* Poznato je da HBx pokazuje transkripcijsku transaktivacijsku funkciju za mnoge virusne i stanične gene zbog čega je nužan za efikasno prepisivanje virusne RNA s cccDNA u

inficiranim hepatocitima. S obzirom da se ne veže za DNA, njegova transaktivacijska funkcija manifestira se kroz interakciju sa staničnim faktorima. Pretpostavljeni su različiti mehanizmi kojima HBx ima ulogu u HBV-induciranoj karcinogenezi. Unatoč tome, uloga specifičnih mutacija X gena još uvijek nije do kraja objašnjena. Neki X gen mutanti, kao i delecije ove regije opisane su u pacijenata s hepatocelularnim karcinomom. Integracija genomske DNA HBV-a u stanične kromosome često se javlja za vrijeme virusnog životnog ciklusa i uočena je u većini slučajeva kroničnog hepatitisa te u 86.4% slučajeva HCC-a povezanog s HBV-om. Nakon integracije virusne DNA u genom domaćina, 3'-kraj X gena je često izbačen. Pokazalo se da ovaj nedostatak C-terminalne regije HBx proteina ima važnu ulogu u razvoju HCC-a tako što promovira oksidativni stres te inducira oštećenja mitohondrijske DNA (Lazarević, 2014).

d) Mutacije rezistencije na antivirusne lijekove

Glavni cilj liječenja kroničnog hepatitisa B je očistiti virus iz domaćina i spriječiti progresiju bolesti do ciroze ili HCC-a. Međutim, kronična HBV infekcija ne može se potpuno iskorijeniti zbog perzistencije cccDNA u jezgri inficiranih hepatocita. Uzroci održavanja virusa i rezistencije na antivirusne lijekove uključuju različite faktore virusa i domaćina, a najvažniji su dugo vrijeme poluživota inficiranih hepatocita (30-100 dana) i prirodna genetička varijabilnost virusa koja vodi do stvaranja mutacija i njihovog pohranjivanja u cccDNA. Dva tipa mutacija povezuju se s rezistencijom na nukleoz(t)idne analoge: primarne mutacije rezistencije koje su direktno odgovorne za rezistenciju na lijekove, i sekundarne (kompenzatorne) mutacije koje promoviraju ili povećavaju replikacijsku sposobnost rezistentnog soja. Proces zamjene divljeg tipa virusa u stanicama jetre dominantnim mutantom odvija se sporo. Kako rezistentni mutanti većinom inficiraju nezaražene stanice, efikasno širenje dominantnog mutanta ovisi o tome koliko je slobodnog jetrenog prostora dostupno za širenje i umnožavanje (Zoulim i Locarnini, 2009). To može djelomično objasniti razliku u pojavi rezistencije između različitih NA. Lamivudin ima najgori profil rezistencije zato što se ona počinje razvijati već tijekom prve godine terapije i povećava se tijekom vremena po godišnjoj stopi od 15-25%, dok za pet godina iznosi >80%. Stopa rezistencije za adefovir i telbivudin definira se kao srednja, za telbivudin iznosi 10-25% nakon 2 godine primjene, a za adefovir oko 30% nakon 5 godina, čak i više za pacijente koji su već rezistentni na ostale NA. Antivirusni lijekovi s trenutno najvećom barijerom za rezistentne mutante su entekavir, sa stopom rezistencije od 1,2% nakon 5 godina i tenofovir koji još uvijek nema prijavljene rezistencije nakon 4 godine. Ukoliko pacijent ima razvijenu rezistenciju na

lamivudin, šansa za pojavu entekavir rezistenog soja je oko 51% nakon pet godina terapije entekavirom. Također kod pacijenata rezistentnih na lamivudin koji imaju koinfekciju HIV-om zabilježena je pojava mutanata rezistentih na telbivudin. Moderne tehnike kao što je pirosekvenciranje otkrivaju da se mutacije rezistencije niske prevalencije mogu otkriti kod pacijenata mnogo ranije nego direktnim PCR sekvenciranjem i to godinama prije nego što postanu klinički značajne (Lazarević, 2014).

