

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Milošević**

**UTICAJ GENOTIPA VIRUSA  
HEPATITISA B  
NA KLINIČKI TOK I ISHOD HRONIČNE  
INFEKCIJE**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2014.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**SCHOOL OF MEDICINE**

**Ivana Milošević**

**THE INFLUENCE OF HEPATITIS B  
VIRUS GENOTYPE ON  
CLINICAL COURSE AND OUTCOME OF  
CHRONIC INFECTION**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2014.**

**MENTOR:**

Prof. dr Dragan Delić, redovni profesor na katedri Infektivnih bolesti  
Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

**KOMENTOR:**

Doc. Dr Ivana Lazarević, docent na katedri Mikrobiologije sa imunologijom  
Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

**DATUM ODBRANE:**

\_\_\_\_\_

Mojim roditeljima

Anđi i Slobodanu Petrović

# UTICAJ GENOTIPA VIRUSA HEPATITISA B NA KLINIČKI TOK I ISHOD HRONIČNE INFEKCIJE

Ivana Milošević

## REZIME

**Cilj:** Genetička varijabilnost hepatitisa B virusa (HBV) posledica je visokog stepena replikacije ovog virusa i nemogućnosti ispravljanja slučajno nastalih grešaka tokom ovog procesa. Pored toga, terapija nukleozidnim/nukleotidnim analogima (NA) neminovno vodi u selekciju rezistentnih sojeva. HBsAg serotipovi HBV otkriveni su na osnovu reaktivnosti HBsAg sa poznatim panelima antitela. Na osnovu razlike u nukleotidnim sekvencama duž genoma definisani su genotipovi odn. subgenotipovi. Glavni cilj istraživanja bio je da se analizira uticaj genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova na težinu kliničke slike, patohistološki nalaz u tkivu jetre i progresiju u cirozu jetre i hepatocelularni karcinom.

**Metodologija:** U studiju je uključeno 162 terapijski nevinna bolesnika (126 muškaraca i 36 žena), sa potvrđenom dijagnozom hroničnog hepatitisa B (HHB). HHB je potvrđen na osnovu biohemijskih, seroloških i virusoloških parametara infekcije, kao i patohistološkog pregleda tkiva jetre. U cilju praćenja prirodnog toka HHB, kod bolesnika su određivani aktivnost alaninaminotrasferaze (ALT), protrombinsko vreme (PV) i koncentracija serumskih albumina, svakih šest meseci, pre uvođenja antivirusne terapije i tokom terapije lamivudinom. Pored toga ispitanicima su određivani i HBeAg, antiHBe, antiHBc, HBV DNK PCR, genotip, subgenotip i HBsAg subtip. Terapija lamivudinom je sprovedena kod bolesnika koji su ispunili kriterijume Evropskog udruženja za izučavanje jetre. Povoljan ishod terapije podrazumevao je supresiju virusne DNK i normalizaciju aktivnosti ALT. Pojava rezistencije HBV na lamivudin definisana je kroz virusološki i biohemijski proboj, odnosno kao izostanak supresije virusne replikacije. .

**Rezultati:** Kod 14,2% ispitanika bio je prisutan genotip A, a kod ostalih genotip D. Svi bolesnici sa genotipom A, imali su subgenotip A2 i HBsAg subtip adw2. Kod bolesnika sa genotipom D, potvrđena su tri subgenotipa: D1 kod 14 (8,6%) bolesnika, D2 kod 47 (29%) bolesnika i najzastupljeniji D3 kod 78 (48,1%) bolesnika. Kod 158 (97,5%) ispitanika određeni su HBsAg subtipovi: adw2 (14,5%), ayw2 (50%), ayw3 (34,2%), ayw4 (1,3%). Prisustvo HBeAg+ serologije bilo je značajno više kod infekcije genotipom A nego D (60,8% vs. 30,9%;  $p=0,02$ ). Stepenn viremije (HBV DNK IU/l) nije se razlikovao u zavisnosti od genotipova, subgenotipa i HBsAg subtipa. Stepenn viremije bio je različit u zavisnosti od HBeAg/antiHBe statusa: kod bolesnika sa HBeAg+/antiHBe-, HBeAg-/antiHB+ i HBeAg-/antiHBe- serološkim nalazima, vrednosti HBV DNK bila je 4,24, 2,67 i 2,69  $\log_{10}$ IU/l ( $p=0,01$ ). Srednje vreme do progresije u cirozu iznosilo je 23,2±3,4 godina za genotip A i 15,1±8,4 godina genotip D ( $P = 0,02$ ). Uspeh terapije lamivudinom nije zavio od genotipa, subgenotipa, HBsAg subtipa i stepena preterapije viremije. Kod bolesnika sa manje uznapredovalom bolešću (bez fibroze odn. sa lakom

fibrozom), verovatnoća da se razvije rezistencija na lamivudin bila je značajno manja nego kod bolesnika sa teškom fibrozom (48,9% vs. 76,1%;  $p=0,03$ ).

**Zaključak:** Aktivnost ALT i koncentracija serumskih albumina nisu se razlikovali u zavisnosti od genotipa, subgenotipa i HBsAg subtipa. Bolesnici sa genotipom D imali su bržu progresiju u cirozu jetre od bolesnika sa genotipom A. HBeAg pozitivnost je bila češća kod bolesnika inficiranih genotipom A, subgenotipom A2 i adw2 subtipom. Teška fibroza i ciroza jetre bili su negativni prediktivni faktori za uspešnost lečenja lamivudinom.

*KLJUČNE REČI: HBV, genotip, subgenotip, HBsAg subtip, prognoza*

# THE INFLUENCE OF HEPATITIS B VIRUS GENOTYPE ON CLINICAL COURSE AND OUTCOME OF CHRONIC INFECTION

Ivana Milošević

## **ABSTRACT**

**Purpose:** Genetic variability of hepatitis B virus (HBV) is a consequence of the high degree of viral replication and its inability to correct accidental errors arising during this process. In addition, therapy with nucleoside/nucleotide analogues (NA) leads to the selection of resistant strains. HBsAg serotypes are detected on the basis of HBsAg reactivity with known antibody panels. HBV genotypes and subgenotypes are defined based on differences in nucleotide sequences along the genome. The main objective of this study was to analyze the effect of genotype, subgenotypes and HBsAg subtypes on the clinical course, histopathologic changes in liver and the progression to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

**Methodology:** This study included 162 treatment naive patients (126 men and 36 women) with a confirmed diagnosis of chronic hepatitis B (CHB). The diagnosis of CHB was established according to clinical presentation, biochemical and virological markers of infection, along with pathohistology findings at aspiration liver biopsy. In order to assess the natural history of chronic HBV infection, along with treatment response, serum bilirubin, ALT, prothrombin time and albumin levels were measured at the time of diagnosis, and every six months, before the introduction of antiviral therapy with lamivudine, and at same intervals thereafter in both subgroups of treated and untreated patients. Different serological markers, such as HBsAg/Ab, HBeAg/Ab and HBcAb, as well as HBV DNA level, genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes also were evaluated. Lamivudine therapy was introduced in patients who met the criteria of the European Association for the Study of Liver. Suppression of viral DNA along with ALT normalization was considered a favorable response to antiviral therapy. Emergence of HBV resistance to lamivudine was considered most probable in those patients who experienced virological and biochemical breakthrough, and/or in those who never reached viral suppression.

**Results:** 14.2% of patients had genotype A, while other had genotype D. Patients with genotype A, had subgenotype A2 and HBsAg subtype adw2. Patients with genotype D, had three subgenotypes: D1 (8,6% of patients), D2 (29%) and the most common D3 (48,1%). Different HBsAg subtypes were found: adw2 (14,5%), ayw2 (50%), ayw3 (34,2 %) and ayw4 (1,3%). The prevalence of HBeAg+ serology of 60.8% among patients infected with genotype A was significantly higher than 30.9% recorded among those with genotype D ( $P = 0.02$ ). The viral loads (HBV DNA IU/l) did not differ depending on genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes. The patients with HBeAg +/HBeAb-, HBeAg-/HBeAb+ and both HBeAg and HBeAb negative serologic patterns had different viral loads: 4.24, 2.67 and 2.69 log<sub>10</sub>IU/L ( $p = 0.01$ ). Mean time to liver cirrhosis was 23.2±3.4 years and 15.1±8.4 years, for genotypes A and D, respectively ( $P=$

0.02). Genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes, as well as pretreatment viral loads did not influence the lamivudine treatment outcome. The probability of lamivudine resistance was significantly lower in patient with less advanced disease (with no/mild fibrosis) than in patients with severe fibrosis ( 48,9 % vs. 76,1%,  $p=0,03$ ).

Conclusion: Genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes did not influence the serum ALT activity and albumin concentration. Patients with genotype D had faster progression to liver cirrhosis than in patients with genotype A. HBeAg positivity was more common in patients infected with genotype A, subgenotype A2 and adw2 subtype. Severe fibrosis and cirrhosis were negative predictive factors for lamivudine treatment outcome.

*KEY WORDS: HBV, genotype, subgenotype, HBsAg subtype, prognosis*



# SADRŽAJ

<b>Poglavlje 1. UVOD</b> .....	1
1.1 Istorijat .....	1
1.2 Epidemiologija HBV .....	2
1.3 Struktura HBV .....	4
1.4 Životni ciklus HBV .....	8
1.5 Genetička varijabilnost HBV .....	9
1.5.1 Genotipovi .....	9
1.5.2 Subgenotipovi .....	12
1.5.3 HBsAg serotipovi ili subtipovi.....	12
1.5.4 Genske varijante omotača virusa .....	12
1.5.5 Pre-Core varijante .....	13
1.5.6 Mutacije u P genu .....	13
1.5.7 Klinički značaj genetičke varijabilnosti HBV.....	14
1.6 Patogeneza hronične HBV infekcije .....	16
1.7 Prirodni tok hronične HBV infekcije .....	17
1.8 Kliničke karakteristike hronične HBV infekcije .....	18
1.8.1 HBeAg-pozitivan hronični hepatitis .....	19
1.8.2 HBeAg-negativan hronični hepatitis .....	20
1.8.3 Dugoročne posledice hronične HBV infekcije – ciroza jetre i hepatocelularni karcinom .....	20
1.9 Patohistološke promene u jetri u toku hronične HBV infekcije.	21
1.10 Terapija hronične HBV infekcije .....	22
<b>Poglavlje 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	27
<b>Poglavlje 3. MATERIJAL I METODE SITRAŽIVANJA</b> .....	28
3.1 Ispitanici .....	28
3.2 Klinički podaci .....	28
3.3 Indikacije za terapiju lamivudinom .....	31
3.4 Ishod antivirusne terapije .....	33
3.4 Statistička obrada podataka .....	34
<b>Poglavlje 4. REZULTATI</b> .....	35
4.1 Rezultati ispitivanja uticaja genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova na prirodni tok hronične HBV infekcije .....	35
4.2 Rezultati ispitivanja uticaja genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova na uspeh antivirusne terapije lamivudinom..	48
<b>Poglavlje 5. DISKUSIJA</b> .....	58
<b>Poglavlje 6. ZAKLJUČCI</b> .....	76
<b>Poglavlje 7. LITERATURA</b> .....	78
<b>Spisak skraćenica</b> .....	99

## 1. Uvod

Hepatitis B virus (HBV) se izdvaja od ostalih uzročnika virusnih hepatitisa po svom globalnom uticaju na zdravlje ljudi. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) približno 2 milijarde ljudi, tj. jedna trećina svetske populacije je bila u kontaktu sa ovim virusom, a 350 miliona ljudi je hronično inficirano (Goldstein i sar. 2005).

Hronični B hepatitis se klinički ispoljava u različitim formama: od relativno blage hronične infekcije, do teških fomi hroničnog hepatitisa koje, u 15-20% slučajeva, vode u cirozu i hepatocelularni karcinom (HCC). Razvoj ciroze i HCC kod ovih bolesnika odgovorni su za smrt 1-2 miliona ljudi širom sveta. Infekcija hepatitis B virusom je odgovorna za 5-10% transplantacija jetre (WHO 1997., Fattovich i sar. 2008.).

Hepatitis B virus je DNK virus sa 10 različitih genotipova (A-J) koji su detektovani na osnovu razlike u sekvenci nukleotida većoj od 8% duž celog genoma. Genotipovi imaju karakterističnu geografsku distribuciju, a njihov uticaj na tok i težinu bolesti je nedovoljno ispitan (Kao 2011.).

Bolje poznavanje uticaja genotipova HBV na klinički tok, progresiju bolesti i odgovor na antivirusnu terapiju, omogućilo bi efikasniju prevenciju, dijagnozu i lečenje ove rasprostranjene infekcije.

### 1.1 Istorijat

Krajem XIX veka prepoznat je parenteralni način prenošenja hepatitisa, a prva saznanja o hepatitisu B vezana su za šezdesete godine XX veka. Baruch Blumberg i saradnici su 1965. godine u Filadelfiji otkrili da u serumu obolelih od hemofilije koji su primali više transfuzija, postoje antitela koja reaguju sa antigenom iz seruma zdravih Aboridžina iz Australije. Zato je pomenuti antigen nazvan „Australija antigen“. Identičan antigen je, ubrzo potom, otkriven i u serumu obolelih od serumskog hepatitisa (Blumberg i sar. 1965., Blumberg i sar. 1967.), ali ne i kod zdravih Amerikanaca. „Australija antigen“ je tako postao glavni marker za dokazivanje serumskog tj. hepatitisa B, što je Blumbergu donelo Nobelovu nagradu 1977. godine (Blumberg 1977.).

Dalji napredak je usledio otkrićem Dejnovne partikule 1970. godine, tj. kompletne virusne čestice, koja se razlikovala od do tada poznatih virusa (Dane i sar. 1970.). Površinski omotač Dejnovne partikule je sadržao antigen identičan „Australija antigenu“, te je SZO 1973. preimenovala „Australija antigen“ u Hepatitis B površinski (surface) antigen tj. HBsAg. U Danovoj partikuli je otkrivena dvostruka spiralno uvijena DNK i prisustvo core antigena u jezgru virusa (HBcAg).

Hepatitis B e antigena (HBeAg) i antitela na ovaj antigen (antiHBe) otkriveni su 1972. godine (Magnius i Espmark 1972.). Tokom 80-tih godina XX veka, kod bolesnika iz područja Mediterana (Italija, Grčka), dokazana je replikacije virusa i kod odsustva HBeAg i prisutva antitela na ovaj antigen (Hadziyannis 1995., Brunetto i sar. 1999). Zahvaljujući ovim zapažnjima 1989. godine otkrivena je specifična mutacija u *precore* regionu genoma virusa, koja uslovljava nastanak stop kodona odgovornog za „HBeAg negativan“ varijantu HBV infekcije (Carman i sar. 1989.).

## **1.2 Epidemiologija HBV**

HBV ima isti epidemiološki model prenošenja kao virus HIV-a, ali 50-100 puta infektivniji od njega. Izvor infekcije je čovek sa HBV infekcijom. Inkubacija traje od 30-180 dana (prosečno 60-90 dana). Bolest se prenosi perkutanom ili permukoznom izlaganjem inficiranoj krvi i telesnim tečnostima koje sadrže krv (Shepard i sar. 2006.). HBsAg je detektovan u različitim telesnim tečnostima, ali infektivnost je dokazana samo za serum, spermu i pljuvačku (Lee 1997.). Rizici za infekciju su transfuzije krvi i krvnih derivata, intravenska zloupotreba narkotika, nezaštićeni seksualni kontakti, hemodijaliza, stomatološke i hiruške intervencije, upotreba nesterilnih medicinskih instrumenata, tetoviranje, pirsing tela, kozmetički tretmani. Poseban značaj ima verikalna transmisija. Zdravstveni radnici su u profesionalnom riziku za HBV infekciju. Česte su i infekcije neimunizovanih ukućana hronično inficiranih ljudi. Opisana je transmisija HBV infekcije putem transplantacije ekstrahepatičnih tkiva i organa antiHBc pozitivnih donora (Dickson i sar. 1997.).

U svetu godišnje umre oko 600.000 ljudi od posledica HBV infekcije (Shepard i sar. 2006.), dok prema drugim autorima ta cifra doseže milion smrtnih ishoda (Block i sar. 2007.). Hronični B hepatitis (HHB) je vodeći uzročnik ciroze, insuficijencije jetrine funkcije i HCC (Lee, 1997., Pollicino i sar. 2011.). Oko 25% osoba sa HHB koje su

inficirane tokom detinjstva, umire od ciroze i HCC (WHO 1997., WHO 2000). HCC je peti karcinom po učestalosti, a treći karcinomom po smrtnosti, sa preko 500.000 smrtnih ishoda godišnje (Block i sar. 2007.).

Hepatitis B virus je, posle duvana, drugi dokazani humani karcinogen prema podacima Internacionalne agencije za istraživanje kancera. Procenjuje se da je odgovoran za 60-80% slučajeva HCC, te spada u tri najčešća karcinoma muškaraca u Africi, Aziji i oblasti Pacfika, a najčešći je karcinom žena (Parkin i sar. 2001.). Hronična HBV infekcija nosi 200 puta veći rizik za razvoj HCC u odnosu na osobe koje nisu inficirane ovim virusom. Procenjuje se da HCC nastao kao posledica HBV infekcije uzrokuje 320.000 smrtnih ishoda godišnje (WHO 2000). Uprkos padu incidence HBV infekcije u Americi, incidenca HCC su dvostruko povećala poslednjih 15 godina, a mortalitet od HCC je porastao za 41%, zbog velikog broja osoba inficiranih pre uvođenja imunizacije protiv HBV (El-Serag i sar. 1999). U zemljama u razvoju, većina bolesnika sa HCC umire tokom nekoliko meseci od momenta postavljanja dijagnoze. U razvijenim zemljama, hiruško lečenje i hemioterapija produžavaju život nekih bolesnika sa HCC nekoliko godina.

Incidenca HBV infekcije i put transmisije značajano variraju u različitim delovima sveta i u okviru pojedinih populacija (WHO 1996). Step en endemičnosti pojedinih delova sveta prvenstveno zavisi od uzrasta u kom dolazi do infekcije (Stevens i sar. 1975., Wasley i sar. 2008.).

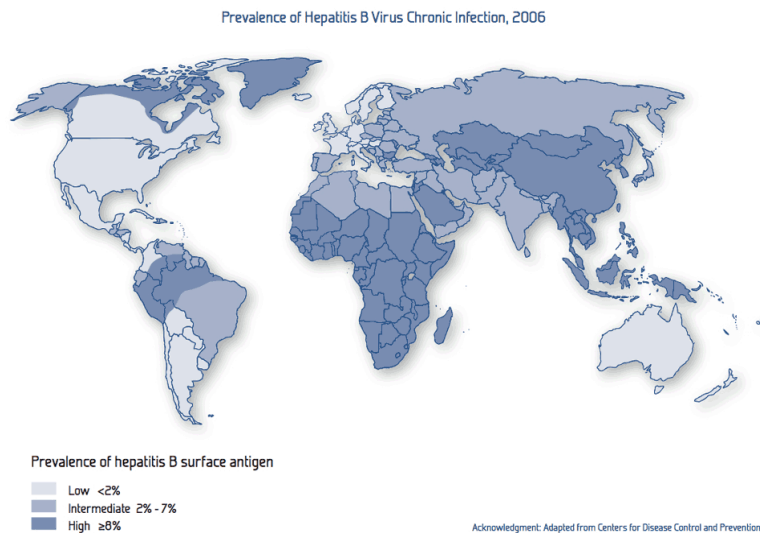
U visoko endemske krajeve spadaju oni sa više od 8% hronično inficiranog stanovništva (Kina, jugoistočna Azija, subsaharska Afrika...). U ovim oblastima, 70-90% populacije ima serološke markere aktuelne ili preležane infekcije. Skoro svi bolesnici sa HHB su inficirani u perinatalnom periodu ili ranom detinjstvu što je glavni razlog visoke stope hroniciteta. Rizik za HBV infekcije postoji i posle 5. godine života, ali u manjoj meri vodi u hronicitet. U visoko endemičnim oblastima (Kina, Indija, Singapur, Vijetnam...) živi oko 45% ukupnog svetskog stanovništva. U ovim krajevima HBV je odgovoran za 80-90% slučajeva HCC (Lee i sar. 2007.)

U umereno endemskim krajevima hronična HBV infekcija je zastupljena sa 1-7% (istočna Evropa, Mediteran, Indija, Japan...), a serološke markere prethodne HBV infekcije ima 10-60% populacije. U ovu grupu spada i Srbija. Putevi prenošenja su različiti, poseban značaj ima perkutani put – intravenska zloupotreba narkotika,

tetoviranje, pirsing tela, kozmetički tretmani... Infekcija nastaje u različitim životnim dobima: kod novorođenčadi, u ranom detinjstvu i u odraslom dobu.