Istraživanjem molekularnih mehanizama otkriveno je da su rezistencije specifične za pojedini NA, ovisno o šećernom ostatku. Dosad je poznato pet različitih puteva rezistencije: 1. Put L-nukleozida 2. Put alkil-fosfonata 3. Zajednički put L-nukleozida i alkil-fosfonata 4. Put D-ciklopentana 5. Višestruka rezistencija na lijekove.

L-nukleozidi (lamivudin i telbivudin) imaju sličnu molekulsku strukturu i ciljno mjesto djelovanja, pa zbog toga i sličan obrazac razvoja rezistentnih mutanata. Put L-nukleozida otkriven je po dobro poznatoj supstituciji na poziciji 204 YMDD motiva (rtM204V/I), katalitičkog mjesta reverzne transkriptaze. Ova mutacija dovoljna je za razvoj rezistencije, no često je udružena s kompenzatornim mutacijama rtL80V/I, rtI169T, rtV173L, rtL180M, rt184S/G, rtS202I i rtQ215S. Uloga ovih mutacija je vratiti virusnu polimeraznu funkciju približno na razinu divljeg tipa. Kad se navedene mutacije javljaju zasebno pokazuju vrlo nisku razinu rezistencije *in vitro*. S obzirom na različite obrasce mutacija koji dovode do razvoja rezistencije i vrlo visoku stopu rezistencije, lamivudin nije više terapija prvog izbora za pacijente s kroničnim hepatitisom B.

Put alkil-fosofonata (adefovir i tenofovir) otkriven je pronalaskom mutacija izvan YMDD motiva, u B i D domeni reverzne transkriptaze. Dvije primarne mutacije rezistencije koje pripadaju ovom putu jesu rtA181T i rtN236T. Važnost mutacije rtI233V, također identificirane u adefovir rezistentnim vrstama, ostaje upitna s obzirom da neki autori potvrđuju, a neki osporavaju njenu ulogu u rezistenciji na adefovir. Prema zadnjem istraživanju u kojem je korišten trodimenzionalni model HBV polimeraze/RT primjećeno je da supstitucija izoleucina za valin na poziciji 233 nema utjecaja na katalitičko mjesto reverzne transkriptaze i vjerojatno samostalno ne utječe na antivirusni učinak adefovira (Schildgen i sur., 2006, Ismail i sur., 2013). Pojava mutacije rtA194T povezuje se s rezistencijom na tenofovir, iako je klinički značaj ove mutacije još uvijek nepoznat zato toga što mutanti ne pokazuju rezistenciju na tenofovir *in vitro*. Istraživanje Amini-Bavil-Olyaee i sur. pokazalo je da rtA194T mutacija djelomično uzrokuje rezistenciju na tenofovir, ali negativno utječe na replikacijsku sposobnost HBV-a. Slično tome, novo objavljenim istraživanjem Qin i sur. nisu uspjeli detektirati dovoljnu replikacijsku sposobnost virusa u prisutnosti rtA194T supstitucije,

kako bi se ocijenila osjetljivost na tenofovir *in vitro* te *in vivo*. Unatoč tome, ova studija otkrila je da sojevi s aminokiselinskim (aa) supstitucijama rtP177G i rtF249A pokazuju smanjenu sposobnost replikacije, no povećanu rezistenciju na tenofovir u *in vitro* te *in vivo* analizama. Točan mehanizam kojim ove aa supstitucije dovode do nastanka rezistencije još se mora utvrditi. Nasuprot tome, Kitrinos i sur. pokazali su da monoterapija tenofovirom može uspješno suprimirati virus na više od 6 godina tijekom kontinuirane terapije, bez selekcije ijedne mutacije koja bi se mogla povezati s rezistencijom.

Dokazano je da mutacije u B domeni reverzne transkriptaze, rtA181T/V, rezultiraju istovremenom rezistencijom na L-nukleozide i alkil fosfonate. Mutacija rtA181T također kodira za stop kodon u preklapajućim proteinima ovojnice na aminokiselinskom mjestu 172 u S regiji (sW172*) što rezultira skraćivanjem tih proteina. Warner i Locarnini istaknuli su kako rtA181T/sW172* sojevi imaju sekretorni defekt i vrše negativni utjecaj na sekreciju viriona divljeg tipa. To može biti uzrok propusta u dijagnozi rezistencije ukoliko se broj virusa koristi kao jedini kriterij za ocjenu uspjeha liječenja. Također je dokazano da akumulacija skraćenog HBsAg-a u inficiranim stanicama povećava šanse za razvoj hepatocelularnog karcinoma putem transaktivacije staničnih promotora (Lazarević, 2014).