Najrazvijeniji delovi sveta (SAD, zapadna Evropa, skandinavske zemlje...) spadaju u nisko endemske sa < 1% hronično inficiranih. Serološke markere ranije HBV infekcije ima 5-7% stanovnika. Infekcija se obično prenosi intravenskom zloupotrebom narkotika, zatim među promiskuitetnim osobama, homoseksualcima (Teo 2005.). Rizik postoji i za zdravstvene radnike, čak 4 puta veći u odnosu na opštu populaciju. Iako je procenat infekcije kod novorođenčadi i male dece nizak, on značajno doprinosi ukupnom broju hronično obolelih.

Veliki procenat inficiranih je među hematološkim bolesnicima i bolesnicima na hemodijalizi. Pored pomenutog, postoje i određene etničke grupe koje su u visokom procentu hronično inficirane HBV: urođenici sa Aljaske i sa pacifičkih ostrva, australijski Aboridžini, Maori, urođenici iz područja Amazona.



Slika 1. Prevalenca HBsAg

(preuzeto sa: <http://wwwnc.cdc.gov>)

### 1.3 Struktura HBV

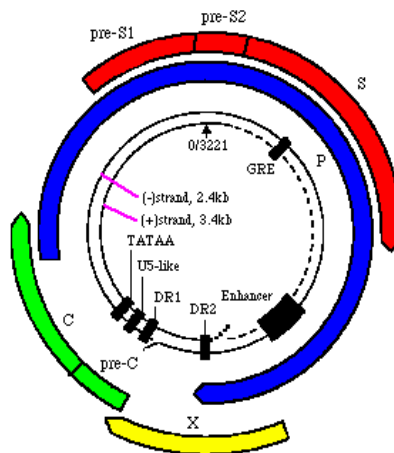
HBV je jedini DNK primarno hepatotropni virus. Pripada porodici *Hepadnaviridae*, rodu *Orthohepadnavirus*. Pored čoveka, domaćini su šimpanze i giboni (Glebe i Urban 2007.).

Kompletna virusna čestica – Dejnova partikula je sferična, promera 42-47 nm. Ovo je infektivna forma virusa, sastoji se od lipidnog omotača i ikozaedarnog

nukleokapsida, a njen titar u serumu se kreće od  $10^4$ /ml, do preko  $10^9$ /ml. Glavni deo omotača virusa čini HBsAg. Pored toga, HBsAg je prisutan u serumu inficirane osobe i samostalno u sferičnoj (22 nm) i tubularnoj, filamentoznoj formi (različite dužine, do 200 nm). Veći deo HBsAg u cirkulaciji čine upravo ove dve neinfektivne forme, kojima nedostaje nukleinska kiselina (Glebe i sar. 2007.). Titar ove sferične, subvirusne forme se kreće i do  $10^{12}$ /ml, a koncentracija premašuje koncentraciju Daneovih partikula 10.000-1.000.000 puta. Iako neinfektivne, ove forme HBsAg su visoko imunogene i indukuju stvaranje neutrališućih antiHBs antitela. Vezujući ova antitela, verovatno omogućavaju perzistiranje infekcije.

Genom virusa čini nepotpuno dvolančana, cirkularna DNK, koja sa 3200 baznih parova i predstavlja najmanju virusnu DNK sisara. Zajedno sa HBcAg čini nukelokapsid. Lanci DNK su asimetrični: dugi (minus) lanac i kraći (plus) lanac (Nassal 2008.). Minus lanac je kompletan i na njegovom 5' kraju je kovalentno vezana DNK polimeraza. Kraći, plus lanac celom svojom dužinom ulazi u sastav dvolančane DNK i njegov 3' je varijabilne je dužine (15-60% dužine dugog lanca).

Postoje 4 regiona (gena) u genomu – *P*, *S*, *C* i *X*, koji se međusobno preklapaju na dužini većoj od polovine genoma. To su takozvani “open reading frames” – ORF ili otvoreni ramovi čitanja (Block 2007.). Oni omogućavaju da se poveća kodirajući kapacitet, jer se, kako nema „stop“ kodona, DNK „čita“ jedan i po do dva puta. Svi ORF su identične orijentacije, delimično se preklapaju i kodirani su negativnim lancem DNK. Pored njih postoji i 6 startnih kodona, 4 promotera i 2 „pojačivača“ (engl. enhancers) transkripcije. Genom HBV ne sadrži nekodirajuće regione.



## Slika 2. Šematski prikaz HBV genoma

(preuzeto sa <http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/Hepatitis2.gif>)

Najduži ORF, P gen, kodira najveći deo genoma virusa (80%) i virusnu DNK polimerazu (Chang 1990.) Kod polimeraze se razlikuju 3 domena i tzv. „spacer“: terminalni protein, reverzna transkriptaza (RNK zavisna DNK polimeraza) i RNaza H. Domen reverzne transkriptaze je centralno postavljen, a domen RNaze H se nalazi na C terminalnom delu lanca. „Spacer“ razdvaja domen reverzne transkriptaze od domena terminalnog proteina. Domen terminalnog proteina je od posebnog značaja jer predstavlja prajmer za reverznu transkripciju pregenomske (pg) RNK u negativan lanac DNK, te je od esencijalnog značaja za aktivnost polimeraze (Zoulim i sar. 1994., Nassal 2008.).

S region ima tri startna kodona i kodira tri transmembranska glikoproteina virusnog omotača – *L*, *M* i *S*, a sastoji od 3 podregiona – *pre-S1*, *pre-S2* i *S*. Najmanji od glikoproteina je *S* tj. HBsAg, koji se sastoji od 226 aminokiselina, kodiran je *S* podregionom i sadrži glavnu antigensku determinantu „a“ (124-147 AK). Upravo ova antigenska determinanta je epitop za vezivanje antiHBs antitela posle infekcije i vakcinacije, a važna je za proizvodnju vakcine i seroloških testova za dokazivanje HBV infekcije. *M* protein je kodiran od strane *pre-S2* i *S* regiona. *L* protein je najduži, kodira ga *pre-S1*, *pre-S2* i *S* region. Odnos *L*, *M* i *S* proteina u virionu je 1:1:4, dok neinfektivne, subvirusne partikule sadrže *L* protein samo u tragovima (Bruss 2007.).

Iako receptori za HBV na površini hepatocita nisu dovoljno ispitani, utvrđeno je da *L* protein, tačnije njegov *pre-S1* domen, odgovoran za prepoznavanje i vezivanje za receptore na hepatocitima (Meier i sar. 2013.). Verovatno zato se *L* protein uglavnom nalazi na kompletnim virionima (98-99%), a retko je prisutan u neinfektivnim, nekompletnim formama (1-2%) (Bruss 2007). To ukazuje da se ovim putem sprečava vezivanje brojno nadmoćnijih, neinfektivnih sferičnih formi HBsAg za receptore, odnosno sprečava se njihova kompeticija sa Dejnovim partikulama za receptore na hepatocitima (Klingmuller i sar. 1993.).

Proteini omotača se insertuju u membranu endoplazmatičnog retikuluma (ER). Odatle prominiraju u lumen ER i sekretuju se iz inficirane ćelije kao sferične, subvirusne partikule ili kao kompletne, infektivne Dejnovim partikule, nakon što obmotaju

nukleokapsid koji sadrži DNK virusa. Prisustvo HBsAg u ER daje karakterističan izgled hepatocitima, koji patolozi opisuju kao „ground glass“ ćelije.

U C regionu postoje 2 startna kodona i 2 podregiona *pre C* i *C*. *C* podregion kodira „core“ protein tj. HBcAg koji je glavna komponenta kapsida. Ne može se detektovati u serumu, već se nalazi u jedrima hepatocita bolesnika sa aktivnom replikacijom virusa. Pored toga dokazan je u limfocitima, pankreasu, endotelu krvnih sudova, što ukazuje na ekstrahepatičnu replikaciju. HBcAg je važan za enkapsidaciju pgRNK i njeno vezivanje za virusnu polimerazu. Tako se ovom kompleksu omogućava inicijacija reverzne transkripcije u novoformiranom nukleokapsidu (Daub i sar. 2002., Kann i sar. 2007.)

*Pre-C* podregion kodira nestrukturalni *e* protein tj. HBeAg. Tokom procesa sazrevanja, *pre-C* transkript prolazi kroz ER, odseca mu se deo i tako nastaje HBeAg koji se oslobađa kao solubilni protein. Radi o solubilnom antigenu koji se dokazuje u serumu inficiranih osoba, a pored toga, nalazi se u jedru, ređe citoplazmi inficiranih hepatocita. Smatra se dobrim, ali ne i neophodnim markerom replikacije HBV, jer replikacije virusa postoji i kod HBeAg negativnih varijanti virusa (Hadziyannis i sar. 2006.). Prisutan je u serumu bolesnika sa akutnom HBV infekcijom, a smatra se da njegovo prisustvo duže od 10 nedelja govori u prilog razvoja hroniciteta. HBeAg služi kao „mamac“ za imuni sistem i kao imunoregulatorni protein promoviše perzistiranje virusa (Chen 2005). Deo formiranog HBeAg, 20-30%, ostaje u citoplazmi, gde antagonizuje TLR signali put, čime deluje imunomodulatorno i doprinosi supresiji imunskog odgovora domaćima (Lang i sar. 2011).

Najmanji ORF, X gen kodira HBxAg tj. protein X, multifunkcionalni regulatorni protein sa transaktivacionim i proapoptotičkim potencijalom. Protein X se nalazi u velikoj meri u citoplazmi, dok je u jedru ćelije prisutan u maloj količini. Ima ulogu transaktivatora transkripcije. Poznato je da se HBxAg smatra za kofaktor u karcinogenezi HCC (Block 2007). Utvrđeno je da indukuje hepatocelularnu proliferaciju *in vitro* i *in vivo* i oštećuje funkciju tumor supresorskog proteina p53 (Madden i sar. 2001., Tralhao i sar. 2002.). Pored toga, mali X protein, indukuje lipogenezu i akumulaciju lipida u hepatocitima i ćelijama HCC i potencira aktivnost TGF- $\beta$  (Kim i sar. 2008, Na i sar. 2009.). Postoje i oprečna saopštenja po kojima protein X, indukuje apoptozu izmenjenih hepatocita, pa mu se pripisuje citostatska uloga (Song i sar. 2003., Kim i sar. 2005).



Dokazano je da je protein X neophodan za replikaciju ćelije *in vitro* i *in vivo* i održavanje produktivnosti virusa. Tako pri inokulaciji ćelija sa HBV bez HBxAg, nije došlo do produktivne infekcije, što nije bio slučaj pri inokulaciji „divljim tipom“ HBV (eng. wild type, wtHBV) (Tsuge i sar. 2010., Lucifora i sar. 2011.). Potvrđeno je da ulazi u sastav minihromozoma kovalentno zatvorene, cirkularne (engl. covalently closed circular - ccc) DNK (Levrero i sar. 2009., Lou i sar. 2013.) i podstiče enkapsidaciju pgRNK (Melegari i sar. 2005). Sve to govori o ulozi HBxAg u različitim faza životnog ciklusa HBV. Dalje ispitivanje funkcije proteina X je od velikog značaja, posebno sa aspekta potencijalnog ciljnog mesta budućih antivirusnih lekova.

#### **1.4 Životni ciklus HBV**

Replikacija virusa hepatitisa B je posebna u odnosu na ostale DNK viruse. Replikacija se odigrava u hepatocitima preko tzv. pregenomske RNK (pgRNK).

Najranije faze životnog ciklusa su neodovoljno ispitane, pre svega sa stanovišta vezivanja za receptore na hepatocitima. Već je napomenuto da je pre-S1 domen *L* proteina, odgovoran za prepoznavanje i vezivanje za receptore na hepatocitima (Meier i sar. 2013.). Istraživanje otežava nedostatak adekvatnog *in vitro* sistema, jer su primarne kulture hepatocita osetljive na infekciju samo nekoliko dana. Nadu za dalje ispitivanje pruža otkriće da su primarne kulture hepatocita roščica (*Tupaia belangeri*) osetljive na HBV, kao i ćelijske linijame hepatoma (HepaRG) (Glebe 2006., Glebe i Urban, 2007). Više proteina je razmatrano za ulogu receptora za vezivanje HBV. Nedavna istraživanja su ukazala da se prodor HBV odvija preko bazolateralne membrane diferentovanih i polarizovanih hepatocita (Schulze i sar. 2012.).

U daljem toku, dolazi do spajanja omotača virusa i membrane hepatocita, nukleokapsid virusa se oslobađa u citoplazmu hepatocita. Genom se transportuje u nukleus, a veruje se da se transport odigrava posredstvom sistema mikrotubula (Rabe i sar. 2006). U jedru hepatocita se odvija ključni momenat u životnom ciklusu HBV - formiranje cccDNK (Gou i sar. 2012.). Većim delom cccDNK se koristi kao matrica za produkciju pgRNK.

Sledeći važan korak u HBV replikaciji je specifično pakovanje pgRNK i reverzne transkriptaze u novoformirane kapside. Procesom reverzne transkripcije, pgRNK se reverzno prepisuje u komplementarni minus DNK lanac. Pregenomska RNK se

dezintegrira dejstvom RNaza H domena DNK polimeraze. Po završenoj sintezi minus DNK lanac služi kao kalup za sintezu komplementarnog plus DNK lanca pomoću DNK polimeraze. Ovako nastaje nepotpuno-dvolančanu, cirkularnu DNK, pakuje se u novi virion i oslobađa iz zaraženog hepatocita u cirkulaciju (Garcia i sar. 2009.). Smatra se kompletiranje Daneove partikule odgirava u endoplazmatičnom retikulumu (ER).

Deo cccDNK ostaje u jedru u nereplikativnoj formi (prosečno 1-50 kopija/jedru). Upravo cccDNK dovodi do relapsa po prekidu terapije inhibitorima reverzne transkriptaze kod hronično inficiranih ili do reaktivacije infekcije u uslovima imunosupresije (hemioterapija, kortikosteroidna terapija, transplantacija organa...). Inhibitori HBV polimeraze ne deluju direktno na cccDNK, kako je opisano u brojim *in vitro* i *in vivo* studijama, što ukazuje da je cccDNK minihromozom vrlo stabilan u hepatocitima (Lutgehetmann i sar. 2010.) Identifikacija molekularnih mehanizama koji regulišu stabilnost cccDNK i njenu transkripcionu aktivnost, može biti put za nov terapijski pristup i dizajniranje strategija za smanjenje rezervoara cccDNK (Levrero i sar. 2009.).

## **1.5 Genetička varijabilnost HBV**

Počev od 2000. godine, genetička varijabilnost HBV je predmet sve većeg interesovanja istraživača i kliničara. Jedno od glavnih obeležja HBV je veoma visoka stopa replikacije (preko  $10^{9-11}$  kopija/24h), koju neminovno prate greške. Bitna karakteristika reverzne transkriptaze je nemogućnost da ispravlja ove slučajno nastale greške (Yim 2008.). To je razlog zbog koga se kod HBV mutacije javljaju  $10^4$  puta češće nego kod drugih DNK virusa (Locarnini 2005). Mutacije se mogu javiti u bilo kom delu genoma, te tako nastaju varijante virusa sa replikacijom i odgovorom na antivirusnu terapiju različitim od divljeg tipa HBV (engl. wild type HBV ili wtHBV). Pored toga, nove terapijske opcije dovele su do napretka u terapiji HBV, ali i do novih izazova. Kao posledica upotrebe nukleozidnih ili nukleotidnih analoga (NA), došlo je do pojave kvazispicijesa rezistentnih na ove lekove, zbog selektivnog pritiska antivirusne terapije (Sheldon i sar. 2006., Yim 2008.).

### **1.5.1 Genotipovi**

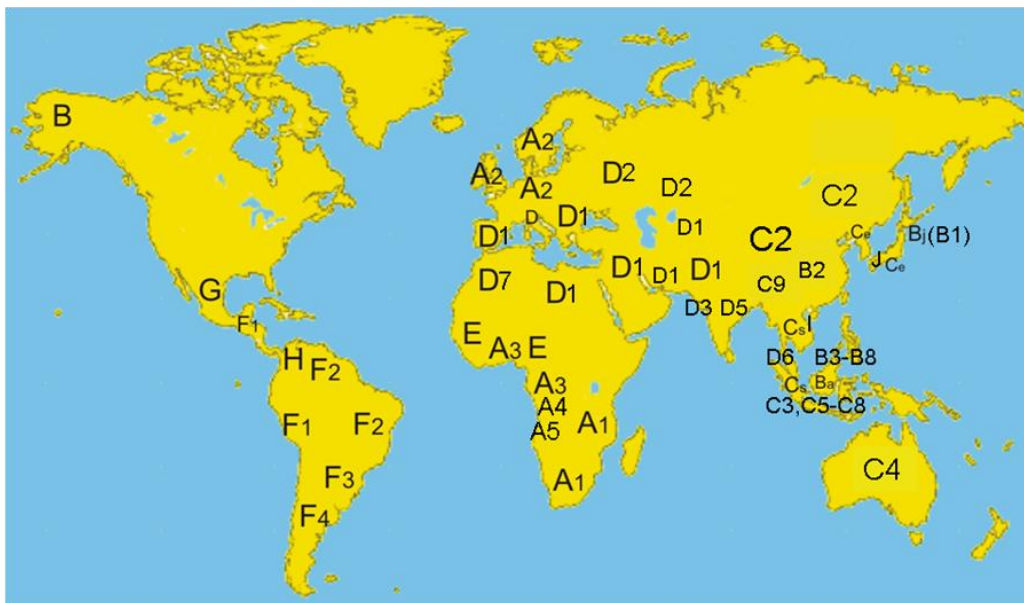
Podela HBV na genotipove bazira se na razlici u nukleotidnoj sekvenci većoj od 8% duž celog genoma. Otkriveno je 10 genotipova koji se obeležavaju slovima A-J, sa

karakteričnom geografskom distribucijom (tabela br. 2). Najpre je 1988. godine objavljeno otkriće prva četiri genotipa, označena slovima A-D (Okamoto i sar. 1988.). Sledilo je otkriće i ostalih genotipova F, E, G, H (Norder i sar. 1994., Stuyver i sar. 2000., Aaruz-Ruiz i sar. 2002.). Poslednji su otkriveni genotipovi I i J (Tran i sar. 2008., Tatematsu i sar. 2009.), mada je postojanje genotipa I bilo predmet diskusije (Kurbanov i sar. 2008.)

Tabela 1. Geografska distribucija genotipova HBV

<b>genotip</b>	<b>geografska distribucija</b>
A	Afrika, Indija, severna Europa, SAD
B	Azija, SAD
C	Azija, SAD
D	Indija, bliski Istok, južna Evropa, SAD
E	zapadna i južna Afrika
F	centralna i južna Amerika
G	Evropa, SAD
H	centralna i južna Amerika, Kalifornija u SAD
I	Vijetnam
J	Japan

Genotip A dominira u severnoj Evropi i SAD (Chu i sar. 2003., Deterding i sar. 2008). Genotipovi B i C su karakterični za područje Azije i Dalekog Istoka (Zeng i sar. 2005., You i sar. 2008., Ma i sar. 2013.). Genotip D je prisutan širom sveta, ali dominira na Mediteranu, Bliskom Istoku i Indiji (Hadziyannis 2011.). Genotip E je najčešći u zapadnoj i južnoj Africi (Andernach i sar. 2009.). Genotip F potiče iz Centralne i Južne Amerike (Arauz-Ruiz i sar. 2002., Devesa i sar. 2007., Marciano i sar. 2013.). Genotip G je otkriven u Evropi (Francuska, Gruzija, Engleska, Italija, Nemačka) i SAD (Stuyver i sar. 2000, Chu i sar. 2003., Calin i sar. 2013.). Genotip H je dokazan u Kaliforniji, centralnoj i južnoj Americi (Arauz-Ruiz i sar. 2002., Devesa 2007., Roman i sar. 2013.). Najmanje je podataka o genotipu I opisanom u Laosu i Vijetnamu i genotipu J koji je otkriven u Japanu (Olinger i sar. 2008., Tran i sar. 2008., Tatematsu i sar. 2009.).



Slika 3. Globalna distribucija HBV genotipova i subgenotipova.

(preuzeto iz: Zhang Q, Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 2011;11:86-91.)