Rezistencija na D-ciklopentansku grupu, npr. entekavir, manifestira se samo u slučaju prisutnosti najmanje tri mutacije: rtL180M + rtM204V i rtT184G/S ili rtS202I/G ili rtM250V. Stoga su mutacije koje povezujemo s rezistencijom na lamivudin nužne da bi došlo do virusnog proboja kod entekavira. U odsutnosti mutacija rezistencije na lamivudin, rezistencija na entekavir razvija se vrlo sporo. U skladu s time, očekivano je da će pacijenti na terapiji entekavirom koji su već rezistentni na lamivudin s vremenom razviti otpornost i na entekavir. Nedavnim istraživanjem Lee i sur. potvrdili su da pacijenti zaraženi mutantnim sojem M204V imaju značajno veću sklonost rezistencije na entekavir od onih zaraženih drugim mutantima rezistentnim na lamivudin, kao što su rtM204I ili rtA181T (Lee i sur., 2013).

Osim mutacije rtA181T/V koja je primjer jednostruke mutacije uključene u rezistenciju na više različitih NA, opisani su slučajevi višestruke otpornosti na lijekove koji uključuju više od jedne mutacije. Obično se ta pojava javlja nakon više monoterapija različitim NA pri čemu se nove mutacije rezistencije dodaju već postojećim. Analizom klonova dobivenih iz pacijenata s dvostrukom rezistencijom otkrivene su mutacije rezistencije na oba lijeka locirane u istom virusnom genomu, što je rezultiralo mutantima otpornim na oba lijeka. Kod nekih pacijenata pronađeni su i HBV sojevi s trostrukom otpornošću. Nedavno istraživanje u kojem je korišteno sekvenciranje klonova pokazalo je da se mutacija rtA181 ponovno javila kod većine pacijenata koji su razvili otpornost redom na lamivudin, adefovir i entekavir za vrijeme

dualne terapije lamivudinom i adefovirom. Mutacija rtA181T/V pojavila se nakon povratka entekavir rezistentnih mutanata u divlji tip za vrijeme terapije i pronađena je u različitim genomima mutanata rezistentnih na lamivudin ili entekavir (Kim i sur., 2013).

Zbog preklapanja gena polimeraze i gena ovojnice u HBV genomu terapija s NA može dovesti do pojave kompleksnih HBV vrsta koje istovremeno nose mutacije u reverznoj transkriptazi i proteinima ovojnice. Mutacije S gena povezane s antivirusnim lijekovima (ADASM) mogu dovesti do tri različite posljedice: mutacije zamjena aminokiselina u površinskim proteinima, besmislene („nonsense“) mutacije koje rezultiraju skraćenim površinskim proteinima i tihe („silente“) mutacije. Također postoje ADASM koje se ne mogu objasniti preklapanjem gena, ali su vjerojatno rezultat smanjenog ili obrnutog omjera HBsAg prema antiHBsAg tijekom dužeg perioda efikasne virusne supresije. Kako su HBsAg mutacije pronađene kod pacijenata osjetljivih na terapiju, mogući klinički značaj ADASM leži u promijenjenoj antigenosti, sposobnosti reprodukcije i onkogenom potencijalu (Yeh, 2010).

Dokazano je da trostruki HBV mutanti (rtV173L + rtL180M + rtM204V) uzrokuju dvije aminokiselinske promjene u preklapajućim površinskim genima (sE164D + I195M) koji imaju efekt usporediv s „vaccine escape“ mutantom sG145R. Na terapiji lamivudinom mnogi pacijenti nose mutante s „vaccine escape“ mutacijama S gena, P120T i G145R. One uzrokuju promjene u reverznoj transkriptazi, dok mutacije rtT128N i rtW1153Q djelomično vraćaju *in vitro* replikacijsku sposobnost lamivudin rezistentnih sojeva pri čemu služe kao kompenzatorne mutacije. Zadnjim istraživanjem Cento i sur. identificirali su deset dodatnih HBV mutacija reverzne transkriptaze, pored onih trenutno poznatih kao klasične mutacije rezistencije (rtN53T, rtS78T, rtS85F, rtS135T, rtA181I, rtA200V, rtK212Q, rtL229V/F, rtM309K) koje mogu doprinijeti razvoju otpornosti na lijekove *in vivo.* Neke od njih pokazale su direktan utjecaj na HBsAg protein inducirajući razvoj mutacija ili stop-kodona koji mogu potencijalno utjecati na HBV patogenost i onkogeni potencijal (Torresi i sur., 2002, Cento i sur., 2013).

e) HBV mutacije u HBV/HIV i HBV/HCV koinficiranih pacijenata

Infekcija hepatitisom B česta je kod osoba zaraženih HIV-om zbog zajedničkog puta prijenosa ovih virusa. Dosad ima relativno malo podataka o učestalosti klinički značajnih HBV mutacija u HBV/HIV koinficiranih pacijenata. Vjeruje se da je prevalencija veća nego u HBV monoinfekciji s obzirom da se pretpostavlja da HIV povećava HBV replikaciju. Također supresija imunološkog sustava zbog HIV infekcije utječe na molekularnu

varijabilnost HBV-a. Zanimljivo je da kod HBV/HIV koinficiranih pacijenata postoji manja raznolikost HBV vrsta i niža stopa razvoja u usporedbi s HBV monoinfekcijom. Pretpostavlja se da niska razina CD4 pomaže u održavanju divljeg tipa HBV.

Nedavno istraživanje iz Francuske prijavilo je stopu učestalosti i karakteristike širokog spektra mutacija P i S gena, koristeći podatke HBV/HIV koinficiranih pacijenata tijekom devetogodišnjeg praćenja. Povećana učestalost primjećena je kod svih vrsta mutacija, posebno kod P gena povezanog s L-nukleozidima. Tako su ADASM, mutacije koje predstavljaju potencijalni problem u javnom zdravstvu, pronađene u više od 10% ispitivane populacije do kraja praćenja. Među različitim ispitivanim faktorima domaćina i virusa, terapija lamivudinom pokazala se kao najveći faktor rizika za ADASM mutacije, s obzirom da su one direktno povezane s preklapajućim P mutacijama rezistencije na lamivudin. Ova veza bila je manje očita kad je analizirana korelacija izloženosti lamivudinu i S mutacija povezanih s imunitetom. Nasuprot tome, terapija tenofovirom veže se sa smanjenom pojavom S mutacija povezanih s imunitetom. Sva saznanja upućuju na potrebu za korištenjem potentnijih antivirotika i pobliže praćenje koinficiranih pacijenata (Lacombe i sur., 2013).

Problem okultne HBV infekcije kod pacijenata zaraženih HIV-om još uvijek nije dobro objašnjen. Prijavljena prevalencija OBI kod takvih pacijenata značajno varira, od 0-89%. Studijom provedenom u Brazilu utvrđeno je da imunološka supresija pacijenata s HIV infekcijom nije ključan faktor za razvoj OBI. S druge strane, talijanski istraživači dokazali su da je OBI u takvih pacijenata otkrivena značajno češće ukoliko su HBV DNA ispitivali u uzorcima koji nije serum (Jardim i sur., 2008, Cassini i sur., 2013).