Geografska distribucija genotipova vezuje se za migraciju stanovništva (Miyakawa i sar. 2003.). U Indiji su prisutni genotipovi A i D. Prema nekim podacima oni su zastupljeni prilično ujednačeno (Thakur i sar. 2002). Prema saopštenjima drugih autora, u Indiji dominira genotip D, a genotip A odgovoran za samo 5-8% slučajeva HBV infekcije (Gandhe i sar. 2003., Arankalle i sar. 2003.). Genotipovi B i C dominiraju na Dalekom Istoku i u jugostočnoj Aziji (Nakayoshi i sar. 2003., Chan i sar. 2003., Sumi i sar. 2003.) U ovim oblastima HBV infekcija je visoko endemična, a vertikalna transmisija su glavni put širenja infekcije. Suprotno tome, genotipovi A i D su karakterični za zapadnu Evropu i serevnu Ameriku. U području Mediterana, bliskog Istoka i centralne Azije genotip D dominira. Smatra se HBV izolati u Indiji potiči iz Evrope ili *vice versa*. Genetske studije kojima su proučavani mitohondrijalna DNK i Y hromozom indijske populacije, pokazuju sličnost sa nalazima iz Evrope. Zato se smatra da je genotip D pre velikih migracija dominirao u Indiji, a da je kasnije delimično potisnut genotipom A (Kumar i sar. 2005.).

Činjenica je da globalizacija, i dalje prisutne migracije, interkontinentalni saobraćaj, ali i implementacija HBV vakcinacije, uslovljavaju promene (engl. shift) u prevalenciji genotipova hepatitisa B u različitim geografskim područjima.

### 1.5.2 Subgenotipovi

Zbog velike varijabilnosti nukleotidnih sekvenci unutar genotipova, došlo je do podele genotipova na subgenotipove. Subgenotipovi se baziraju na razlici u nukleotidnoj sekvenci većoj od 4% duž celog genoma. Obeležavaju se brojevima. U okviru genotipa A opisani su subgenotipovi A1–A6 (Hubschen i sar. 2011., Pourkarim i sar. 2010.). Za genotip B su otkriveni genotipovi B1–B8 (Mulyanto i sar. 2009., Abdou Chekaraou i sar. 2010.). U okviru genotipa C neki autori definišu čak 14 subgenotipova C1–C14 (Shi i sar. 2012.). Genotip D se karakteriše postojanje subgenotipova D1–D9 (Ghosh i sar. 2013.). Kod genotipa F definisani su subgenotipovi F1–F4 (Devesa i sar. 2008., Alvarado-Mora i sar. 2013.) U okviru genotipa I, razmatra se postojanje dva subgenotipa - I1 i I2 (Olinger i sar. 2008., Li sar. 2013.)

### 1.5.3 HBsAg serotipovi ili subtipovi

Serotipovi HBV su otkriveni na osnovu reaktivnosti HBsAg sa poznatim panelima antitela (Bouvier i Williams 1975.).

Serotipovi HBV određuju se na osnovu vezivanja parova posebnih antigenskih determinanti za jedinstvenu antigensku determinantu „a“. Po otkriću molekularnih dijagnostičkih metoda, zaključeno je da su serotipovi, u stvari, posledica različite sekvence amino kiselina u HBsAg i zato se još zovu HBsAg subtipovi.

Glavna antigenska determinanta „a“, zajedničke je za sve izolate HBV, a ostale determinante su uzrok varijabilnosti. Tako su najpre definisane determinante *d* i *y*, *w* i *r*, na osnovu kojih je izvršena klasifikacija 4 glavna HBsAg subtipa ili serotipa: *adw*, *adr*, *ayw*, *ayr*. Daljim otkrićem determinante *q* i subdeterminanti *q+* i *q-*, *w1-w4*, definisano je 9 serotipova *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4q-*, *adrq+*, *adrq-* (Couroucé-Pauty i sar. 1983., Lusida i sar. 2008.). Poslednji je opisan osporavani HBsAg subtip *adw3* (Arauz-Ruiz i sar. 2002., Echevarría i sar. 2005.).

### 1.5.4 Genske varijante omotača virusa

Moguće su mutacije determinante „a“ koje za posledicu imaju stvaranje tzv. „mutanata koji izbegavaju dejstvo vakcine“ (eng. vaccine-escape mutants ili VEM). Kod bolesnika lečenih NA, opisuju se tzv. „potencijalni mutanti koji izbegavaju dejstvo

vakcine“ ili eng. “antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutants”, skraćeno ADAPVEMs (Sayan i sar. 2013.).

Varijante virusa sa mutacijom „a“ determinante ne bivaju prepoznate od strane antiHBs antitela. Obično se radi o minor populaciji. Ipak ove varijante virusa se mogu preneti i izazvati *de novo* infekciju (Margeridon-Thermet i sar. 2009.). Postojanje ovih mutiranih sojeva virusa je objašnjenje za sledeće kliničke situacije:

- nastanak okultne infekcije sa lažno negativnim serološkim testovima za određivanje HBsAg
- nastanak infekcije uprkos prethodnoj vakcinaciji protiv HBV
- izostajanje neutrališućeg efekata hepatitis B imunoglobulina (HBIG).

#### 1.5.5 Pre-Core varijante

Mutacije u pre-C delu genoma imaju za posledicu smanjenu ili obustavljenu ekspresiju HBeAg, a ne utiču na ekspresiju HBcAg. S obzirom da HBeAg nije strukturni protein, replikacija virusa se neometano odvija.

Postoje dve vrste mutacija koje utiču na ekspresiju HBeAg. Prve mutacije su u regionu bazalnog core promotra - BCP (engl. “basal core promotor“), koji pripada okviru čitanja X gena. BCP mutacije (A1762T i G1764A) uslovljavaju smanjenu ekspresiju HBeAg. U drugu grupu spada mutacija (G1896A), locirana je u pre-C regionu, dovodi do nastanka stop kodona i kompletnog prestanka sinteze HBeAg. Ova mutacija se najčešće opisuje kod genotipa D i genotipa E, za razliku od drugih genotipova (Chu i sar. 2003., Hadziyannis 2011.).

#### 1.5.6 Mutacije u P genu

S obzirom da je reverzna transkriptaza (RT) ciljno mesto delovanja NA, mutacije P gena su od esencijalnog značaja za uspeh antivirusne terapije ovim lekovima. NA imaju strukturu sličnu prirodnim nukleotidima, uz modifikaciju u šećernim ili baznim grupama, te stupaju u kompeticiju sa prirodnim nukleotidima za vezivanje za RT. Nakon vezivanja, ovi lekovi deluju tako što sprečavaju sintezu (-) ili (+) DNK lanca ili ometaju sintezu prajmera za (-) DNK lanac.

DNK polimeraza ima sedam visokokonzerviranih funkcionalnih domena, obeleženih slovima A-G. Svojim aktivnim mestom ona povezuje nukleotide sa pgRNK i

ugrađuje ih u novi lanac DNK. Njen C domen sadrži četiri aminokiseline 203-206 (tirozin-metionin-aspartat-aspartat) tzv. YMDD motiv i predstavlja aktivno, katalitičko mesto ovog enzima. Mutacije koje uslovljavaju rezistenciju na lamivudin obično su unutar YMDD motiva. Usled mutacija YMDD motiva, menja se konformacija enzima i smanjuje se afinitet za vezivanje NA, dok se sposobnost virusa da vezuje prirodne nukleotide održava. Mutanti imaju smanjenu replikativnu sposobnost u odnosu na wtHBV.

Najčešća mutacija je zamena metionina valinom, ređe izoleucinom, na kodonu 204 C domena (M204V, M204I). Ove mutacije uslovljavaju rezistenciju HBV na lamivudin, emtricitabin i telbivudin (Zoulim i sar. 2009.). Sa ovom mutacijom mogu biti udružene i druge kompenzatorne, koje zajedno sa mutacijom u YMDD, vraćaju replikativnu sposobnost virusu i izjednačavaju se sa wtHBV (Niesterst i sar.2005.). Najčešća od ovih kompenzatornih mutacija je mutacija u B domenu, zamena leucina metioninom na poziciji 180 (L180M). Radi se zapravo o kompenzatornoj mutaciji, koja zajedno sa mutacijom u YMDD dovodi do rezistencije, a njena funkcija je da mutiranom soju povrati replikativnu sposobnost do nivoa wtHBV (Niesters i sar. 2005.).

Rezistencija na adefovir uslovljena je mutacijama koje nisu vezane za YMDD motiv, te se terapija može nastaviti ovim lekom nakon razvoja rezistencije na lamivudin.

Dokazano je da rezistentni sojevi virusa na NA postoje kod bolesnika koji nisu lečeni ovim lekovima (Kim do i sar. 2013.). Obično su prisutni kao minor varijante, ali pod selektivnim pritiskom terapije mogu postati dominantni, čak se i preneti se na druge osobe (Coppola i sar. 2013.).

#### 1.5.7 Klinički značaj genetičke varijabilnosti HBV

Iako brojna istraživanja ukazuju na moguć uticaj genotipova i subgenotipova HBV na klinički tok bolesti, podaci su oprečni, često kontradiktorni, a definitivne veze i patogenetski mehanizmi treba tek da budu utvrđeni. Uticaj HBsAg subtipova na tok hroničnog B hepatitisa i uspeh antivirusne terapije, nije bio predmet značajnijeg istraživanja.

Najviše podatka o vezi genotipova i toka bolesti potiče iz azijskih zemalja koje karakteriše visoka prevalenca HBV infekcije (8-15%). U većem delu Azije dominiraju genotipovi B i C. Istraživanja kod bolesnika iz Tajvana sa hroničnom HBV infekcijom i

prisutnim HBeAg, govore o težim kliničkim formama hroničnog hepatitisa i češćom progresijom u cirozu kod bolesnika sa genotipom C nego kod bolesnika sa genotipom B HBV (Chu i sar. 2005). Sa ovim su saglasni i rezultati drugih autora (Chan 2002.) Ispitivanjem bolesnika sa HBeAg-negativnim hroničnim hepatitisom B u Hong Kongu, utvrđeno je genotip C bio udružen sa težim histološkim oštećenjem nego infekcija genotipom B HBV (Chan 2002.).

Velika studija sprovedena u Kini, kojom je obuhvaćeno 884 bolesnika sa B i C genotipom HBV, nije ukazala na razliku u biohemijskim analizama i nivou viremije između ova dva genotipa (Zhao i sar. 2007.). Autori nisu našli ni razlike u tom smislu između subgenotipova C1 i C2. Međutim, dokazano je da postoji značajna razlika u stepenu hepatične nekroinflamacije i fibroze između ova dva genotipa HBV. Histološke promene bile su teže kod genotipa C (Zhao i sar. 2007.). Takođe je uočeno da je genotip C HBV praćen većim rizikom za razvoj hepatocelularnog karcinoma u Tajvanu, dok je u Kini istaknut subgenotip C2 i za njega karakteristične mutacije, kao faktor rizika za HCC (Kao i sar. 2000., Chen i sar. 2012.). Kod ispitivane populacije sa Tajvana, uočena je i veća zastupljenost genotipa B kod mlađih bolesnika (< 50 godina), u odnosu na bolesnike starije od 50 godina (Kao i sar. 2000.). Genotip C je kod bolesnika iz Kine, pored ciroze jetre, bio nezavisan faktor rizika za razvoj HCC (Chan 2004.).

I ekstrahepatične manifestacije HBV infekcije dovedene su vezu sa genotipom HBV. Tako je kod dece sa hroničnim hepatitisom B u Kini dokazano prisustvo B i C genotipova. Glomerulonefritis je bio češći kod dece inficirane genotipom C HBV (Lei i sar. 2012.).

U evropskim zemljama najčešći su genotipovi A i D. Genotip D dominira u mediteranskoj regiji, Bliskom istoku i centralnoj Aziji. Poređenjem genotipova A i D, utvrđeno je da je genotip A češće od genotipa D povezan sa višim vrednostima ALT, HBeAg pozitivnošću, odsustvom antiHBe antitela, a kod dugotrajne infekcije sa razvojem ciroze i hepatocelularnog karcinoma. (Kumar i sar. 2005.)

Postoje i autori koji iznose drugačije nalaze i navode da je genotip D uzročnik teže forme bolesti i pojave hepatocelularnog karcinoma u mlađem uzrastu od genotipa A (Thakur i sar.2002.).

Izučavan je i uticaj različitih genotipova HBV na uspeh antivirusne terapije. Razmatran je efekat antivirusne terapije interferonom kod bolesnika inficiranih



genotipovima A i D HBV. U jednoj studiji je utvrđeno je da je stabilan virusološki odgovor bio značajno češći kod genotipa A u odnosu na genotip D. Zaključeno je da su genotipovi A i D nezavisni prediktori uspeha antivirusne terapije interferonom, te da bi antivirusna terapija adaptirana prema određenom genotipu bila efikasnija (Erhardt i sar. 2005.).

Analogno tome, ispitivan je uticaj genotipova HBV na uspeh antivirusne terapije NA (Zollner i sar. 2001., Zollner i sar. 2002., Zollner i sar. 2004.). Dokazano je da HBsAg subtip adw, a samim tim i genotip A u kome se on nalazi, ima 20 puta veći rizik za nastanak rezistencije na NA od genotipa D (Zollner i sar. 2001.). Istraživanja su pokazala da bi genotip HBV mogao uticati na razvoj rezistencije, a time i na uspeh antivirusne terapije NA, jer su uočene različite mutacije YMDD motiva između HBV genotipova D and A (Mirandola i sar. 2012.).

Za razliku od hroničnog hepatitisa C, određivanje genotipova HBV nije rutinska praksa. Uprkos brojnim objavljenim studijama, čvrste veze između genotipova HBV, toka hroničnog B hepatitisa i uspeha antivirusne terapije nisu još uvek potvrđene.

### **1.6 Patogeneza hronične HBV infekcije**

S obzirom da HBV nema direktno citopatogeno dejstvo, kliničke manifestacije hroničnog hepatitisa B posledica su celularnih i humoralnih imunski-posredovanih mehanizama. Ovi mehanizmi usmereni su na prepoznavanje ciljnih antigenih virusnih epitopa HBcAg i HBsAg. Hepatociti koji ekspimiraju HBcAg bivaju prepoznati i napadnuti od strane citotoksičnih CD8+ limfocita (CTL). Liza hepatocita rezultira porastom vrednosti ALT. HBcAg senzibilizuje i CD4+ limfocite, koji takođe luče citokine koji, pored ostalog, imaju i antivirusno dejstvo, uključujući i INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Perzistentna HBV infekcija se karakteriše slabim imunskim odgovorom, zbog slabog odgovora CD4+ limfocita u ranoj fazi infekcije. To za posledicu ima razvitak kvalitativno i kvantitativno slabijeg CD8+ T ćelijskog odgovora.

Za perzistiranje infekcije, pored ostalih virusnih proteina, odgovorno je i prisustvo HBeAg. HBeAg suprimira i humoralni i celularni imunski odgovor na HBcAg. On indukuje toleranciju T limfocita, služi kao „mamac“, jer HBeAg i HBcAg dele T-ćelijski epitop. Tako HBeAg slabi dejstvo CTL na HBcAg i omogućava održavanje infekcije.

Smatra se da je prevaga Th-1 nad Th-2 citokinskim odgovorom, uz produkciju IL-2, IFN- $\alpha$  i limfotoksina (TNK-B), odgovorna za eliminaciju virusa tokom akutne i hronične HBV infekcije. Suprotno tome, za održavanje hronične infekcije odgovorna je prevaga Th-2 citokinskog odgovora, uz produkciju IL-4, IL-5 i IL-10 koji pospešuje humoralni imunski odgovor (Chisari i sar. 2010).

### **1.7 Prirodni tok hronične HBV infekcije**

Prirodni tok hronične HBV infekcije određen je interakcijom između replikacije virusa i imunskog odgovora domaćina. Postoje, naravno, i drugi faktori koju utiču na tok hronične HBV infekcije – pol, konzumiranje alkohola, imunosupresivna odnosno citostatska terapija, koinfekcije drugom virusima (HIV, HCV, HDV).

Prirodni tok HHB kod 15-20% obolelih vodi u cirozu jetre i HCC. Ishod HHB zavisi od histoloških promena u jetri u trenutku prestanka replikacije virusa. Prirodni tok hroničnog hepatitisa B se može podeliti u pet faza, koje ne moraju ići istim redosledom. Kod odraslih nije uvek prisutna imunotolerantna faza (Yim i sar. 2006., Liaw 2009.)

#### **I faza - imunotolerantna faza**

Za ovu fazu, koja traje 10-30 godina, karakteristična je visoka replikacija HBV, sa prisustvom HBeAg u serumu, visokom viremijom, noramalnim ili lako povišenim vrednostima ALT i minimalnim histološkim promena u jetri. HBeAg deluje kao faktor tolerancije, smanjuje reaktivnost T ćelija. Smatra se da do bolesti jetre ne dolazi, uprkos visokom nivou replikacije, upravo zbog imunske tolerancije na HBV (Dienstag 2008.) Ova faza infekcije je češća i duža kod osoba inficiranih rano u životu, što se tumači imunskom nekompetentnošću obolelih (Liaw 2009., Yim i sar. 2006., Hadziyannis 2011.).

#### **II faza - imunoeliminatorna, imunoaktivna faza**

Tokom ove faze dolazi do gubitka imunske tolerancije domaćina na prisustvo virusa, usled aktivacije T ćelijskog odgovora na HBeAg i HBcAg. Dolazi do skoka viremije, skoka aktivnosti ALT, uz izraženo nekroinflamatorno oštećenje jetre i brzo napredovanje fibroze. Prisutno je „talasanje“, fluktuacija aktivnosti transaminaza, uz dalje sniženje viremije, a u daljem toku i do serokonverzije tj. gubitka HBeAg u serumu i pojve antiHBe antitela (Hadziyannis 2011.). U poređenju sa genotipovima A i B, bolesnici sa genotipovima C i D imaju niže stope i odloženu sponatnu HBeAg

serokonverziju (Liu i sar. 2013.). Ova faza traje od nekoliko nedelja do nekoliko godina (Fattovich i sar. 2008.).

#### III faza -inaktivna faza, nereplikativna, integrativna faza

Ovu fazu karakteriše neprogresivna bolest jetre, uz prisustvo HBsAg, HBeAg negativnost i antiHBe pozitivnost, uredna aktivnost transaminaza i niska viremija (HBV DNK < 2000 IU/ml). Ova faza je dugoročno povoljna za bolesnika, a rezultat je imunske kontrole infekcije (Wong i sar. 2013.). Poznata je i kao faza „zdravog vironoštva“ ili „inaktivno HBsAg nosilaštvo“. Kod bolesnika kod kojih je do serokonverzije došlo kasno, nakon puno godina hroničnog hepatitisa, postoji rizik da se razvije ciroza jetre. Zbog rizika od relapsa bolesti, sa mogućim vraćanjem HBeAg, i potencijalnog razvoja ciroze, neophodno je kontinuirano praćenje ovih bolesnika (Liaw 2009.) Kod genotipa C učestalost relapsa bila je niska, ako se serokonverzija dešavala pre 30. godine, a značajno viša kod bolesnika kod kojih se serokonverzija dešavala posle 40. godine.

#### IV faza –HBeAg-negativni hronični hepatitis

Kod 1-5% bolesnika, nakon HBeAg/antiHBe serokonverzije, replikacija virusa perzistira, uz biohemijske i patohistološke znake aktivne hronične infekcije. Javljaju se povremene reaktivacije bolesti, praćenje fluktuacijom viremije i aktivnosti serumskih transaminaza. Radi se o aktivnoj bolesti jetre sa visokim rizikom od progresije fibroze i pojave ciroze i HCC. Kod ovih bolesnika je neophodno pažljivo praćenje, uz redovne ultrazvučne kontrole i određivanje alfa fetoproteina zbog moguće pojave HCC. Ovo je najčešći tip HHB u zemljama Mediterana (Hadziyannis 2011., Delić 2012.).

#### V faza – HBsAg negativna faza

Posle gubitka HBsAg, HBV DNK se ne detektuje u krvi, a prisutna su antiHBc antitela, sa ili bez antiHBs antitela. Nizak nivo replikacije perzistira u jetri, gde se HBV DNK može detektovati. Ova faza je vezana za manji rizik od nastavka ciroze jetre i HCC (Pan i sar. 2005.). Postoji rizik od reaktivacije HBV infekcije, pod dejstvom imunosupresivne hemioterapije (Lok i sar. 2012., Zachou i sar. 2013.).

### **1.8 Kliničke karakteristike hronične HBV infekcije**

90% inficiranih perinatalno, 20-50% inficiranih između prve i pete godine i do 5% inficiranih u odrasлом dobu, razvije hronični B hepatitis (Ganem 2004, McMahon 1985.).

Većina bolesnika je bez simptoma, a neki mogu imati nespecifične tegobe, kao što malaksalost, brzo zamaranje, slabiji apetit. Simptomi se javljaju uglavnom kod progresije bolesti u cirozu. Simptomi mogu poticati i od ekstrahepatičnih manifestacije hronične HBV infekcije (polyarteritis nodosa, nefropatija/glomerulonefritis). Izuzev manje ili više izražene hepatomegalije, fizikalni nalaz je uglavnom uredan, a kod uznapredovale bolesti jetre vide se splenomegalija, spider naevusi, caput medusae, palmarni eritem, ginekomastija, atrofija testisa... Kod bolesnika sa dekompenzovanom cirozom jetre prisutni su ascites, ikterus, periferni edemi, encefalopatija, znaci hemoragijskog sindroma (Delić 2012.). Pored HBsAg pozitivnosti duže od 6 meseci, odgovarajućih histoloških promena, prisutna je i intermitentno ili perzistentno, lako do umereno povišena aktivnost serumskih transaminaza (AST i ALT). Na osnovu HBeAg/antiHBe statusa razlikuju se HBeAg pozitivni i HBeAg negativni HHB.

#### 1.8.1 HBeAg-pozitivan hronični hepatitis

Tok HBeAg-pozitivnog hepatitisa određen je starošću bolesnika u trenutku infekcije. Kod bolesnika inficiranih perinatalno, imunotelarantna faza traje dugo, 10-30 godina, posle čega dolazi do razvoja srednje teškog ili teškog hroničnog hepatitisa. Kod osoba koje su inficirane kasnije u životu, posle znatno kraćeg vremena razvijaju srednje težak do težak hronični hepatitis. Prestanak imunotorelantne faze ogleda se u skoku aktivnosti ALT i pogoršanju histološkog nalaza, zbog pokretanja snažnog HBV specifičnog imunskog odgovora. U daljem toku dolazi do serokonverzije HBeAg u antiHBe, normalizacije ALT i pada viremije. Godišnja stopa spontane serokonverzije je 3-12%, odnosno nakon 5-10 godina od momenta nastanka infekcije desiće se kod 50-70% bolesnika. Prediktivni faktori za sponatnu serokonverziju su starije životno doba, ženski pol, visoka aktivnosti serumskih transaminaza.

Sledi faza “inaktivnog HBsAg nosilaštva”, sa nalazom HBsAg, antiHBe antitela, urednom aktivnošću ALT, nemerljivom viremijom, bez fibroze u hiostološkom nalazu ili sa minimalnom fibrozom. Kod nekih bolesnika višegodišenju nemerljivu viremiju sledi serokonverzija HBsAg u antiHBs antitela (1-2% u zapadnoevropskim zemljama, samo 0,05-0,08% u endemskim krajevima na godišnjem nivou) (Liaw i sar. 1991.). Istraživanja govore da trogodišnji ubrazan pad koncentracije HBsAg, prethodi gubitku HBsAg (Chen i sar. 2012.)

U ovoj grupi “zdravih” nosilaca virusa može doći do reaktivacije u 20-30% slučajeva. Do reaktivacije dolazi usled koinfekcije sa drugim hepatotropnim virusima (HCV, HDV) ili usled drugih uzroka (alkohol, hepatotoksični lekovi...).

Kod male grupe bolesnika (1-5%) nakon HBeAg/antiHBe serokonverzije, replikacija ipak perzistira, uz biohemijske i histološke znake hronične infekcije. To je grupa bolesnika sa HBeAg-negativnim hepatitisom.

#### 1.8.2 HBeAg-negativan hronični hepatitis

Za HBeAg-negativan hepatitis karakteristično je prisustvo HBsAg, antiHBe antitela, detektibilna viremija, povišena aktivnost serumskih transaminaza, znaci nekroinflammacije i fibroze u tkivu jetre. To su najčešće muškarci, u starijem životnom dobu. Tok bolesti je nestabilan sa “talasanjem” aktivnosti serumskih transaminaza i niova HBV DNK (Lok i sar. 2007., Delić 2012.).

#### 1.8.3 Dugoročne posledice hronične HBV infekcije - ciroza jetre i hepatocelularni karcinom

Nakon postavljanja dijagnoze hroničnog B hepatitisa procenjeno petogodišnje preživljavanje za sve bolesnike je 100%. Hiroza jetre i HCC su dugoročne posledice HHB koje značajno povećavaju morbiditet i mortalitet ovih bolesnika. Procenjuje se da je su petogodišnje stope progresije:

- 10-20%, iz hroničnog hepatitisa u cirozu jetre;
- 20-30%, iz kompenzovane ciroze u dekompenzovanu
- 5-15%, iz kompenzovane ciroze u HCC (Fattovich i sar. 2008.)

Stopa petogodišnjeg preživljavanja je 85% za obolele sa kompenzovanom cirozom. Kod dekompenzovane ciroze stopa jednogodišnjeg preživaljvanja je 55-70%, a petogodišnjeg samo 15-35% (Fattovich i sar. 2008.).

Kod nelečenih bolesnika sa HBeAg pozitivnim HHB, petogodišnja kumulativna incidenca ciroze je 8% to 20% (Fattovich 2003.). Kod HBeAg negativnog hepatitisa stopa ciroze je viša. Stariji uzrast i perzistentna virusna replikacija prediktori su progresije HHB u cirozu, ali i smrtnog ishoda (Pan i sar. 2005.). Istraživanja iz Azije ukazuju da je genotip C nosi veći rizik za razvoj ciroze od genotipa B (Kao i sar. 2000.). Posebno se ističe uloga subgenotipa C2 u pojavi ciroze jetre. (Chen i sar. 2012.) Visoka viremija ( $\geq 1,000,000$  copies/mL) direktno je uticala na razvoj ciroze tajvanskih bolesnika (Chen i sar. 2011.). Kada se ciroza uspostavi, vremenom će doći do dekompenzacije. U

EUROHEP kohortnoj studiji, petogodišnja kumulativna incidenca hepatične dekompenzacije bila je 16%, sa srednjim intervalom između dijagnoze ciroze i prve epizode dekompenzacije 31 mesec (od 6-109) (Fatovich i sar. 2002.). Nakon dekompenzacije petogodišnje preživljavanje drastično opada na samo 15-35% (Fattovich i sar. 2008.).

HCC je, pored insuficijencije jetre, glavni uzrok smrti bolesnika sa hroničnom HBV infekcijom. Različiti faktori vezani i za domaćina i za virus utiču na razvoj HCC (muški pol, stariji uzrast, perzistentna viremija, HBeAg pozitivnost, ciroza...) (Pan i sar. 2005.). Slično pojavi ciroze, razvoj HCC se vezuje za visoku viremiju i genotip C (Chan i sar. 2004., Chen i sar. 2011., Chen i sar. 2012.). Subgenotip C2 je faktor rizika za razvoj HCC (Chen i sar. 2012.). Genotip C je uzročnik HCC kod bolesnika starijih od 50 godina, dok genotip B odn. subgenotip B2 nosi rizik za razvoj karcinoma jetre kod mlađih bolesnika, bez prethodne pojave ciroze jetre (Ni i sar. 2004., Yu i sar. 2005., Yin i sar. 2008.). Na pojavu ciroze i HCC utiču i drugi faktori koji ovde nisu razmatrani (HDV i HCV koinfekcija, zloupotreba alkohola, aflatoksin u ishrani).

### **1.9 Patohistološke promene u jetri u toku hronične HBV infekcije**

Osnovne histološke promene kod svih hroničnih hepatitisa, pa i HHB, su različiti stepeni hronične inflamacije i fibroze portalnog trakta.

Inflamatorne promene zahvataju portne prostore, graničnu ploču i lobuluse (tzv. "interface" hepatitis, nazvan tako jer inflamatorni infiltrat zahvata prostore između portalnog trakta sa jedne strane i parenhima sa destrukcijom hepatocita sa druge strane). Inflamatorni infiltrat se sastoji od limfocita, plazma ćelija i antigen-prezentujućih ćelija, nalazi se u portnim prostorima i acinusu. Zapaljenski infiltrat može biti prisutan sa ili bez hepatocelularne nekroze.

Fibroza portalnog trakta može progredirati do ciroze. Fibrozu karakteriše gubitak hepatocita, razaranje hepatičke mikroarhitekture, proliferacija fibroblasta i deponovanje ekstracelularnog matriksa (Friedman 2008.) Ključni momenat u nastanku fibroze je aktivacija i proloferacija stelatnih ćelija, koje postaju kontraktilne, produkuju ekstracelularni matriks i sekretuju proinflamatorne citokine i hemokine poput transformišućeg faktora rasta  $\beta$  (Friedman 2008.)

Posebnu karakteristiku hroničnog hepatitisa B predstavljaju “ground glass” ćelije. To su hepatociti karakterističnog izgleda koji potiče od prisustva HBsAg u ER. ER je hipertrofičan, a druge organele su potisnute uz ćelijsku membranu. “Ground glass” hepatociti obojeni hematoksilinom i eozinom, izgledaju veliki, sa eozinofilnom citoplazmom, koja podseća na matirano staklo (Wang i sar. 2003.). Postoji obrnuta korelacija između broja “ground glass” hepatocita i nekroinflamatorne aktivnosti (Thung 2006.). “Ground glass” hepatociti se viđaju često tokom imunotolerantne faze HHB, u toku inaktivne bolesti. U toki imunoaktivne faze dešava se oštećenje hepatocita od strane CTL, a “ground glass” ćelije su retke. Sreću se promene arhitektonike, nekroinflamatorne promene tipa umerene i teške portne nekroze i interface hepatitisa. Dolazi do nastanka fibroze, a moguća je i pojava ćelijske displazije. Displazija može voditi u cirozu i HCC. Zato je u ovoj fazi bitna primena antivirusne terapije da bi se srećila dalja progresija bolesti.

### **1.10 Terapija hronične HBV infekcije**

U najvećem broju slučajeva HHB je asimptomatska bolest, a cilj antivirusne terapije je prevencija evolucije hronične infekcije u simptomatsku bolest, koja je udružena sa razvojem ciroze i HCC. Kod bolesnika sa simptomatskom formom bolesti, cilj terapije je produžetak preživljavanja i odlaganje najtežih komplikacija – ciroze jetre i HCC. Antivirusna terapija bolesnika sa HHB, u idealnom slučaju, ima za cilj eliminaciju virusne replikacije. Daleko je realnije postići smanjenje virusne replikacije i uspostavljanje stabilne imunske kontrole (SIK). Stabilna imunska kontrola se postiže ako se ispune sledeći uslovi:

- HBeAg/antiHBe serokonverzija (gubitak HBeAg i pojava antiHBe antitela),
- viremija ispod 2000 IU/ml (< 10000 kopija/ml) HBV DNK
- uredne vrednosti serumskih transaminaza.

Ciljevi terapije su gubitak virusnih markera replikacije (HBeAg i HBV DNK), normalizacija aktivnosti ALT i poboljšanje histopatološkog nalaza, kako za HBeAg pozitivni, tako i HBeAg negativni HHB. Kompletno izlečenje sa gubitkom HBsAg je izuzetno retko. Spontani gubitak HBsAg dešava se kod samo 0,5-1,7% inficiranih tokom jednogodišnjeg praćenja (EASL 2012, Delić 2012.).

Pri izboru terapije neophodna je preterapijska procena oboljenja jetre: određivanje biohemijskih analiza (bilirubin, AST, ALT, protrombinsko vreme, albumini, krvna slika, gama-gutamil transpeptidaza, alkalna fosfataza), detekcija HBV DNK i određivanje njenog nivoa, ultrazvučni pregled, biopsija jetre radi procene stepena fibroze i nekroinflamacije. U slučaju da je biopsija kontraindikovana može se raditi elastografija. Neophodno je isključiti koinfekciju drugim virusima (HIV, HCV, HDV), alkoholnu, autoimune i metaboličke bolesti jetre.

Trenutno postoje dve strategije lečenja i HBeAg pozitivnog i HBeAg negativnog hepatitisa: terapija jasno definisanog, ograničenog trajanja, interferonom- $\alpha$ , tj. pegilovanim interferonom- $\alpha$  i dugotrajna terapija nukleozidnim ili nukleotidnim analogima (NA) (EASL 2012.).

Glavna teorijska i praktična prednost interferona- $\alpha$  (konvencionalnog ili pegilovanog) je odsustvo rezistencije i šansa za gubitak HBsAg kod bolesnika koji održavaju nimerljivu viremiju. Česta neželjena dejstva i potkožne injekcije glavni su nedostatak terapije. Kontraindikacije su dekompezovana ciroza jetre, prethodno postojeće preegzistentne autoimune bolesti, teška depresija, psihoza itd.

	(PEG-) IFN	NA
prednosti	<ul style="list-style-type: none"> <li>• definisano trajanje terapije</li> <li>• nema rezistancije</li> <li>• viša stopa anti-HBe i anti-HBs serokonverzije uz 12 mesečnu terapiju</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• potentan antivirusni efekat</li> <li>• dobra tolerancija</li> <li>• oralna administracija</li> </ul>
Mane	<ul style="list-style-type: none"> <li>• umeren antivirusni efekat</li> <li>• slabija tolerancija</li> <li>• rizik od neželjnih efekata</li> <li>• subkutane injekcije</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dugotrajna terapija</li> <li>• rizik od rezistencije</li> <li>• nepoznata sigurnost pri dugotrajnoj upotrebi</li> </ul>

Tabela 2. Prednosti i nedostaci terapije interferonom i NA

(preuzeto iz Mauss – Berg – Rockstroh – Sarrazin – Wedemeyer, Hepatology 2012. Third Edition)

Veliki napredak u lečenju HHB desio se usled pronalaska antiretrovirusnih lekova (NA) za terapiju HIV infekcije. Kako oba virusa u životnom ciklusu koriste reverznu transkriptazu, otvorile su nove mogućnosti za lečenje HHB. NA imaju strukturu sličnu prirodnim nukleotidima, ali sa modifikacijom u šećernim ili baznim grupama. Tako se nadmeću sa prirodnim nukleotidima u vezivanju za reverznu transkriptazu. Nukleozidni analozi su lamivudin, telbivudin, emtricitabin, entecavir, a nukleotidni analozi su adefovir i tenofovir. Za nukleozidne analoge je neophodna intracelularna fosforilacija da bi se



postigao antivirusni efekat, dok za dejstvo nukleotidnih analoga nije potreban ovaj proces. NA inhibiraju DNK polimerazu ili direktnom ugradnjom u toku replikacije virusne DNK čime blokiraju elongaciju virusne DNK ili ireverzibilnim blokiranjem reverzne transkriptaze.

Lamivudin (epivir, 3TC) je nukleozidni analog koji zaustavlja sintezu DNK lanca u toku replikacije virusa. Da bi prešao u aktivni oblik, lamivudin mora da se fosforiliše u trifosfat. U takvoj formi ulazi u kompeticiju sa prirodnim nukleotidima, sprečava njihovu ugradnju i elongaciju DNK lanca. Lamivudin ne deluje na cccDNK u hepatocitima, što omogućava održavanje rezidualne viremije (Delić 2012.).

Lek se uzima oralno u dozi od 100 mg, brzo se resorbuje, a bioraspoloživost mu je 80%. Poluživot lamivudina u hepatocitima je 17-19h. Izlučuje se u nepromenjenom obliku urinom, dozu treba smanjiti ako je klirens kreatinina <50ml/min. Lek prolazi placentu, koncentracije u krvi novorođenjčeta i krvi majke su slične.

Indikacije za primenu lamivudina su:

- bolesnici HBsAg pozitivni duže od šest meseci
- bolesnici sa dokazanom viremijom, HBeAg pozitivni, bar 3-6 meseci pre početka terapije, ali i HBeAg negativni, odnosno antiHBe pozitivni duže od 6 meseci
- bolesnici sa povišenom aktivnošću ALT
- bolesnici sa histopatološkom verifikacijom hroničnog agresivnog hepatitisa, 6 -12 meseci pre početka terapije.

Efikasnost terapije lamivudinom je nesumnjiva, dokazana u brojnim studijama (Lai i sar. 1998., Koh i sar. 2007., Kawaoka i sar. 2007.). Nakon godinu dana terapije ovim lekom u dozi od 100mg dnevno, kod HBeAg pozitivnih bolesnika, dolazi do redukcije HBV DNK kod 44%, HBeAg serokonverzije kod 17%, normalizacije ALT u 41% i histološkog poboljšanja kod 52% bolesnika. Ovako doziranje leka pokazalo se superiorno u odnosu na dozu od 25 mg lamivudina i placebo (Lai i sar. 1998.). Dokazano je da se lek dobro toleriše i tokom višegodišnje terapije (Chang i sar. 2004.). Duža terapija lamivudinom, vodi većem terapijskom uspehu ovim lekom: uspešnost lečenja bila je 71.4%, 39.0% i 25.6%, za terapiju >18 meseci, 12-18 meseci i <12 meseci (Dai i sar. 2013.).

Činjenica je da je HBeAg serokonverzija bolesnika nastala pod dejstvom NA reverzibilna, te se savetuje dugotrajni nastavak terapije nakon HBeAg serokonverzije

(Reijnders i sar. 2010.). Više različitih studija govori da terapija NA može biti prekinuta 12 meseci nakon antiHBe serokonverzije, a kod 40-80% bolesnika se očekuje da održe serokonverziju. Kod ostalih može biti potrebno ponovno lečenje, jer ne uspevaju da održe serološki i/ili virusološki odgovor (EASL 2012.).

Iako se lamivudin zbog oralne primene i niske cene dosta upotrebljava u terapiji HBeAg pozitivnog i HBeAg negativnog HHB kao lek prvog izbora, pojava visoke stope rezistencije nakon višegodišnje upotrebe (24% nakon godinu dana terapije, 41% nakon 2 godine, 53% nakon 3 godine i preko 70% nakon 4 godine), dovodi u pitanje njegovu poziciju leka prve linije, u formi monoterapije (Lai i sar. 2003.). Zato je još od 2007. godine lamivudin izgubio mesto leka prvog izbora u terapiji HHB (Lok i sar. 2007.), te se savetuje započinjanje terapije entekavirom ili tenofovirom, zbog niže incidence rezistencije. Na razvoj rezistencije, pored ostalog, može uticati i genotip HBV. Stopa M204I mutanata je bila značajno viša kod genaotipa D (67%), nego kod genotipa A (19%), za razliku od rtM204V mutacija koje su se kod genotipa A javile u 81%, a genotipa D u 40% slučajeva (Zollner i sar. 2004.)

Neželjeni efekti lamivudina vezani su za mitohondrijalnu toksičnost, koja se klinički ispoljava neuropatijom, miopatijom, pankreatitisom, laktičnom acidozom ili hepatičkom dekompenzacijom.

Nakon prekida terapije moguć je relaps bolesti zbog neeradikarne infekcije, prisustva cccDNK u hepatocitima i ekstrahepatične replikacije virusa.

Teratogeni efekat lamivudina nije dokazan. Lek je korišćen u poznoj trudnoći za prevenciju vertikalne transmisije infekcije (Shi i sar. 2010.). Pokazalo da je lek bezbedan za terapiju žena u ranoj trudnoći, kao i tokom cele trudnoće (Yi i sar. 2012. ).

U slučajevima kada se terapija započinje lamivudnom, kao u našoj zemlji, EASL preporuke za dalje lečenje, nakon pojave rezistencije, su sledeće:

- Rezistenicija na lamivudin: preći na tenofovir (ili dodati adefovir ukoliko tenofovir nije dostupan)

- Rezistencija na adefovir: ukoliko bolesnik nije lečen NA pre adefovira, preći na entekavir ili tenofovir; entekavir je poželjniji kod bolesnika sa viskom viremijom. Ukoliko je prethodno neuspešno lečen lamivudinom, preći na tenofovir i dodati nukleozidni analog
- Rezistencija na telbivudin: preći ili dodati tenofovir (dodati adefovir ukoliko tenofovir nije dostupan)
- Rezistencija na entekavir: preći ili dodati tenofovir (dodati adefovir ukoliko tenofovir nije dostupan)
- Rezistencija na tenofovir: rezistencija na ovaj lek do sada nije zabeležena, te ne postoji iskustvo u lečenju takvih bolesnika, ali se smatra da treba dodati entekavir, telbivudin, lamivudin ili emtrisitabin. Kod bolesnika koji prethodno nisu lečeni lamivudinom, može se preći na entekavir, dok kod bolesnika kod kojih se razvila rezistencija na lamivudin treba dodati entekavir.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

- Ispitati povezanost genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova HBV i težine kliničke slike obolelih od hroničnog hepatitisa B
- Utvrditi povezanost genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova HBV sa patohistološkim nalazom tkiva jetre kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom B (stepen aktivnosti hepatitisa i stepen fibroze).
- Ispitati uticaj genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova HBV na progresiju u cirozu jetre i hepatocelularni karcinom.

### **Radna hipoteza**

- Kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom B inficiranih različitim genotipovima HBV, subgenotipovima i subtipovima HBsAg, postoji razlika u toku bolesti, patohistološkom nalazu i ishodu hronične HBV infekcije.