Kronična HBV/HCV infekcija smatra se stanjem koje često dovodi do napredovanja fibroze jetre i razvoja ciroze, a također predstavlja jedan od najvažnijih rizičnih faktora za razvoj HCC-a. Studije upućuju na postojanje međusobnog utjecaja između dva virusa u slučaju dualne infekcije. Dokazano je da HCV „core“ protein može imati ulogu u regulaciji gena i negativno utjecati na ekspresiju HBsAg. Doista, neki autori su povrdili da HCV koinfekcija može igrati važnu ulogu u razvoju OBI, dok su drugi prijavili odsutnost OBI u pacijenata s HCV koinfekcijom. Inhibitorni učinak HCV na HBV može također ograničiti pojavu HBV mutacija zato što smanjena replikacija proizvodi manje mutantnih genoma. To je dosad potvrđeno za BCP/precore mutacije koje su rijeđe pronađene u HBV/HCV koinficiranih nego HBV monoinficiranih pacijenata (Lazarević, 2014).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju proučene literature mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Kronični hepatitis B predstavlja veliki zdravstveni problem današnjice, od čijih posljedica umire oko milijun ljudi godišnje.
- Antivirusna terapija ne liječi hepatitis B, već samo smanjuje replikaciju virusa i tako usporava progresiju ciroze te smanjuje rizik od karcinoma jetre.
- Genetička varijabilnost HBV-a utječe na brzinu progresije bolesti, pouzdanost dijagnostičkih metoda, uspjeh antivirusne terapije i imunizacije.
- Mutacije u površinskom antigenu HBsAg mogu dovesti do neuspješne imunizacije cijepljenjem („escape“ mutanti) te neuspješne detekcije dijagnostičkim metodama.
- Mnoge studije ukazuju na povezanost BCP i Pre-C mutacija HBV-a s ozbiljnijim ishodima hepatitisa kao što je pojava fulminantnog akutnog hepatitisa ili razvoj hepatocelularnog karcinoma.
- Mutacije u YMDD motivu virusne DNA polimeraze imaju važnu ulogu u razvoju rezistencije na nukleoz(t)idne analoge.
- Antivirusni lijekovi s trenutno najvećom barijerom za rezistentne mutante su entekavir i tenofovir.
- Praćenje mutacija HBV-a potrebno je radi utvrđivanja povezanosti sa posljedicama infekcije te u svrhu poboljšanja prevencije, dijagnoze i efikasne terapije.

6. LITERATURA

Alter M, Mast E. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am*, 1994, 23, 437–440.

Alter MJ. Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Semin Liver Dis*, 2003, 23, 39–46.

Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promotor mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatits result enhanced viral replication. *J Clin Invest*, 1996, 98, 2268-2276.

Bradarić N, Gošev M. Hepatitis B: Današnje mogućnosti liječenja. *Medix*, 1999, 5, 32-40.

Bradarić N, Vucelić B. Hepatitis B. *Medicus*, 2006, 15(1), 121-130.

Burek V. Dijagnostika virusnih hepatitisa. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 2008, 4(15)

Burek V. Laboratorijska dijagnostika virusnih hepatitisa B i C. *Acta Med Croatica*, 2005, 59, 405-12.

Cassini R, De Mitri MS, Gibellini D, Urbinati L, Bagaglio S, Morsica G, Domenicali M, Verucchi G, Bernardi M. A novel stop codon mutation within the hepatitis b surface gene is detected in the liver but not in the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected individuals with occult HBV infection. *J Viral Hepat*, 2013, 20, 42-49.

Cento V, Van Hemert F, Neumann-Fraune M, Mirabelli C, Di Maio VC, Salpini R, Bertoli A, Micheli V, Gubertini G, Romano S, Visca M, De Sanctis GM,Berkhout B, Marino N, Mazzotta F, Cappiello G, Spanò A, Sarrecchia C, Ceccherini-Silberstein F, Andreoni M, Angelico M, Verheyen J, Perno CF, Svicher V. Anti-HBV treatment induces novel reverse transcriptase mutations with reflective effect on HBV S antigen. *J Infect*, 2013, 67(4), 303-12.

Drug Bank, 2005, http://www.drugbank.ca, pristupljeno 18.9.2015.

D'Souza R, Foster GR. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B. *J R Soc Med*, 2004, 97(7), 318–321.

Elgouhari HM, Abu-Rajab Tamimi TI, Carey WD. Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course, and diagnosis. *CCJM*, 2008, 75(12), 881-889.

Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Virol Hepat*, 2002, 9, 52-61.

Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection - Natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004, 350, 1118-29.

Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection, 2015., http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-b-guidelines/en, pristupljeno 22.6.2015.

Han GR, Xu CL, Zhao W i sur. Management of chronic hepatitis B in pregnancy. *World J Gastroentero*, 2012, 18, 4517-21.

Hardie DR, Williamson C. Analysis of the preS1 gene of hepatitis B virus (HBV) to define epidemiologically linked and un-linked infections in South Africa. *Arch Virol*, 1997, 142, 1829–1841.

Hepatitis B, 2015, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/, pristupljeno 10.9.2015.

Horvat RT. Diagnostic and Clinical Relevance of HBV Mutations. *Lab Med*, 2011, 42, 488-496.