### **3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA**

Istraživanje neophodno za izradu ove doktorske teze obavljeno je po tipu prospektivne studije koja je sprovedena u cilju analize kliničkih i epidemioloških uticaja genotipova HBV, subgenotipova i HBsAg subtipova na klinički tok, patohistološki nalaz i ishod hronične hepatitis B virusne infekcije.

#### **3.1 Ispitanici**

Kohortu su činila 162 bolesnika obolela od hroničnog B hepatitisa, koji su lečeni u periodu od 2000-2012. godine u Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije. Među ispitanicima je bilo 126 (77.8%) muškaraca i 36 (22.2%) žena, prosečne starosti  $41.7 \pm 14.2$  godina. Dijagnoza hronične HBV infekcije postavljena je na osnovu kliničke prezentacije, biohemijskih nalaza, virusoloških markera infekcije i patohistoloških promena u tkivu jetre. Kriterijumi za uključivanje bili su HBsAg pozitivnost duža od 6 meseci (od 1-23 godine), dopunska serološka (HBeAg, anti-HBe antitela, anti-HBc antitela), klinička i histološka potvrda hronične HBV infekcije, potom potvrđen genotip, subgenotip i HBsAg subtip, kao i redovno praćenje toka bolesti u određenim vremenskim intervalima. To je podrazumevalo redovnu kontrolu hematoloških, biohemijskih i virusoloških parametara pre uvođenja antivirusne terapije, kao i tokom lečenja lamivudinom. Ispitanici prethodno nisu bili lečeni antivirusnom terapijom (interferonom, nukleozidnim i nukleotidnim analogima), što je, takođe, bio jedan od kriterijuma za uključivanje u ovo istraživanje. Kod bolesnika su serološkim tehnikama (ELISA), isključena je HIV, HCV i HDV koinfekcija. Iz ispitivanja su isključeni bolesnici sa autoimunim, metaboličkim i alkoholnom bolešću jetre, kako bi se eliminsao uticaj ovih komorbiditeta na prirodni tok hronične HBV infekcije.

Od svih bolesnika uključenih u ovo istraživanje dobijen je pristanak za učešće u kliničkoj studiji, koja je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, (odluka br. 29/VI-12, izdata 20. juna 2012. godine).

#### **3.2 Klinički podaci**

Osnovni parametri praćeni tokom ovog istraživanja bili su:

- demografske karakteristike bolesnika: pol, uzrast, pretpostavljen put transmisije HBV infekcije, vreme nastanka infekcije i dužina trajanja infekcije

- biohemijski parametri: transaminaze, bilirubin, protrombinsko vreme, albumini
- histološke karakteristike tkiva jetre obolelih
- uspeh antivirusne terapije
- progresija bolesti u terminalnu fazu tj. cirozu jetre i HCC

Neophodne serološke analize (HBsAg, HBeAg, antiHBe, antiHIV, antiHCV i antiHDV antitela) i nivoi viremije (HBV DNK) rađeni su u Virusološkoj laboratoriji Mikrobiološke službe Kliničkog centra Srbije i u Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Korišćeni su komercijalni testovi, od seroloških tehnika primenjena je ELISA, rađena je i reakcija lančane polimerizacije (PCR).

U Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu od 2006-2008. godine određeni su genotipovi, subgenotipovi i HBsAg subtipovi (Lazarević 2008.).

U cilju patohistološke verifikacije bolesti, kod 141 ispitanika rađena je slepa, aspiraciona biopsija jetre, u periodu od 2000-2006. godine. Kod bolesnika sa dekompenzovanom cirozom jetre, kao inicijalnom prezentacijom bolesti, biopsija jetre nije rađena zbog rizika od krvarenja. Biopsija nije rađena ni ispitanicima kod kojih je ultrazvučno verifikovano prisustvo hemangioma u desnom lobusu jetre, kao ni kod bolesnika koji su odbili intervenciju. Patohistološka ispitivanja tkiva dobijenog slepom, aspiracionom biopsijom jetre, rađena su u Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Histološka dijagnoza hepatitisa izražena je stepenom aktivnosti, tj. jačinom nekroinflamatornog procesa u jetri i stadijumom bolesti zasnovanom na proceni stepena fibroze u tkivu jetre. Određivanje stepena fibroze i nekroinflamatorne aktivnosti vršeno je bodovanjem prema Išakovom indeksu (Goodman 2007.). Išakov sistem bodovanja, poznat i kao „Modifikovani indeks histološke aktivnosti (HIA)“ senzitivan je za detekciju fibroze više od originalog HIA, te se zato često koristi u kliničkim istraživanjima. Stadijum fibroze se obeležava se brojevima od 0-6 (umesto 0-4).

Tabela 3. Nekroinflamatorna aktivnost prema Iškakovom sistemu bodovanja

skor	aktivnost
1-4	<u>minimalna</u> (fokalna nekroza, nekoliko portnih rostora)
5-8	<u>blaga</u> (fokalna nekroza, većina portnih prostora)
9-12	<u>umerena</u> (nekroza <50% okolnih portnih prostora)
13-18	<u>izražena</u> (nekroza >50% okolnih portnih prostora)

Tabela 4. Stepen fibroze prema Iškakovom sistemu bodovanja

0	bez fibroze
1	fibroza nekoliko portnih prostora sa ili bez kratkih fibroznih traka
2	fibroza većine portnih prostora sa ili bez kratkih fibroznih traka
3	fibroza većine portnih prostora sa povremenom porto-portnom fibrozom ("bridging")
4	fibroza portnih prostora sa izraženim portno-portnim i portno-centralnim "bridging"-om
5	izražen "bridging" (portno-portni i portno-centralni) sa povremenim nodulusima (nekompletna ciroza)
6	ciroza (moguća ili definitivna)

Od vremena postavljanja dijagnoze hroničnog B hepatitisa do oktobra 2012., kod ispitivanih bolesnika su bili praćeni aktivnost serumskih transaminaza, vrednosti bilirubina, protrombinskog vremena i serumskih albumina u intervalima od 3 meseca, (najkraće tokom 12 meseci) pre započinjanja antivirusne terapije. Pomenuti biohemijski parametri bili su praćeni i tokom lećenja lamivudinom u cilju procene efikasnosti antivirusne terapije. Sve navedene biohemijske analize izvođene su standradnim laboratorijskim metodama.

### 3.3 Indikacije za terapiju lamivudnom

Antivirusna terapija sprovedena je nukleزيدnim inhibitorom reverzne transkriptaze, lamivudinom u standardnoj dozi od 100 mg peroralno dnevno. Lamivudin



je sintetski nukleozidni analog. Intracelularno se fosforiliše u aktivni 5'-trifosfatni metabolit, lamivudin - trifosfat, 3TC-TP. Trifosfatni oblik je potentni inhibitor DNK polimeraze-reverzne transkriptaze HBV i dovodi do prevremenog prekida sinteze lanca virusne DNK. 3TC-TP je slab inhibitor  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -DNK polimeraze sisara.

Antivirusna terapija lamivudinom sprovedena je kod 85 bolesnika koji su ispunili kriterijume za terapiju ovim lekom, prema važećim preporukama Evropske asocijacije za izučavanje jetre (EASL). Kriterijumi za sprovođenje antivirusne terapije lamivudinom ne razlikuju se značajno za HBeAg pozitivan i HBeAg negativan hronični hepatitis. Odluka o sprovođenju terapije ovim nukleozidnim inhibitorom reverzne transkriptaze, bazira se na kombinaciji sledećih kriterijuma:

- vrednosti HBV DNK u serumu,
- vrednosti serumskih transaminaza i
- težini bolesti jetre (histološki gradus i stadijum fibroze).

Kriterijume za antivirusnu terapiju ispunjavali su bolesnici sa aktivnim hroničnim hepatitisom, kod kojih je HBV DNK bila iznad 2000 IU/ml (10.000 kopija/ml), aktivnost serumskih transaminaza iznad normalnih vrednosti, a patohistološkim pregledom tkiva jetre nađena umerena do teška nekroinflamatorna aktivnost, i/ili bar umerena fibroza. Kod bolesnika sa vrednostima HBV DNK iznad 2000 IU/ml i sa navednih patohistološkim promenama u tkivu jetre, terapija je sprovedena čak i ako je aktivnost serumskih transaminaza bila normalna. Indikacije za lečenje su bile i godine, zdravstveno stanje, podatak o cirozi jetre ili HCC u porodičnoj anamnezi, kao i pojava ekstrahepatičnih manifestacija bolesti.

Kod bolesnika sa dvostruko povišenom aktivnošću serumskih transaminaza i vrednostima HBV DNK iznad 20.000 IU/ml, terapija je bila indikovana nezavisno od patohistološkog nalaza tkiva jetre.

Bolesnici sa kompenzovanom cirozom i detektibilnom HBV DNK lečeni su obavezno, čak i u slučaju normalne aktivnosti serumskih transaminaza. Terapija nukleotidnim/nukleozidnim analogima bila je obavezna kod bolesnika sa dekompenzovanom cirozom i detektibilnom HBV DNK.

Lečenje lamivudinom nije bilo indikovano kod HBeAg pozitivnih bolesnika, sa visokim vrednostima HBV DNK i normalnom serumskom aktivnošću transaminaza, sa minimalnom nekroinflamacijom ili bez nje, bez fibroze, u tzv. imunotolerantnoj fazi

hroničnog hepatitisa B. Ovi bolesnici su redovno praćeni na 3 – 6 meseci. Lećenje nije bilo indikovano ni kod „inaktivnih HBsAg nosilaca“, sa nedetektibilnom HBV DNA u serumu, normalnim vrednostima serumskih transaminaza i normalnim patohistološkim nalazom u tkivu jetre. I ova grupa bolesnika je praćena na 3 - 6 meseci.

### **3.4 Ishod antivirusne terapije**

Prema aktuelnim EASL preporukama, terapijski odgovor se može podeliti na biohemijski, serološki, virusološki i histološki, a svaki od aspekata terapijskog odgovora može se određivati u više razlićitih vremena. Cilj terapije je eliminacija virusne replikacije kod HHB i sprećavanje razvoja ciroze jetre i HCC. Mnogo realniji cilj predstavlja suzbijanje virusne replikacije i uspostavljanje stabilne imunske kontrole (HBeAg/antiHBe serokonverzija, HBV DNK < 2000 IU/ml, aktivnost ALT u referentnih granicama).

Biohemijski odgovor se definiše kao normalizacija vrednosti serumskih transaminaza, a može se određivati tokom, na kraju terapije i nakon završetka terapije. Serološki odgovor za HBeAg se odnosi samo na HBeAg pozitivne bolesnike i definiše se kao HBeAg/antiHBe serokonvezija. Serološki odgovor za HBsAg definiše se za sve bolesnike, nezavisno od HBeAg statusa, kao gubitak HBsAg i pojava antiHBs antitela.

Virusološki proboj se definiše kao povećanje vrednosti HBV DNK za više od 1 log<sub>10</sub> IU/ml, u poređenju na najnižim vrednostima HBV DNK tokom terapije. Virusološki proboj prethodi biohemijском proboju, koji se karakteriše pojavom viših vrednosti ALT. Glavni razlozi za pojavu virusološkog proboja su neredovno uzimanje leka i/ili selekcija rezistentnih sojeva HBV.

Uspeh antivirusne terapije ovim nukleozidnim inhibitorom reverezne transkriptaze, definisan je kao pojava remisije aktivnosti hepatitisa (nedetektibilna HBV DNK, uz urednu aktivnost serumskih transaminaza). Neuspeh terapije lamivudinom definisan je kao razvoj klinićkih pokazatelja mogućeg virusološkog neuspeha zbog rezistencije HBV na lamivudin, sa mogućim, posledićnim razvojem komplikacija hroniće HBV infekcije – dekompenzovane ciroze jetre i hepatocelularnog karcionoma.

### 3.5 Statistička obrada podataka

Prva faza statističke obrade rezultata podrazumevala je formiranje baze podataka sa podacima za sve ispitanike.

Sve statističke analize rađene su korišćenjem elektronske baze podataka organizovane u statističkom softsferskom paketu SPSS (verzija 11.5). Ispitanici su klasifikovani prema polu, uzrastu, genotipu, subgenotipu i HBsAg subtipu, kliničkim i histološkim kriterijumima, zatim prema antivirusnoj terapiji, a potom i prema uspešnosti lečenja. Od deskriptivnih statističkih parametara za analizirana obeležja izračunate su aritmetička sredina ( $\bar{X}$ ) sa merama disperzije: standardna devijacija (SD), standardna greška (SE), medijana i mod. Aktivnost serumskih transaminaza, nivo bilirubinemije, stepen viremije poređen je analizom varijanse („one way ANOVA“). Neparametrijske varijable (klinički, odnosno histološki parametri) analizirane su Hi-kvadratnim i/ili Fisherovim testom. Uspešnosti antivirusne terapije, vreme do pojave dekompenzacije ciroze jetre, hepatocelularnog karcinoma, preživljavanje, njihova moguća povezanost sa kliničko-laboratorijskim početnim vrednostima, vrednostima tokom lečenja i drugim relevantnim varijablama, procenjivani su univarijantnom i multivarijantnom logitičkom regresijom i Kaplan-Mejerovom metodom. Rezultati su prikazani kao OR („odds ratio“) sa 95% intervalom poverenja (95% CI). Nivo značajnosti je 0.05.

## 4. REZULTATI

U ispitivanje je uključeno 126 (77.8%) bolesnika muškog pola i 36 (22.2%) bolesnika ženskog pola. Prosečna starost bolesnika iznosi  $41,7 \pm 14,2$  godina. Najmlađi bolesnik u studiji imao je 14 godina, dok je nastariji bolesnik imao 76 godina. Dominirao je genotip D koji je potvrđen kod 139 (85,8%) bolesnika, u odnosu na genotip A kojim su bila inficirana 23 (14,2%) bolesnika. Svi bolesnici sa genotipom A, imali su subgenotip A2. Kod bolesnika sa genotipom D, potvrđena su tri subgenotipa: D1 kod 14 (8,6%) bolesnika, D2 kod 47 (29%) bolesnika i najzastupljeniji D3 kod 78 (48,1%) bolesnika. Kod 158 (97,5%) ispitanika određeni su HBsAg subtipovi: *adw2* (14,5%), *ayw2* (50%), *ayw3* (34,2%), *ayw4* (1,3%). Na početku praćenja srednje vreme trajanja HBV infekcije bilo je  $9,7 \pm 8,6$  (od 1-28 godina).

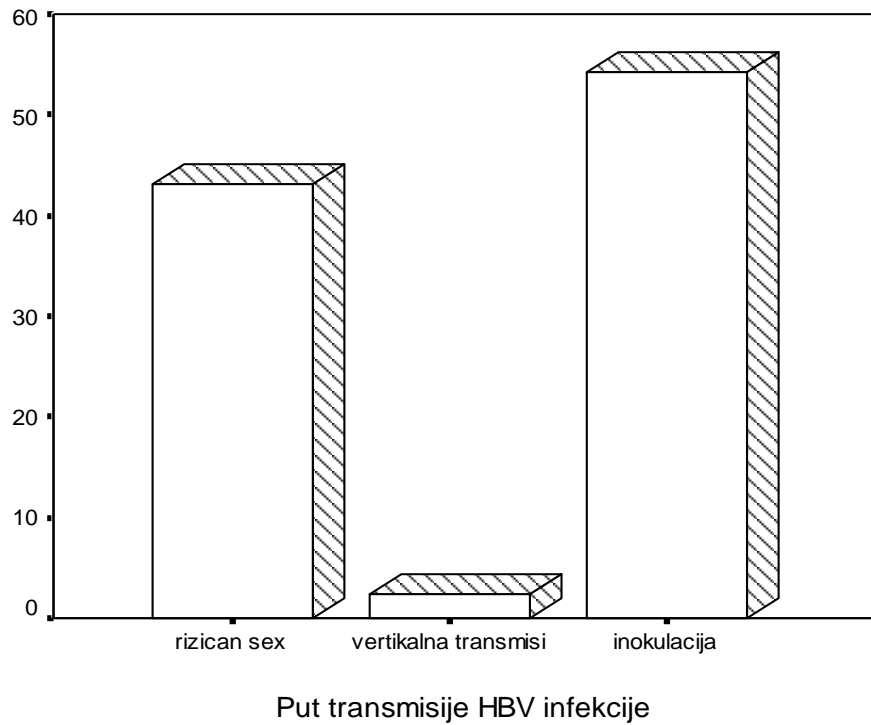
### 4.1 Rezultati ispitivanja uticaja genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova na prirodni tok hronične HBV infekcije

Razmatrali smo distribuciju genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova po polu ispitanika (tabela 5). Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova po polu ispitivanih bolesnika.

Tabela 5. Distribucija genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova po polu ispitanika

		pol				p
		Muški		ženski		
		n	%	n	%	
genotip	A	18	78.3%	5	21.7%	p=0.5
	D	108	77.7%	31	22.3%	
subgenotip	A2	18	78.3%	5	21.7%	p=0.5
	D1	13	92.9%	1	7.1%	
	D2	35	74.5%	12	25.5%	
	D3	60	76.9%	18	23.1%	
HBsAg subtip	adw	1	100.0%	0	0%	p=0.5
	adw 2	17	77.3%	5	22.7%	
	ayw	3	100.0%	0	0%	
	ayw 1	0	.0%	1	100.0%	
	ayw 2	62	78.5%	17	21.5%	
	ayw 3	41	75.9%	13	24.1%	
	ayw 4	2	100.0%	0	0%	

Kod ispitivanih bolesnika razmatran je i način prenošenja HBV infekcije (grafikon 1). Utvrđeno je da je dominantan put prenošenja infekcije bila inokulacija, koja je bila put infekcije za 88 (54,3%) bolesnika. Kod 70 (43,2%) ispitanika put infekcije su bili rizični seksualni kontakti. Vertikalna transmisija je bila najređa, tako se inficiralo samo 4 (2,5%) bolesnika.



Grafikon 1. Putevi transmisije HBV infekcije

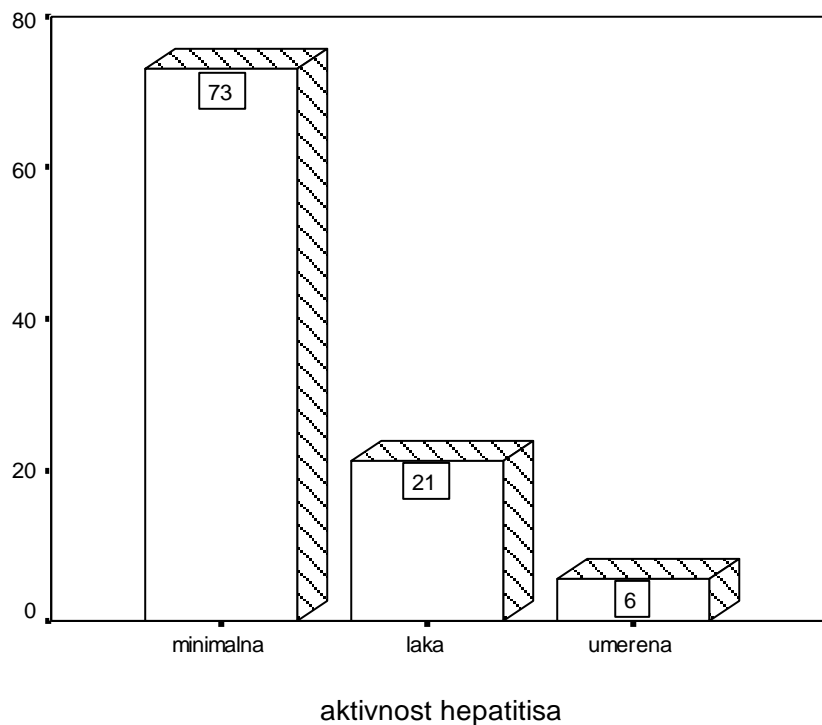
Ispitivanje distribucije genotipova, subgenotipva i HBsAg subtipova prema putu transmisije HBV infekcije, nije pokazalo da postoji statistički značajna povezanost (tabela 6).

Tabela 6. Distribucija genotipova, subgenotipva i HBsAg subtipova prema putu transmisije HBV infekcije

		put transmisije						p
		rizičan seksualni kontakt		vertikalna transmisija		inokulacija		
genotip	A	14	8.6%	8	4.9%	8	4.9%	p=0.1
	D	56	34.6%	80	49.4%	80	49.4%	
subgenotip	A2	14	8.6%	8	4.9%	8	4.9%	p=0.1
	D1	7	4.3%	6	3.7%	6	3.7%	
	D2	22	13.6%	25	15.4%	25	15.4%	
	D3	7	4.3%	49	30.2%	49	30.2%	
HBsAg subtip	adw	14	8.6%	8	4.9%	8	4.9%	p=0.5
	adw 2	13	8.0%	8	4.9%	8	4.9%	
	ayw	2	1.2%	1	0.6%	1	0.6%	
	ayw 1	27	16.7%	1	0.6%	1	0.6%	
	ayw 2	26	16.0%	49	30.2%	49	49.4%	
	ayw 3	1	0.6%	28	17.3%	28	17.3%	
	ayw 4	1	0.6%	1	0.6%	1	0.6%	
ukupno		70	43.2%	4	2.5%	88	54.3%	

Ispitanicima je u cilju patohistološke verifikacije bolesti rađena biopsija jetre. Biopsija jetre je učinjena kod 141 (87%) bolesnika. Kod preostalog 21 (13%) ispitanika biopsija nije rađena zbog rizika od krvarenja, prisustva hemangioma i jetri ili odbijanja bolesnika da se podvrgnu intervenciji.

Patohistološki pregled tkiva jetre dobijenog biopsijom obuhvatao je određivanje nekroinflamatorne aktivnosti HBV infekcije kod hronično inficiranih bolesnika. Dominirala je minimalna aktivnost hronične HBV infekcije, koje je potvrđena kod 103 (73%) bolesnika (grafikon 2).



Grafikon 2. Aktivnost hepatitisa utvrđena patohistološkim pregledom

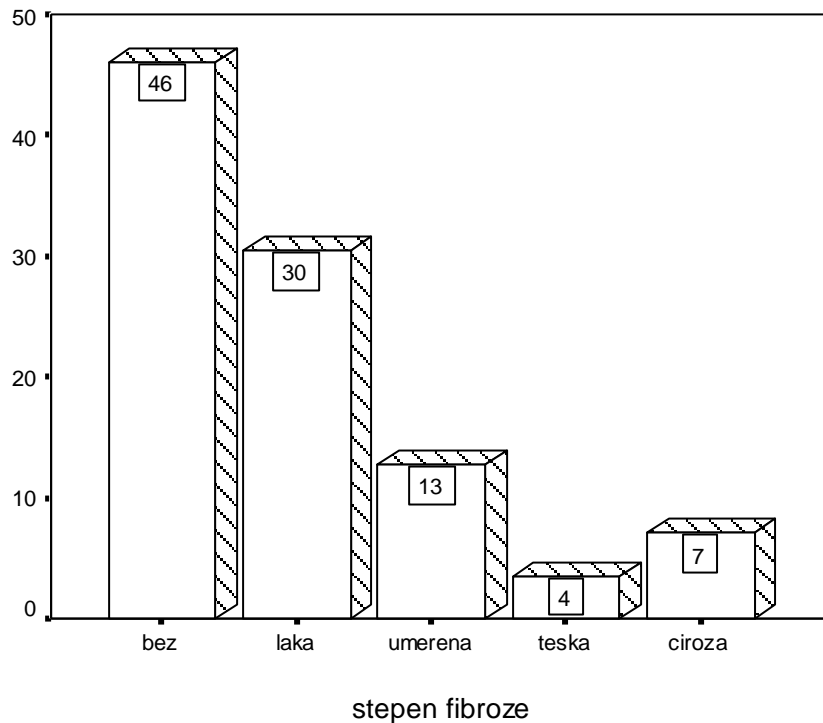
Kod bolesnika kojima je izvršena biopsija jetre, razmatrana je aktivnost hepatitisa utvrđena patohistološkim pregledom, u zavisnosti od genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova (tabela 7). Nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti hepatitisa kod različitih genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova.



Tabela 7. Distribucija genotipova, subgenotipva i HBsAg subtipova prema aktivnosti hronične HBV infekcije

		Aktivnost hepatitisa (F)			p
		minimalna	laka	umerena	
		n (%)	n (%)	n (%)	
genotip	A	<b><u>11 (64.7%)</u></b>	4 (23.5%)	2 (11.8%)	p=0.3
	D	<b><u>92 (74.2%)</u></b>	26 (21%)	6 (4.8%)	
subgenotip	A2	11(64.7%)	4 (23.5%)	2 (11.8%)	p=0.7
	D1	9 (75%)	3 (25.0%)	0 (0%)	
	D2	33 (76.7%)	9 (20.9%)	1 (2.3%)	
	D3	50 (72.5%)	14 (20.3%)	5 (7.2%)	
HBsAg subtip	adw	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	p=0.7
	adw 2	11(68.8%)	4 (25%)	1(6.3%)	
	ayw	2 (66.7%)	1(33.3%)	0 (0%)	
	ayw 1	1(100%)	0 (0%)	0 (0%)	
	ayw 2	50 (71.4%)	16 (22.9%)	4 (5.7%)	
	ayw 3	37 (77.1%)	9 (18.8%)	2 (4.2%)	
	ayw 4	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

Patohistološki pregled tkiva jetre podrazumevao je određivanje stepena fibroze u tkivu jetre dobijenom biopsijom. Većina bolesnika 76 (53,9%) imala je fibrozu različitog stepena, dok je 65 (46,1%) bolesnika nije imao fibrozu u tkivu jetre (grafikon 3).



Grafikon 3. Distribucija bolesnika prema stepenu fibroze jetre

U ispitivanoj grupi bolesnika sa HHB, razmatrana je distribucija genotipova, subgenotipva i HBsAg subtipova prema stepenu fibroze u tkivu jetre dobijenom biopsijom (tabela 8). Utvrđena je značajna razlika u raspodeli subgenotipova prema stepenu fibroze jetre ( $p=0.015$ ). Većina bolesnika bez fibroze jetre pripadala je subgenotipovima D3 i D2, dok je samo 3 (2,1%) bolesnika sa subgenotipom D1 bilo bez fibroze. Genotipovi A i D i HBsAg subtipovi nisu bili značajno povezani sa stepenom fibroze jetre.

Tabela 8. Distribucija genotipova, subgenotipva i HBsAg subtipova prema stepenu fibroze jetre

		stepen fibroze					p
		bez fibroze (0)	blaga (1.)	umerena (2.)	teška fibroza (3.i 4.)	ciroza (5. i 6.)	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
genotip	A	7 (5%)	6 (4.2%)	3 (2.1%)	0 (0%)	1 (0.7%)	p=0.85
	D	58 (41.1%)	37 (26.2%)	15 (10.6%)	5 (3.5%)	9 (6.4%)	
subgenotip	A2	7 (5%)	6 (4.2%)	3 (2.1%)	0 (0%)	1 (0.7%)	p=0.01
	D1	3 (2.1%)	6 (4.2%)	0 (0%)	3 (2.1%)	0 (0%)	
	D2	20 (14.2%)	13 (9.2%)	7 (5%)	0 (0%)	3 (2.1%)	
	D3	35 (24.8%)	18 (12.8%)	8 (5.6%)	2 (1.4%)	6 (4.2%)	
HBsAg subtip	adw	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.7%)	0 (0%)	0 (0%)	p=0.12
	adw 2	7 (5%)	6 (4.2%)	2 (1.4%)	0 (0%)	1 (0.7%)	
	ayw	1 (0.7%)	1 (0.7%)	0 (0%)	1 (0.7%)	0 (0%)	
	ayw 1	0 (0%)	0(0%)	1 (0.7%)	0 (0%)	0 (0%)	
	ayw 2	36 (25.5%)	22 (15.6%)	6 (4.2%)	2 (1,4%)	4 (2.8%)	
	ayw 3	21 (14.9%)	13 (9.2%)	8 (5.6%)	2 (1,4%)	4 (2.8%)	
	ayw 4	0 (0%)	1 (0.7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.7%)	
ukupno		65 (46.1%)	43 (40.5%)	18 (12.8%)	5 (3.5%)	10 (7.1%)	

Kada se bolesnicima sa histološki dokazanom cirozom pridruže i bolesnici kod kojih je dijagnoza ciroze postavljena na osnovu kliničke slike, biohemijskih, endoskopskih i ultrazvučnih nalaza, postoji značajna razlika u zastupljenosti ciroze između genotipova A (26%) i D (10,4%) (tabela 9).

Tabela 9. Distribucija genotipova prema histološki i klinički dokazanoj cirozi jetre na početku praćenja

		ciroza-klinički i histološki				p
		Ne		da		
		n	%	n	%	
genotip	A	17	73.9%	6	26.0%	<u>p=0.042</u>
	D	120	89.6%	14	10.4%	

Na početku praćenja ispitivan je HBeAg/antiHBe status (HBeAg+/antiHBe, HBeAg-/antiHBe+, HBeAg-/antiHBe-) u okviru potvrđenih genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova. Iz tabele 10 vidi se da postoji značajna razlika u HBeAg/antiHBe statusu u zavisnosti od genotipa ( $p=0.02$ ). Prevalenca HBeAg pozitivnog nalaza bila je 60,8% kod bolesnika sa genotipom A, što je značajano više u odnosu na 30,9% koliko je zabeleženo kod bolesnika sa infekcijom genotipom D. Tako je prevalenca HBeAg negativnog nalaza bila viša kod infekcije genotipom D (37,4%) u odnosu na genotip A (37,4% odn. 21,7%,  $p=0,015$ ).

S obzirom da su praktično svi ispitanici sa genotipom A, imali subgenotip A2, odnosno HBsAg subtip adw2, postojala je značajna veza HBeAg pozitivnog nalaza sa ovim subgenotipom ( $p=0,02$ ) i HBsAg subtipom ( $p=0,02$ ) u odnosu na ostale. Međutim, ostali subgenotipovi i HBsAg subtipovi nisu bili značajno povezani sa HBeAg+/antiHBe, HBeAg-/antiHBe+ i HBeAg-/antiHBe- serološkim statusom.

Tabela 10. HBeAg/antiHBe status u okviru različitih genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova.

		HBeAg/antiHBe status			
		HBeAg+ /antiHBe-	HBeAg- /antiHBe+	HBeAg- /antiHBe-	p
genotip	A	14 (60.9%)	5 (21.7%)	4 (17.4%)	<u>p=0.02</u>
	D	43 (30.9%)	52 (37.4%)	44 (31.7%)	
subgenotip	A2	14 (60.9%)	5 (21.7%)	4 (17.4%)	p=0.12
	D1	3 (2.2%)	5 (3.6%)	6 (4.3%)	
	D2	17 (12.2%)	15 (10.8%)	15 (10.8%)	
	D3	23 (16.5%)	32 (23.0%)	23 (16.5%)	
HBsAg subtip	adw	1 (0.6%)	0 (0%)	0 (0%)	p=0.32
	adw 2	13 (8.0%)	5 (3.1%)	4 (2.5%)	
	ayw	1 (0.6%)	2 (1.2%)	0 (0%)	
	ayw 1	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)	
	ayw 2	23 (14.2%)	31 (19.1%)	25 (15.4%)	
	ayw 3	18 (11.1%)	18 (11.1%)	18 (11.1%)	
	ayw 4	1 (0.6%)	0 (0%)	1 (0.6%)	
ukupno		57 (35.1%)	54 (35.2%)	48 (29.6%)	

Poređenjem vrednosti viremije na početku praćenja kod ove tri serološke grupe (HBeAg+/antiHBe, HBeAg-/antiHBe+, HBeAg-/antiHBe) i otkriveno je da je viremija kod bolesnika sa pozitivnim HBeAg bila značajno viša (4,24 log<sub>10</sub> IU/ml) nego kod bolesnika sa negativnim HBeAg (p=0.01). Kod ostale dve grupe (HBeAg-/antiHBe+ i HBeAg-/antiHBe-), vrednosti viremije se nisu značajno razlikovale (2,67 i 2,69 log<sub>10</sub> IU/ml).

HBeAg/antiHBe status (HBeAg+/antiHBe, HBeAg-/antiHBe+, HBeAg-/antiHBe) bio je praćen razlikom u aktivnosti ALT (67.4±36.5, 57.3±38.1 i 51.3±49.4 U/l). Aktivnost ALT bila je viša kod bolesnika sa pozitivnim HBeAg, ali ta razlika nije bila značajna (p=0,13).

Kod ispitivanih bolesnika određivani su biohemijski parametri – aktivnost alanin aminotrasnferaze (ALT), koncentracija serumskih albumina i protrombinsko vreme (PV). U tabeli 11 prikazane su prosečne vrednosti ovih biohemijskih parametara kod genotipa A i genotipa D, na početku praćenja, posle 6 i posle 12 meseci. Aktivnost alanin aminotrasnferaze i koncentracija serumskih albumina nisu se značajno razlikovali između ova dva genotipa tokom 12-mesečnog praćenja, dok je za protrombinsko vreme utvrđena statistički značajna razlika ( $p=0.04$ ). Dok je kod bolesnika sa genotipom A vrednost protrombinskog vremena ostalo nepromenjena tokom jednogodišnjeg praćenja, kod bolesnika sa genotipom D protrombinsko vreme je pokazalo tendenciju pada.

Tabela 11. Prosečne vrednosti biohemijskih parametara (ALT, albumini, PV) tokom 12-mesečnog praćenja

biohem. nalazi	genotip	početak praćenja	posle 6 meseci	posle 12 meseci	p
		X±SD	X±SD	X±SD	
ALT*	A	55.4±36.0	63.5±44.1	59.1±38.2	p=0.8
	D	59.7±42.4	65.9±70.4	64.8±39.4	
albumini	A	34.7±7.6	32.8±7.7	38.8±8.7	p=0.3
	D	38.4±5.2	38.4±6.6	39.2±6.0	
PV**	A	74.9±15.6	73.0±18.7	74.1±22.7	p=0.04
	D	78.1±14.7	74.1±14.3	73.9±15.9	

\* alanin aminotrasnferaza, \*\* protrombinsko vreme

Progersija hronične HBV infekcije u aktivni hepatitis bila je brža kod bolesnika sa genotipom D ( $9,9 \pm 7,7$  godina), u odnosu na bolesnike sa genotipom A ( $17,0 \pm 10,5$  godina) (tabela 12).

Tabela 12. Srednje vreme do progresije u aktivni hepatitis za genotipove A i D

genotip	vreme do progresije u aktivni hepatitis (godine)	p
A	$17,0 \pm 10,5$	<u>0.008</u>
D	$9,9 \pm 7,7$	

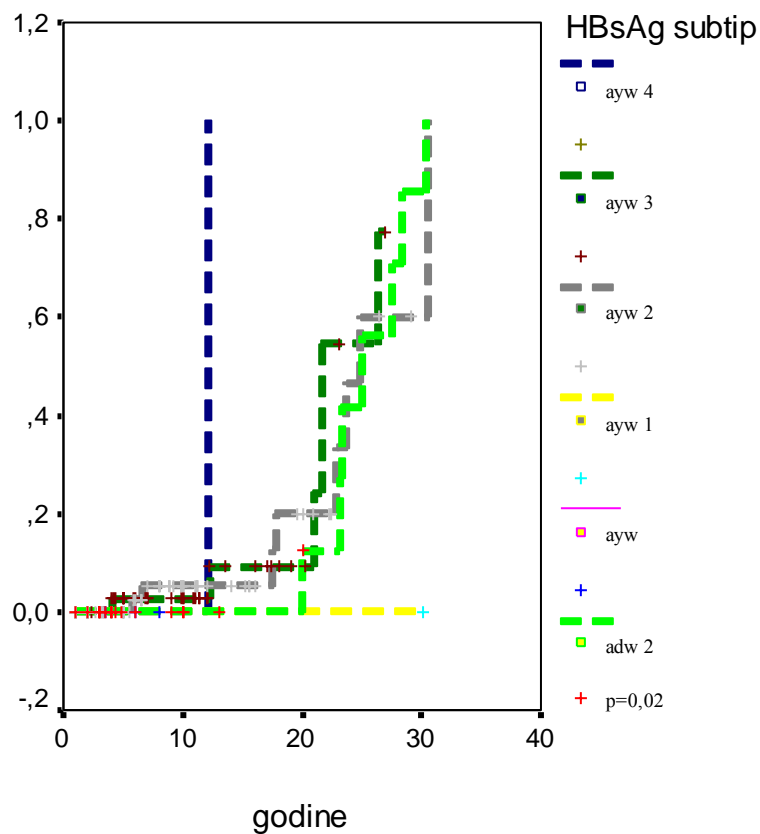
Kod ispitanika sa HHB praćena je progresija u cirozu tokom vremena. Srednje vreme potrebno da dodje do progresije u cirozu bilo je statistički značajno različito za genotipove A i D (tabela 13).

Tabela 13. Srednje vreme do progresije u cirozu za genotipove A i D

genotip	vreme do progresije u cirozu (godine)	p
A	$23,2 \pm 3,4$	<u>0,02</u>
D	$15,1 \pm 8,4$	

Kod šest ispitanika došlo je do razvoja HCC na terenu ciroze jetre: kod 2 bolesnika inficirana genotipom A i 4 bolesnika inficirana genotipom D. Nije bilo moguće analizirati vezu između pojave HCC i određenog genotipa, subgenotipa i HBsAg subtipa, jer se radilo o malom broju ispitanika. Prosečno vreme do pojave HCC kod genotipa A bilo je duže i iznosilo je  $26,5 \pm 2,12$  godina, u odnosu na genotip D  $19,6 \pm 5,13$  godina.

Utvrđena je statistički značajna veza ( $p=0.02$ ) između pojedinih HBsAg subtipova i progresije u cirozu tokom vremena. Kod bolesnika sa HBsAg subtipom ayw4 vreme progresije u cirozu (12 godina) bilo je značajno kraće u odnosu na druge ispitivane HBsAg subtipove (23-26 godina) (grafikon 4). Ipak, mali broj ispitanika sa HBsAg subtipom ayw4 (samo 2), ograničava značaj ovog rezultata.



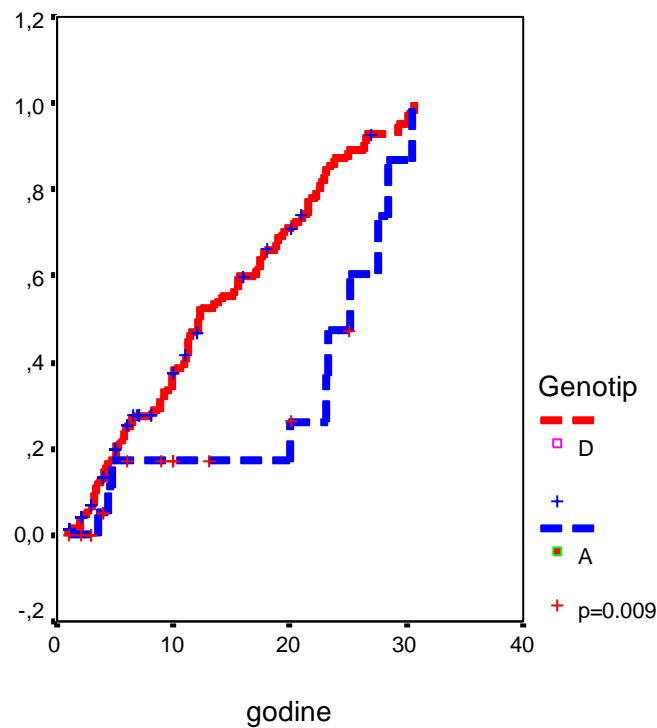
Grafikon 4. Uticaj HBsAg subtipova na progresiju u cirozu tokom vremena

Nije bilo statistički značajne veze pojedinih subgenotipova i progresije u cirozu tokom vremena ( $p=0.7$ ).



#### 4.2 Rezultati ispitivanja uticaja genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova na uspeh antivirusne terapije lamivudinom

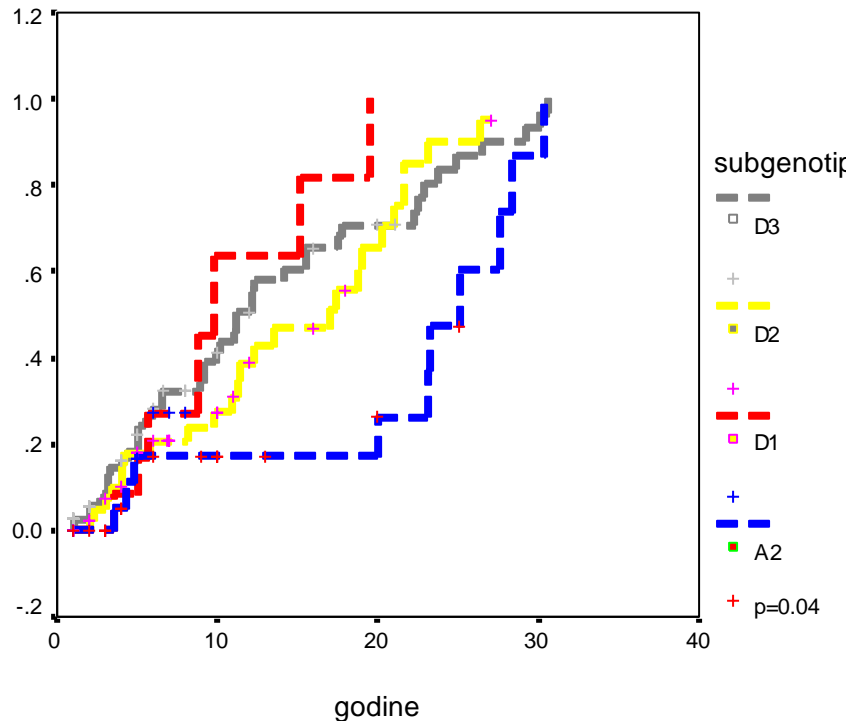
Ispitivano je koliko je srednje vreme koje protekne do potrebe za uvođenjem antivirusne terapije. Na grafikonu 5 se vidi da postoji statistička značajna razlika ( $p=0.009$ ) u dužini vremena koje prođe do potrebe za antivirusnom terapijom: za genotip D to je  $14\pm 1$  godina, a za genotip A to vreme je značajno duže i iznosi  $22\pm 2$  godine.