Hou J, Lin Y, Waters J, Wang Z, Min J, Liao H, Jiang J, Chen J, Luo K, Karayiannis P. Detection and significance of a G1862T variant od hepatitis B virus in Chinese patients with fulminant hepatitis. *J Gen Virol*, 2002, 83, 2291-2298.

Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci*, 2005, 2(1), 50-57.

Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, Yeh SH, Yu H, Xue Y, Chen YX, Liu PG, Ge SX, Zhang J, Xia NS. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol*, 2012, 57(4), 720-9.

Hunt R. Hepatitis viruses. Virology chapter eighteen, 2011, http://www.microbiologybook.org/virol/hepatitis-virus.htm, pristupljeno 13.6.2015.

Hyams KC. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin Infect Dis*,1995, 20, 992–1000.

Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Wakui Y, Kondo Y, Fukushima K, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced intracellular retention of a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis. *Virology*, 2009, 395, 202-209.

J Huang X, Qin Y, Li W, Shi Q, Xue Y, Li J, Liu C, Hollinger FB, Shen Q. Molecular analysis of the hepatitis B virus presurface and surface gene in patients from eastern China with occult hepatitis B. *Med Virol*, 2013, 85(6), 979-986.

Jardim RN, Gonçales NS, Pereira JS, Fais VC, Gonçales Junior FL. Occult hepatitis B virus infection in immunocompromised patients. *Braz J Infect Dis*, 2008, 12(4), 300-305.

Jindal A, Kumar M, Sarin SK. Management of acute hepatitis B and reactivation of hepatitis B. *Liver Int*, 2013, 33, 164-175.

Jonas MM, Block JM, Haber BA i sur. Treatment of children with chronic hepatitis B virus infection in the United States: patient selection and therapeutic options. *Hepatology*, 2010, 52, 2192-205.

Kalendar kontinuiranog cijepljenja u Hrvatskoj u 2015. godini, http://www.hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-epidemiologiju/odjel-za-prevenciju-zaraznih-bolesti-i-cijepljenje, 2015., pristupljeno 24.6.2015.

Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res*, 2007, 127, 164-176.

Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol*, 2002, 83(6), 1267-1280.

Kim SS, Cho SW, Kim SO, Hong SP, Cheong JY. Multidrug-resistant hepatitis B virus resulting from sequential monotherapy with lamivudine, adefovir, and entecavir: clonal evolution during lamivudine plus adefovir therapy. *J Med Virol*, 2013, 85(1), 55-64.

Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*, 2008, 80, 27–46.

Lacombe K, Boyd A, Lavocat F, Pichoud C, Gozlan J, Miailhes P, Lascoux-Combe C, Vernet G, Girard PM, Zoulim F. High incidence of treatment-induced and vaccine-escape hepatitis B virus mutants among human immunodeficiency virus/hepatitis B-infected patients. *Hepatology*, 2013, 58(3), 912-922.

Lazarević I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(24), 7653-7664.

Lee GH, Aung MO, Dan YY, Lee YM, Mak B, Low HC, Lim K, Thwin MA, Tan PS, Lim SG. Do different lamivudine-resistant hepatitis B genotypes carry the same risk of entecavir resistance? *Med Virol J*, 2013, 85(1), 26-33.

Lee WM. Hepatitis B Virus Infection. *New Engl J Med*, 1997, 337, 1733-1745.

Lesnikar V. Epidemiologija hepatitisa B i C u Hrvatskoj. *Acta Med Croatica*, 2005, 59, 377-83.

Mandala M, Fagiuoli S, Francisci D i sur. Hepatitis B in immunosuppressed cancer patients: Pathogenesis, incidence and prophylaxis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013, 87, 12-27.

Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Semin Liver Dis*, 1991, 11, 84–92.

Morović M, Hrstić I. Liječenje kroničnog hepatitisa B. *Acta Med Croatica*, 2013, 67, 319-323.

Parekh S, Zoulim F, Ahm SH, Tsai A, Li J, Kawai S, Khan N, Trepo C, Wands J, Tong S. Genome replication, virion secretion and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol*, 2003, 77, 6601-6612.

Pavić I. Hepatitis B: Koga liječiti. *Acta Med Croatica*, 2005, 59, 419-421.

Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyaee S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(23), 7152-7168.