Grafikon 5. Srednje vreme do potrebe za antivirusnom terapijom u zavisnosti od genotipa

I za pojedinačne subgenotipove srednje vreme koje protekne do potrebe za uvođenjem antivirusne terapije značajno se razlikovalo ( $p=0.04$ ). Najkraće vreme do uvođenja antivirusne terapije nađeno je za subgenotip D1 -  $11\pm 2$  godine, najduže za subgenotip A2 -  $22\pm 2$  godine (očekivano, jer su svi bolesnici sa genotipom A imali

subgenotip A2). Srednje vreme do potrebe za uvođenjem antivirusne terapije za subgenotipove D2 i D3 bilo je  $15\pm 1$  i  $14\pm 1$  godina (grafikon 6).



Grafikon 6. Srednje vreme do potrebe za antivirusnom terapijom u zavisnosti od subgenotipa

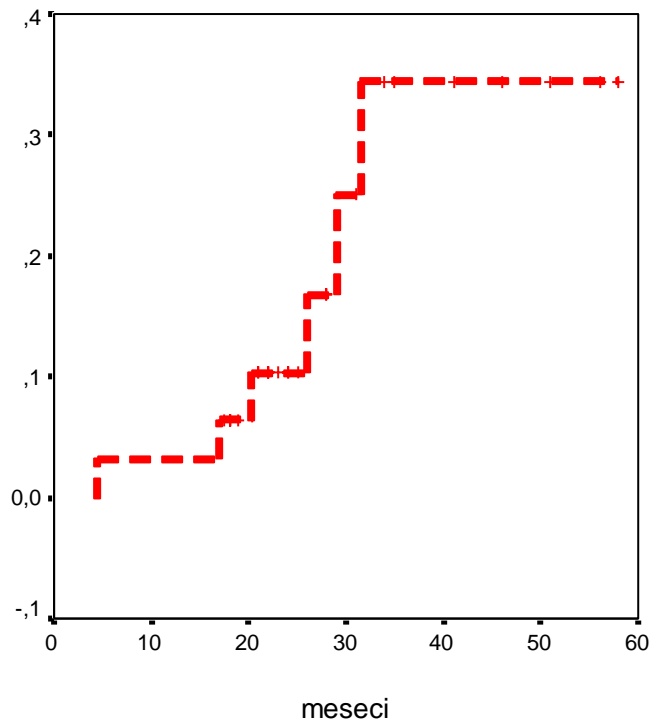
Nije bilo statistički značanje veze između pojedinih HBsAg subtipova i vremena do potrebe za antivirusnom terapijom ( $p=0.06$ ) .

Kod 85 lečenih bolesnika, posle srednjeg vremena od  $2,4\pm 0,9$  godina, povoljan terapijski odgovor je zabeležen kod 34 (40%) bolesnika. Terapija nije bila uspešna kod 51 (60%) bolesnika. Virusološki proboj, koji je sugerisao rezistenciju na lamivudin, potvrđen je kod 40 (47%) bolesnika, 9 (10,6%) bolesnika je umrlo, zbog ciroze jetre i HCC, a 2 (2,4%) su napustila lečenje.

Tabela 13. Ishod terapije lamivudinom

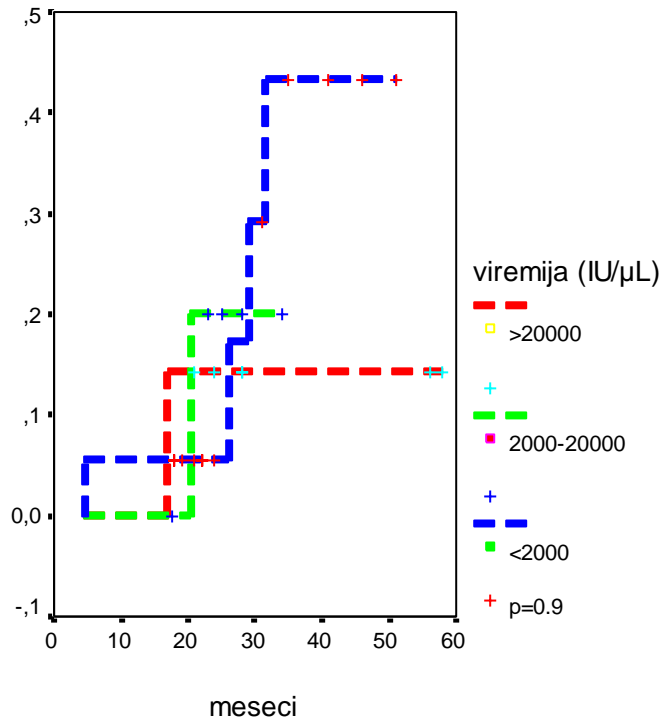
ishod terapije lamivudinom	n	%
uspešna terapija	34	40
neuspešna terapija	40	47
umrli	9	10,6
napustili lečenje	2	2,4

Pratili smo verovatnoću za pojavu rezistencije tokom terapije lamivudinom (grafikon 7). Rezultati su bili bolji u odnosu na rezultate iz literature, posle 30 meseci (2,5 godina) terapije verovatnoća da se razvije rezistencija bila je 35%.



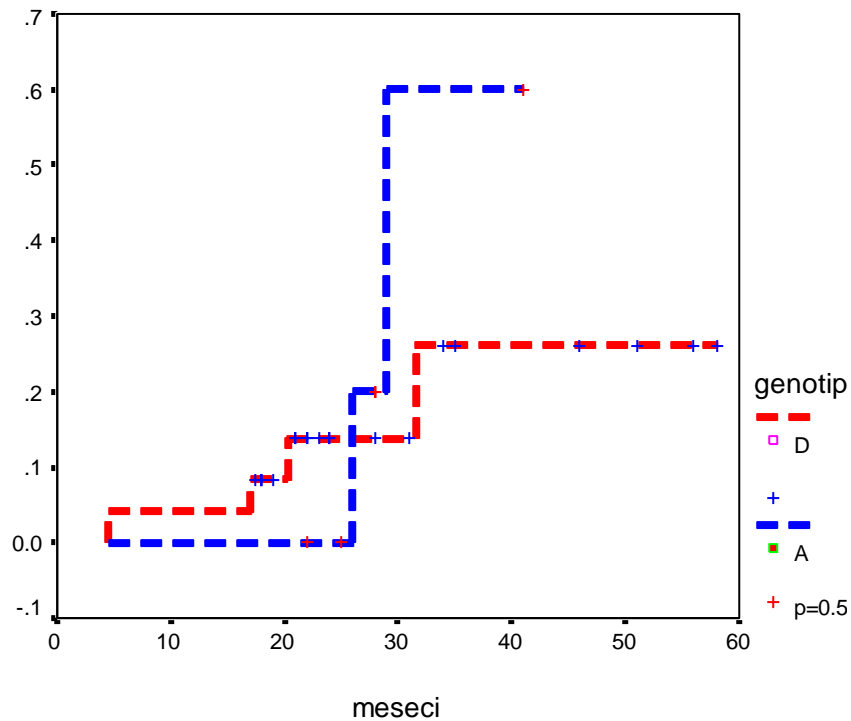
Grafikon 7. Verovatnoća razvoja rezistencije tokom terapije lamivudinom

Razmatran je uticaj preterapijskog stepena viremije na razvoj rezistencije na lamivudin (grafikon 8). Verovatnoća da se razvije rezistencija na lamivudin, nije zavisila od preterapijskog nivoa viremije ( $p=0.9$ ).



Grafikon 8. Uticaj preterapijskog stepena viremije na razvoj rezistencije na lamivudin

Ispitivana je verovatnoća da se razvije rezistencija na lamivudin u zavisnosti genotipa (grafikon 9). Nije nađena značajna razlika u verovatnoći da se razvije rezistencija na lamivudin između genotipova A i D ( $p=0.5$ ).



Grafikon 9. Uticaj genotipa na verovatnoću pojave rezistencije na lamivudin

Različiti subgenotipovi i HBsAg subtipovi nisu se razlikovali po verovatnoći pojave rezistencije na lamivudin ( $p=0.8$ ,  $p=0.9$ )

Na verovatnoću pojave rezistencije na lamivudin, uticao je stepen fibroze. Verovatnoća za pojavu rezistencije na lamivudin bila je značajno viša kod bolesnika sa teškom fibrozom i iznosila je 76,1%, u odnosu na 48,9% kod onih bez fibroze odn. sa lakom fibrozom jetre ( $p=0.03$ ). (Tabela 14)

Tabela 14. Uticaj stepena fibroze na verovatnoću pojave rezistencije na lamivudin

stepen fibroze	verovatnoća za razvoj rezistencije na lamivudin	p
bez/laka	48,9%	p=0.03
teška	76,1%	

Razmatrane su promene u biohemijskim analizama (ALT, PV, albumini) na početku praćenja, 6 i 12 meseci nakon antivirusne terapije lamivudinom, u zavisnosti od genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova. Koncentracija serumskih albumina se značajno razlikova, dok se aktivnost alanin aminotranferaze i protrombinskog vremena nije bitno razlikovala između genotipova A i D (tabela 15).

Tabela 15. Uticaj genotipova na promene u biohemijskim nalazima na početku praćenja, nakon 6 i 12 meseci terapije lamivudinom.

biohem. nalazi		početak praćenja	posle 6 meseci teraije	posle 12 meseci terapije	p
genotip		X±SD	X±SD	X±SD	
ALT*	A	55.4±36.0	28.7±15.8	48.3±32.4	p=0.03
	D	59.7±42.4	41.0±34.6	79.78±54.8	
albumini	A	34.7±7.6	30.9±8.2	31.4±9.3	p=0.3
	D	38.4±5.2	37.2±6.9	37.3±7.2	
PV**	A	74.9±15.6	58.0±19.2	52.7±23.4	p=0.3
	D	78.1±14.7	69.7±19.5	69.4±20.4	

\* alanin aminotransferaza , \*\* protrombinsko vreme

Aktivnost ALT se razlikovala između genotipa A i genotipa D na početku praćenja, posle 6 i 12 meseci terapije lamivudinom (p=0.03), što nije bio slučaj za protrombinsko vreme i koncentraciju serumskih albumina (p=0.3, p=0.3)

Analiziran je uticaj različitih subgenotipova na aktivnost ALT, protrombinsko vreme i koncentraciju serumskih albumina.

Aktivnost ALT se značajno razlikovala između subgenotipiva D2 i D3 posle 12 meseci terapije: 63,2±41,4 IU/l za subgenotip D2 u odnosu na 89,9±60,0 za subgenotip D3 (p=0.02). Posle 12-mesečne terapije značajna razlika je nađena i za aktivnost ALT između subgenotipa A2 (48,3±32,4) i subgenotipa D3 (89,9±60,0) (p=0.02).

Protrombinsko vreme i koncentracija serumskih albumina nisu se značajno razlikovali na početku praćenja, posle 6 i 12 meseci terapije lamivudinom kod dokazanih subgenotipova HBV.

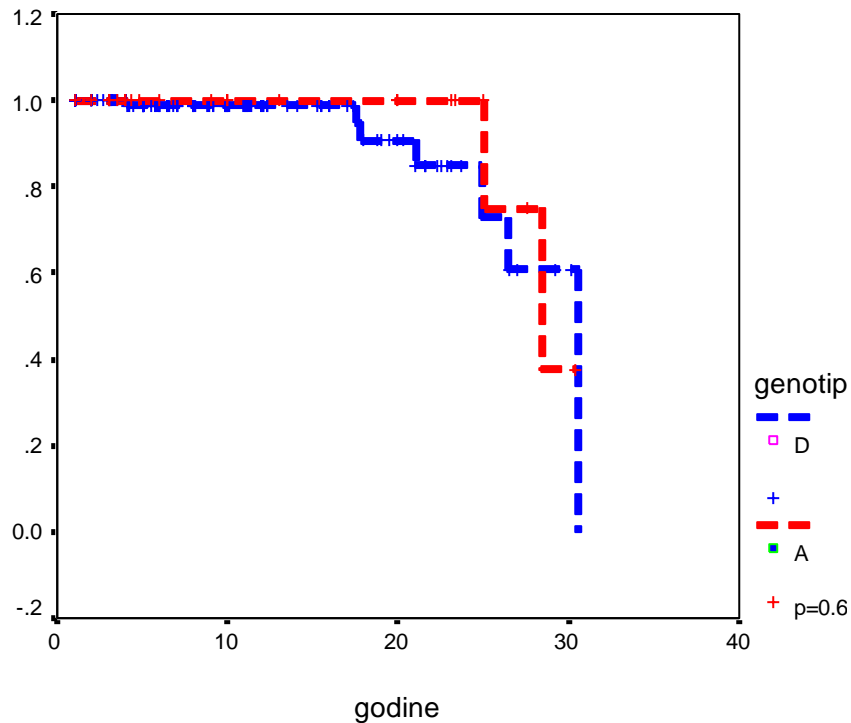
Praćene biohemijske analize nisu se bitno razlikovale na početku praćenja, posle 6 i 12 meseci terapije lamivudinom kod različitih HBsAg subtipova.

U grupi lečenih, 41 (48,2%) bolesnik je bio HBeAg pozitivan. Stopa HBeAg/antiHBe serokonverzije iznosila je 36,6% posle srednjeg vremena od  $2,4 \pm 0,9$  godina.

Broj bolesnika sa HBeAg/antiHBe serokonverzijom tokom terapije lamivudinom, nije dozvoljavao određivanje značajnosti, ali je serokonverzija bila češća kod bolesnika sa genotipom D (93,3%) u odnosu na genotip A (6,7%). Serokonverzija u antiHBe najčešće se javljala kod subgenotipa D3 (60%), potom kod D2 (26,7%), a najređe kod D1 i A2 (6,7%). U grupi bolesnika sa HBeAg/antiHBe serokonverzijom HBsAg subtip ayw2 je bio najčešći (66,7%), potom je HBsAg subtip ayw3 (26,7%), dok adw2 bio najređi (samo 6,7%, što je očekivano jer su svi sa infekcijom genotipom A imali ovaj HBsAg subtip).



Ispitivano je preživljavanje bolesnika u zavisnosti od genotipa. Prosečano preživljavanje bolesnika sa genotipom A bilo je  $28 \pm 1$  godina, a bolesnika sa genotipom D je iznosilo  $27 \pm 1$  godina ( $p=0.6$ ). (Grafikon 10)

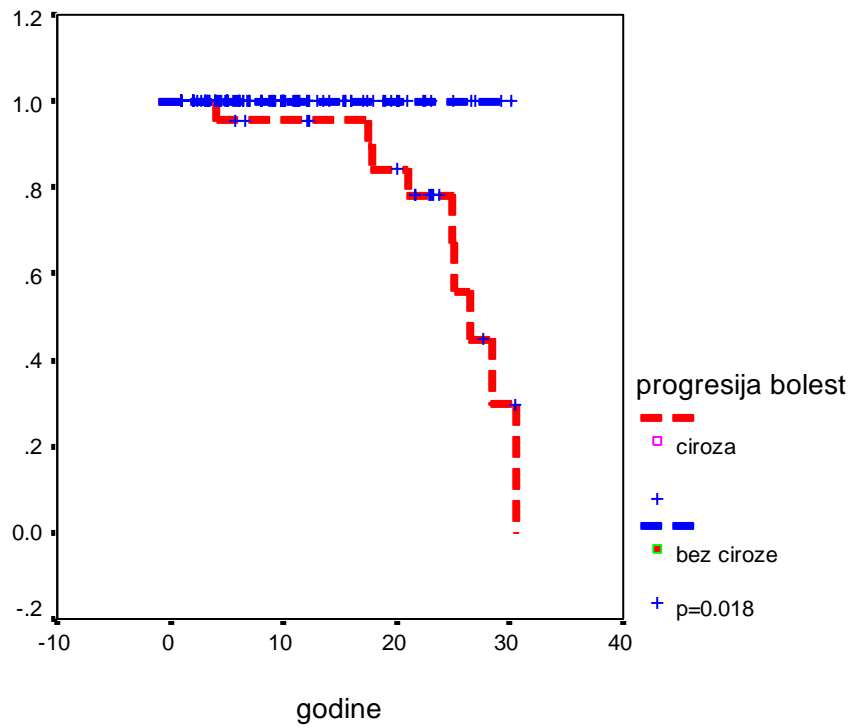


Grafikon 10. Uticaj genotipova na preživljavanje

Prosečno preživljavanje bolesnika sa hroničnim B hepatitisom nije bilo značajno povezano sa subgenotipom ( $p=0.7$ ) i HBsAg subtipom.

Prosečno preživljavanje ovih bolesnika nije zavisilo od pola ( $p=0.5$ ). Starost bolesnika  $> 40$  godina nije uticala na prosečno preživljavanje ( $p=0.1$ ).

Razmatrano je prosečno preživljavanje bolesnika u zavisnosti od prisustva ciroze. Postojala značajna razlika u preživljavanju bolesnika bez ciroze i bolesnika sa cirozom jetre ( $p=0.018$ ). Prosečno preživljavanje bolesnika sa cirozom jetre bilo je 25 godina, dok je verovatnoća bila 100% da bolesnici sa manje uznapredovalom bolešću dožive 30 godina. (Grafikon 11)



Grafikon 11. Uticaj progresije bolesti na preživljavanje

## 5. DISKUSIJA

Otkriće genotipova HBV bio je povod za brojna istraživanja usmerena na ispitivanje njihove povezanosti sa kliničkim tokom, ali i uspehom terapije. Budući da je veza između genotipova HCV, toka i ishoda te infekcije dokazana, bio je to podsticaj za utvrđivanje značaja genotipova HBV.

Do sada je otkriveno 10 genotipova HBV (A-J). Poslednji su otkriveni genotipovi I i J u Vijetnamu i Japanu. Genotip I je nastao rekombinacijom između genotipova A, C i G, a genotip J je bliskoj vezi sa genotipom C (Schaefer 2007, Tatematsu i sar. 2009., Tran i sar. 2008.). Genotipovi i subgenotipovi HBV imaju karakterističnu geografsku distribuciju (Schaefer 2007., Jazayeri i sar. 2009., Vaezjalali i sar. 2008., Cao 2009.). Genotip A je zastupljen u južnoj i zapadnoj Africi, gde su potvrđeni subgenotipovi A1, A3-A5. U zapadnoj i severnoj Evropi dominira ovaj genotip, preciznije subgenotip A2. Genotipovi B i C su endemski u istočnoj i jugooistočnoj Aziji. Genotip D dominira duž Mediterana, na Bliskom istoku i zapadnoj Aziji. Genotip E je zastupljen u zapadnoj Africi, a genotip F u Centranj Americi. Genotipovi G i H dominiraju u Južnoj Americi.

U Srbiji je utvrđeno prisustvo genotipova A i D, uz dominaciju genotipa D, subgenotipova A2, D1, D2, D3 i HBsAg subtipova *adw2*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4* (Bojović i sar. 2006., Bojović 2007., Lazarević i sar. 2007., Stanojević i sar. 2011.). Sličan odnos genotipova A i D opisan je i u zemljama u okruženju sa prevalencom genotipa D 80% u Hrvatskoj i 67% u Rumuniji (Deterding i sar. 2008.).