Prirodni tijek i kliničke poslijedice infekcije hepatitis B virusom, 2008, http://www.hepatos.hr/o-hepatitisu/hepatitis-b/genotipovi-i-njihova-podjela.html, pristupljeno 3.6.2015.

Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, Helm M, Rockstroh JK, Willems WR, Will H, Gerlich WH. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med*, 2006, 354(17), 1807-1812.

Svicher V, Cento V, Bernassola M, Neumann-Fraune M, Van Hemert F, Chen M, Salpini R, Liu C, Longo R, Visca M, Romano S, Micheli V, Bertoli A, Gori C,Ceccherini-Silberstein F, Sarrecchia C, Andreoni M, Angelico M, Ursitti A, Spanò A, Zhang JM, Verheyen J, Cappiello G, Perno CF. Novel HBsAg markers tightly correlate with occult HBV infection and strongly affect HBsAg detection. *Antiviral Res*, 2012, 93(1), 86-93.

Torresi J, Earnest-Silveira L, Civitico G, Walters TE, Lewin SR, Fyfe J, Locarnini SA, Manns M, Trautwein C, Bock TC. Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the "fingers" subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene. *Virology*, 2002, 299(1), 88-99.

Včev A, Begić I. Infekcija hepatitis B virusom. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 2008, 4(15)

Vince A. Hepatitis B i C: Prirodni tijek bolesti. *Acta Med Croatica*, 2005, 59, 389-92.

Vucelić B, Hrstić I, Begovac J i sur. Virusni Hepatitis: hrvatska konsenzusna konferencija. *Acta Med Croatica*, 2005, 59, 359-75.

Xu ZY, Liu CB, Francis DP, Purcell RH, Gun ZL, Duan SC. i sur. Prevention of perinatal acquisition of hepatitis B virus carriage using vaccine: preliminary report of a random double-blind placebo-controlled and comparative trail. *Pediatrics*, 1985, 76, 713–718.

Yeh CT. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther*, 2010, 15(3), 471-475.

Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*, 2009, 137(5), 1593-1608.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Sažetak

Hepatitis B je upala jetre koja nastaje infekcijom virusom hepatitisa B (HBV). Najčešće se javlja kao akutni hepatits, no kod malog postotka inficiranih osoba prelazi u kronični oblik koji predstavlja visok rizik za razvoj ciroze jetre ili hepatocelularnog karcinoma. Procjenjuje se da je trenutan broj kronično zaraženih osoba u cijelom svijetu oko 240 milijuna, što ga čini značajnim faktorom morbiditeta i mortaliteta. Virus je vrlo infektivan, a prenosi se kontaktom sa zaraženim tjelesnim tekućinama. Replikacija virusa uključuje reverznu transkripciju uz virusnu DNA polimerazu koja nema ispravljačku sposobnost. To rezultira pojavom mutantnih virusa koji se mogu izdvojiti djelovanjem imunološkog sustava ili pod utjecajem antivirotika. Brojna su istraživanja pokazala da genetička varijabilnost virusa utječe na brzinu progresije bolesti, pouzdanost dijagnostičkih metoda, uspjeh antivirusne terapije i imunizacije. Mutacije u površinskom antigenu HBsAg mogu dovesti do neuspješne imunizacije cijepljenjem („escape“ mutanti) te neuspješne detekcije dijagnostičkim metodama. Nemogućnost detekcije predstavlja problem jer takve osobe mogu postati donori krvi i tako širiti zarazu. Također, mutacije u YMDD motivu virusne DNA polimeraze imaju važnu ulogu u razvoju rezistencije na nukleoz(t)idne analoge. Praćenje HBV mutacija važno je u svrhu bolje prevencije, dijagnoze te stvaranja efikasne antivirusne terapije.

Summary

Hepatitis B is a liver inflammation caused by hepatitis B virus (HBV) infection. Usually it occurs as acute hepatitis, but in some cases virus remains in patient, causing a chronic infection. Consequently, it can lead to development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Worldwide, there are an estimated 240 million chronically infected persons. Therefore, chronic HBV infection is a major public health issue. Hepatitis B virus is very infectious and it spreads through contact with infected body fluids. Virus replication includes reverse transcription using a viral DNA polymerase lacking proof-reading ability. This results in the emergence of mutant viruses that can be selected out by host immunity or antiviral drugs. Numerous research studies have shown that the speed of disease progression, reliability of diagnostic methods and the success of antiviral therapy and immunization are all influenced by genetic variability of the virus. Mutations in hepatitis B surface antigen (HBsAg) may lead to evasion of vaccine-induced immunity (“vaccine escape“ mutants) and loss of HBV detection by diagnostic assays. The inability to detect HBV means that these individuals may become blood donors and continue HBV transmission. Also, mutations in YMDD motif of viral DNA polimerase are associated with resistance to nucleos(t)ide analogues. Monitoring of HBV mutations contributes to improvement of prevention, diagnosis and creating more efficient antiviral therapy.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Uloga mutanata virusa hepatitisa B u liječenju kronične HBV infekcije

Ivana Fileš

SAŽETAK

Hepatitis B je upala jetre koja nastaje infekcijom virusom hepatitisa B (HBV). Najčešće se javlja kao akutni hepatits, no kod malog postotka inficiranih osoba prelazi u kronični oblik koji predstavlja visok rizik za razvoj ciroze jetre ili hepatocelularnog karcinoma. Procjenjuje se da je trenutan broj kronično zaraženih osoba u cijelom svijetu oko 240 milijuna, što ga čini značajnim faktorom morbiditeta i mortaliteta. Virus je vrlo infektivan, a prenosi se kontaktom sa zaraženim tjelesnim tekućinama. Replikacija virusa uključuje reverznu transkripciju uz virusnu DNA polimerazu koja nema ispravljačku sposobnost. To rezultira pojavom mutantnih virusa koji se mogu izdvojiti djelovanjem imunološkog sustava ili pod utjecajem antivirotika. Brojna su istraživanjaje pokazala da genetička varijabilnost virusa utječe na brzinu progresije bolesti, pouzdanost dijagnostičkih metoda, uspjeh antivirusne terapije i imunizacije. Mutacije u površinskom antigenu HBsAg mogu dovesti do neuspješne imunizacije cijepljenjem („escape“ mutanti) te neuspješne detekcije dijagnostičkim metodama. Nemogućnost detekcije predstavlja problem jer takve osobe mogu postati donori krvi i tako širiti zarazu. Također, mutacije u YMDD motivu virusne DNA polimeraze imaju važnu ulogu u razvoju rezistencije na nukleoz(t)idne analoge. Praćenje HBV mutacija važno je u svrhu bolje prevencije, dijagnoze te stvaranja efikasne antivirusne terapije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 47 stranica, 9 grafičkih prikaza, 0 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Hepatitis B virus, kronični hepatitis B, HBV mutacije, rezistencija na lijekove, vaccine escape mutanti

Mentor: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Olga Gornik, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Miranda Sertić, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Hepatitis B virus mutants influence on chronic HBV infection therapy

Ivana Fileš

SUMMARY

Hepatitis B is a liver inflammation caused by hepatitis B virus (HBV) infection. Usually it occurs as acute hepatitis, but in some cases virus remains in patient, causing a chronic infection. Consequently, it can lead to development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Worldwide, there are an estimated 240 million chronically infected persons. Therefore, chronic HBV infection is a major public health issue. Hepatitis B virus is very infectious and it spreads through contact with infected body fluids. Virus replication includes reverse transcription using a viral DNA polymerase lacking proof-reading ability. This results in the emergence of mutant viruses that can be selected out by host immunity or antiviral drugs. Numerous research studies have shown that the speed of disease progression, reliability of diagnostic methods and the success of antiviral therapy and immunization are all influenced by genetic variability of the virus. Mutations in hepatitis B surface antigen (HBsAg) may lead to evasion of vaccine-induced immunity („vaccine escape“ mutants) and loss of HBV detection by diagnostic assays. The inability to detect HBV means that these individuals may become blood donors and continue HBV transmission. Also, mutations in YMDD motif of viral DNA polimerase are associated with resistance to nucleos(t)ide analogues. Monitoring of HBV mutations contributes to improvement of prevention, diagnosis and creating more efficient antiviral therapy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 47 pages, 9 figures, 0 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Hepatitis B virus, chronic hepatatis B, HBV mutations, drug resistance, vaccine escape mutants

Mentor: **Sandra Šupraha Goreta**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, **Ph.D.** *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.