S obzirom na dominaciju genotipova B i C u Aziji, koja je područje sa visokom prevalencom HBV infekcije (8-15%), uticaj ovih genotipova na tok hronične infekcije i uspeh antivirusne terapije je bolje proučen od uticaja genotipova A i D. Pored toga, autori su se bavili i različitim epidemiološkim modelima prenošenja HBV u zavisnosti od genotipa i subgenotipa. U istraživanju koje su sproveli Kobayashi i sar. 2003. u Japanu, gde dominiraju genotipovi C i B, ispitivane su kliničko-epidemiološke karakteristike osoba inficiranih genotipom A u oblasti Tokija. Studija je obuhvatila 53 HBsAg pozitivne osobe: 17 asimptomatskih nosilaca virusa, 15 bolesnika sa HHB, 4 bolesnika sa cirozom jetre i 17 sa akutnom HBV infekcijom. Kao što je očekivano, oni sa HHB, su imali značajno više vrednosti HBV DNK i češću HBeAg pozitivnost od asimptomatskih nosilaca virusa. Interesantni su rezultati vezani za put infekcije ispitanika iz ovog

istraživanja. Testirane su i majke ispitanika i ni jedna od testiranih žena nije bila inficirana genotipom A. Iako je vertikalna transmisija česta u Japanu, rezultati ovog istraživanja su ukazali da se u oblasti Tokija, genotip A prenosi horizontalnim putem. Isti japanski autori su pokazali da je i pored domancije genotipova B i C, infekcija genotipom A sve češća, i to kod akutnih hepatitisa, koji nisu progredirali u hronični (Kobayashi i sar. 2004.). Postoje i suprotstavljeni stavovi da infekcija ovim genotipom nosi veći rizik od progresije u hroničnu bolest (Sukuzi i sar. 2005., Matsuura i sar. 2009.).

Migracije stanovništva, uvođenje vakcinacije protiv hepatitisa B u jednoj sredini, ali i oblici rizičnog ponašanja uticali su na prevalencu genotipova u jednoj populaciji. Ispitivanjem genotipova HBV kod bolesnika iz Japana sa HIV koinfekcijom (Koibuchi i sar. 2001.), najzastupljeniji je bio genotip A, za razliku od genotipova C i B koji su preovladavali kod HIV negativnih. Kod HIV pozitivnih s genotipom A, dominirali su homoseksualci, u odnosu na obolele od hemofilije i inficirane heteroseksualnim putem. S obzirom da je, u Japanu, vertikalna transmisija HBV smanjena uvođenjem vakcinacije, genotip A se ponajpre širi horizontalno među HIV pozitivnim. Dalja istraživanja su ukazala na stalni porast incidence genotipa A, uglavnom kod mlađe populacije u odnosu na inficirane genotipovima C i B, što se dovodi u vezu sa promiskuitetnim ponašanjem inficiranih osoba (Matsuura i sar. 2009.). Kod ovih bolesnika je utvrđeno prisustvo subgenotipa A2 koji odgovara evropskom i severnoameričkom, ali je potvrđen i subgenotip A1 koji odgovara subgenotipu sa Filipina i iz Indije. To sugeriše da je genotip A dospelo u Japan iz dva različita izvora (Matsuura i sar. 2009.).

Slična veza uočena je između genotipa D, subgenotipa D3 i intravenske zloupotrebe narkotika u zatvorima Britanske Kolumbije, u Kanadi. Ovo je primer kako prepoznavanje genotipova pomaže u proceni u kojim grupama u riziku je neophodna preventivna imunizacija (Pannesa i sar. 2009.). Prisustvo subgenotipa D3 kod intravenskih uživalaca droge uočena je i u Evropi i Severnoj Americi (Norder i sar. 2004.)

Rezultati francuskih autora govore u prilog dominacije genotipova A (24%) i D (27%), što je očekivano za Evropu, uz prisustvo genotipova E (13%), C (12%) i B (7%), verovatno kao posledice migracije stanovništva u ovu zemlju. Rezultati iz Francuske ukazuju na različit put infekcije dominantnim genotipovima: genotip A je bio povezan sa rizičnim seksualnim kontaktima, dok se genotip D uglavnom prenosio transfuzijom krvi i

krvnih derivata (Halfon i sar. 2006.). U zapadnoevropskim zemljama, HBV se stiče uglavnom u odraslom dobu, seksualnim putem i zloupotrebom narkotika (Mayerat i sar. 1999.). Prema ostalim saopštenjima, genotipovi A i D se prenose uglavnom horizontalnim putem, za razliku od genotipova B i C koji se prenose vertikalno (Lin i sar. 2011.).

Rezultati američke studije o HBsAg subtipovima, kod određenih rizičnih grupa - izbeglica iz Azije, zatvorenika i homoseksualaca, pokazali su da u grupi homoseksualaca dominirao adw2 (88,6%), u donosu na ayw3 (11,1%), dok su kod osuđenika otkriveni subtip ayw3 (52,5%), zatim jednako subtipovi ayw2 i adw2 (22,0%), dok je najređi bio aywl-2 (3,4%). Kod izbeglica iz Azije, to su bili aywl-2 (33,0%), adw2 (31,1%), adr (34,9%) i adw 4 (0,9%). Ovakva distribucija HBsAg subtipova ukazivala je na njihovo moguće poreklo - Vijetnam, Laos i Kamodža (Swenson i sar. 1991.).

Ovo istraživanje nije pokazalo povezanost određenih genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova i nekog od rizika za HBV infekciju. Kod ispitanika ovog istraživanja dominira horizontalni put infekcije u odnosu na vertikalni, što je u saglasnosti sa rezultatima francuskih autora (Halfon i sar. 2006.), ali za bolju epidemiološku procenu, ipak je neophodno uraditi sveobuhvatnije seroepidemiološko istraživanje.

Prirodni tok HBV infekcije, progresija u hroničnu bolest, određeni su brojnim faktorima. Vrlo je složena interakcija različitih faktora domaćina, virusa i sredine, koji utiču na prirodni tok HHB. Ishod je određen uzrastom u kome je infekcija stečena, načinom prenošenja, genotipom i genetskim varijacijama HBV (Kim i sar. 2011.). Iako akutni hepatitis B nije bio predmet ovog istraživanja, važna je i zastupljenost genotipova kod ove forme bolesti. U prvom istraživanju vezanom za genotipove HBV kod bolesnika lečenih u Infektivnoj klinici u Beogradu, uočeno je da je genotip A učestaliji među slučajevima sa akutnim tokom HBV infekcije, što je u saglasnosti i sa već pomenutim istraživanjima japanskih autora (Bojović 2007., Kobayashi 2003.). Imajući ovo u vidu, dominacija genotipa D među hronično inficiranim pacijentima u našoj zemlji, nije iznenađujuća.

Rezultati japanskih autora govore da će oko 10% osoba inficiranih genotipom A razviti hroničnu bolest, kod kojih će, potom, inaktivno nosilaštvo virusa biti najverovatnije (Matsuura i sar. 2009.).

Postoje i oprečni rezultati sa dominacijom genotipa A kod hronično inficiranih, za razliku od genotipa D koji je bio prisutniji kod akutnih hepatitisa (Mayerat i sar. 1999.). Moguće objašnjenje, za ovu pojavu je slabija antigenska ekspresija genotipa A i stimulacija imunskog odgovora domaćina za eliminaciju virusa (Mayerat i sar. 1999.).

Tanwar i Dusheiko (2012.) zaključuju da upravo genotipovi A i D, dokazani kod naših bolesnika, češće dovode do hronične infekcije.

Jedna studija japanskih autora razmatrala je zastupljenost pojedinih genotipova kod bolesnika sa akutnim i hroničnim hepatitisom, u tokijskim bolnicama. Otkrili su pet genotipova - A, B, C, D i F. Samo je genotip C bio zastupljeniji kod hroničnih hepatitisa odnosu na akutne (87,7% i 43,9%). Ostali genotipovi su bili prisutniji kod akutnih hepatitisa (A kod 22,8% , B kod 14% D 1,8% i F 1,8% ) (Akuta i sar. 2005.).

S druge strane, kineski autori (Zhang i sar. 2008.) otišli su korak dalje, razmatrajući značaj subgenotipova za razvoj hronične infekcije. Subgenotip C2 je češće dovodio do hronične infekcije, nego subgenotip B2, te se smatra nezavisnim prediktorom hroniciteta. Smatra se da perzistencija HBV infekcije posle akutne, zavisi od puta prenošenja, veličine inokuluma, kompleksnih interakcija virusa i domaćina, a verovatno i od genotipova i subgenotipova (Lin i sar. 2011.).

Uticaj genotipova na progresiju bolesti jetre i stepen fibroze je ispitivan u više različitih studija, posebno za genotipove C i B kod azijskih bolesnika. Tako je utvrđeno da je genotip C zastupljeniji kod bolesnika koji imaju cirozu jetre, kao i kod onih sa HCC starijih od 50 godina, nego kod asimptomatskih nosilaca virusa (Kao i sar. 2000.). Dodatna istraživanja istih autora dovela su u vezu genotip C, razvoj HCC i prisustvo basal core promoter mutacija A1762T/G1764A (Kao i sar. 2003.). Infekcija genotipom C bila je praćena s čak sedmostruko višim vrednostima viremije i petostruko većim rizikom od HCC (Yu i sar. 2005.). Prospektivna studija koja je obuhvatila 2762 tajvanskih bolesnika sa HBV infekcijom, potvrdila je prethodna zapažanja da je genotip C udružen sa većim rizikom za razvoj HCC od genotipa B (Yang i sar. 2008.). Uočene su i druge razlike između infekcije sa ova dva genotipa: osobe inficirane genotipom B dobijale su HCC u mlađem životnom dobu u odnosu na osobe inficirane genotipom C (Ni i sar.2004., Kao i sar. 2000., Yin i sar. 2008.). Kod osoba sa genotipom B, HCC se razvijao pre 35. godine, na terenu hroničnog hepatitisa, bez prethodne ciroze jetre. Predmet istraživanja azijskih autora su bile i patohistološke i kliničke karakteristike operabilnog

HCC na Tajvanu (Chen i sar. 2004., Lin i sar. 2007.). Kod 193 bolesnika sa HCC uzrokovanog HBV, solitarni tumori su bili češći kod genotipa B (94%), nego kod C (86%). Ali kod genotipa C bilo je više satelitskih nodusa (22% prema 12%), što je važno za prognozu i pojavu recidiva nakon operativnog lečenja.

Slični rezultati zabeleženi su i u pedijatrijskoj populaciji. U studiji koja je obuhvatila 487 kineske dece sa HHB, uzrasta 3-18 godina, razmatran je uticaj različitih genotipova i subgenotipova na progresiju bolesti, odnosno stepen inflamacije i fibroze. Ispitivanje je dovelo do zaključka da su inflamacija i fibroza bile manje izražene kod subgenotipa B2, nego subgenotipa C2, koji je vodio u bržu progresiju bolesti (Zhong i sar. 2011.).

Razmatranjem uticaja drugih genotipova na progresiju HBV infekcije kod španskih bolesnika (Sánchez-Tapias i sar. 2002.), došlo se do zaključka da je smrtni ishod češći kod infekcije genotipom D i F, nego kod infekcije genotipom A. Kod njih je stopa biohemijske remisije i nedetektibilne viremije, koja sugeriše prelazak hronične HBV infekcije u fazu inaktivnog HBsAg nosilaštva, bila je viša kod genotipa A, u odnosu na genotipove D i F. Tako je genotip A bio nezavisni prediktor remisije. Inaktivno nosilaštvo virusa je obično vezano za povoljan ishod infekcije, te gore opisani rezultati sugerišu da je prognoza HHB bolja kod genotipa A, nego kod genotipova D i F.

Povoljni tok HBV infekcije podrazumeva gubitak HBsAg, s godišnjom stopom 1,7% (Sampliner i sar. 1979.). Ishod hronične HBV infekcije je povoljan nakon negativizacije HBsAg, čak i kod onih sa uznapredovalom bolešću (Liaw i sar. 1991.). Kod španskih bolesnika, gubitak HBsAg češće se javljao kod starijih bolesnika, koji su već imali cirozu na početku praćenja i kod infekcije genotipom A u odnosu na genotipove D i F (Sánchez-Tapias i sar. 2002.).

Nalazi ovog istraživanja su u saglasnosti sa istraživanjem španskih autora (Sánchez-Tapias i sar. 2002.), budući da nije bilo razlike u stepenu fibroze i nekroinflamatorne aktivnosti na početku praćenja između genotipova A i D. Tokom praćenja oni sa genotipom D su imali bržu progresiju u aktivni hepatitis, posle  $9,9 \pm 7,7$  godina, dok je kod onih s genotipom A, do progresije došlo posle  $17,0 \pm 10,5$  godina (Milošević i sar. 2013.). Zbog toga je kod inficiranih genotipom D bio brži razvoj ciroze, nego kod infekcije genotipom A ( $15,1 \pm 8,4$  god. u odnosu na  $23,3 \pm 3,4$  god.), što znači bolju prognozu kod inficiranim genotipom A (Milošević i sar. 2013.).

U značajno manjem broju istraživanja, došlo se do zaključka da je infekcija genotipom D povoljnijeg toka. Tako istraživanje holandskih autora iz 2005. godine govori u prilog izraženije fibroze jetre kod onih sa infekcijom genotipom A u odnosu na genotip D (Janssen i sar. 2005.).

Suprotstavljena su i mišljenja indijskih autora (Gadhe i sar. 2002., Thakur i sar. 2002., Kumar i sar. 2005.), kako po pitanju prevalence genotipova A i D, tako i po pitanju uticaja genotipova na progresiju bolesti. Kumar i sar. 2005. godine su kod 70 bolesnika sa HHB utvrdili infekciju genotipovima A i D, uz blagu dominaciju genotipa A (53% prema 46%). Došli su do zaključka da je infekcija genotipom A praćena izraženijom nekroinflamacijom, što za posledicu ima bržu progresiju u cirozu. Srednja vrednost ALT kod ispitivanih bolesnika bila je  $140 \pm 177$  IU/l. Kod bolesnika sa genotipom A, aktivnost ALT češće je bila 1,5 put iznad gornje granice normalne vrednosti, nego što je to bio slučaj kod bolesnika sa genotipom D (81% prema 58%). Kod genotipa A bila je češća HBeAg pozitivnost nego kod genotipa D (86% prema 62%), kao i ciroza jetre (82% prema 57%). Kumar i sar. smatraju da se klinički značaj HBV genotipova ogleda u različitim patogenetskim mehanizmima koje treba dodatno ispitivati. Kasnija HBeAg serokonverzija, posle više epizoda remisija i reaktivacije, odgovorna je za progresiju bolesti u cirozu i dekompenzaciju jetre. Tako je za lošiji ishod bolesti kod genotipa A, odgovorna češća HBeAg pozitivnost, viša aktivnost ALT, izraženija nekroinflamacija, te i veći rizik za progresiju u cirozu. Autori, ipak, smatraju da su, zbog malog broja bolesnika, potrebna dodatna ispitivanja uticaja genotipa na progresiju bolesti. Takođe bi bilo značajno ispitati povezanost vrednosti viremije kod različitih genotipova, što Kumar i sar. nisu razmatrali. McMahan (2013.) je godine ukazao na povezanost visoke viremije i progresije bolesti. Razvoj uznapredovale fibroze je bio malo verovatan kod onih sa HBV DNK uvek ispod 20000 iu/ml.

Druga istraživanja iz Indije govore suprotno od navedenog: Thakur i sar. 2002. godine ispitivali su 130 bolesnika sa različitim manifestacijama HBV infekcije: 52 asimptomatska nosilaca HBsAg, 48 bolesnika sa cirozom i 30 sa HCC. Kod ispitivanih bolesnika najčešći je bio genotip D (48%), potom genotip A (46%), dok je mali broj bolesnika (6%) imao mešovitu infekciju sa oba genotipa. Nije bilo razlike u zastupljenosti genotipova A i D u ispitivanim podgrupama. Dalja analiza je ukazala da je kod asimptomatskih HBsAg nosilaca s genotipom D bio prevalentniji HIA > 4 (53%), u



poređenju sa genotipom A (32%). Genotip D je češće bio uzrok teže forme bolesti jetre (61% prema 31%), kao i češći uzročnik HCC kod mladih od 40 godina, što ukazuje da infekcija genotipom D ima lošiju prognozu od genotipa A (Thakur i sar. 2002.).

O genotipu D kao najzastupljenijem u Indiji govori i studija koju su sproveli Gandhe i sar. 2002. godine. Genotip A potvrđen je kod samo 8% ispitanika. Autori su utvrdili da se kod osoba sa genotipom D radi o infekciji HBsAg subtipovima ayw3 i ayw2. Rezultati ovog istraživanja nisu afirmativni u pogledu uticaja različitih genotipova na tok HBV infekcije.

Kasnije sprovedena ispitivanja u Indiji, iz 2009. godine, takođe govore o dominaciji genotipa D (68,3%) u odnosu na genotip A (25,7%), ali se kao novi genotip u ovoj sredini pojavljuje i genotip C (5,9%) (Madan i sar. 2009.). Distribucija genotipova kod bolesnika sa akutnom, hroničnom HBV infekcijom, asimptomatskih HBsAg nosilaca, bolesnika sa cirozom jetre i HCC nije se značajno razlikovala. Indeks histološke aktivnosti i stepen fibroze se nisu bitno razlikovali u zavisnosti od genotipa. Rezultati ove studije bili su slični onima iz istraživanja koje su sproveli Gandhe i sar. 2002., i govore o sličnom toku bolesti kod infekcije genotipovima A i D (Madan i sar. 2009.)

U Turskoj, mediteranskoj zemlji je najučestaliji genotip D. U nekoliko studija ovo je bio i jedini potvrđeni genotip. Tako su Yalcin i sar. 2003. godine dokazali podjednaku distribuciju genotipa D, kod različitih formi HHB, nezavisno od HBeAg statusa i aktivnosti serumskih transaminaza, te zaključili da ovaj genotip ne utiče na težinu HBV infekcije.

Razmatrajući uticaj genotipova A i D na tok bolesti i dalje širenje infekcije, Kumar i sar. 2009. godine su testirali ukućane osoba sa HHB. Kod 28,8% testiranih dijagnostikovana je okultna HBV infekcija, a prevalenca genotipova A i D nije bila različita u odnosu na one sa HHB.

S obzirom na karakterističnu geografsku distribuciju genotipova, najviše je saopštenja o poređenju infekcije genotipovima B i C, odnosno A i D. Mali je broj studija u kojima se ova četiri genotipa i ostali otkriveni genotipovi porede međusobno. Bilo bi idealno sprovesti studiju u kojoj bi se poredili aktivnost ALT, viremija, HBeAg/antiHBe status, aktivnost hepatitisa, stepen fibroze i progresija u cirozu jetre i HCC kod svih poznatih genotipova. Interesantno je istraživanju japanskih autora (Doung i sar. 2004.), u kome su poređeni bolesnici sa infekcijom genotipovima C i D. Većina bolesnika sa

genotipom D (84,2%) bili su asimptomatski nosioci. Genotip D nije bio prisutan kod bolesnika sa cirozom jetre i HCC. BCP mutacije (A1762T i G1764A) bile su značajno ređe kod infekcije genotipom D u odnosu na genotip C, među HBeAg negativnim bolesnicima. Genotip C bio je uzročnik hronične HBV infekcije, dok je genotip D bio u vezi sa asimptomatskim nosilaštvom virusa i ranijom HBeAg serokonverzijom (Dong i sar. 2004.). Zahvaljujući prilivu stanovništva iz različitih krajeva sveta (iz Azije, Evrope, Afrike, sa Kariba i Madagaskara), francuski istraživači (Ganne-Carrié i sar. 2006.), kod 109 bolesnika sa HHB, pored genotipa A (26.6%) i D (18.3%), tipičnih za Evropu, dokazali su u značajnom procentu i genotipove B (12.8%), C (18.3%) i E (14,7%). To je omogućilo poređenje ovih 5 različitih genotipova. Rezultati su ukazali na visoku prevalencu antiHBe antitela kod genotipa D, zatim višu aktivnost serumskih transaminaza kod genotipova A i D u odnosu na ostale genotipove. Infekcija genotipovima A, C i D bile su praćene izraženijom fibrozom tj. težom formom bolesti, nego kod genotipova B i E. Pre-C i BCP mutacije bile su prisutne kod 87% antiHBE pozitivnih bolesnika i u vezi sa genotipom D (Ganne-Carrié i sar. 2006.).

U jednoj američkoj studiji kod 694 bolesnika sa HHB utvrđeni su genotipovi A, B, C i D (Chui sar. 2003.). Kod genotipova B i D prevalencije HBeAg je bila niža nego kod genotipa A. Slično rezultatima autora iz Francuske, genotip B je imao povoljniji tok, sa nižom stopom dekompenzacije jetre u odnosu na genotipove A, C i D.

Iskustvo iz više studija svedoči da su tok i ishod HHB teži kod genotipova C i D u odnosu na A i B. Ciroza jetre i HCC se češće dijagnostikuju kod genotipova C i D, nego kod genotipova A i B (Shi 2012.).

Može se reći da u zapadnim zemljama (gde su dominantni genotipovi A i D), HHB ima višu incidencu ciroze, ali nižu incidencu HCC, u odnosu na azijske zemlje (gde dominiraju genotipovi B i C). U fazi asimptomatskog nosilaštva virusa tokom vremena može doći do reaktivacije hepatitisa kod jedne četvrtine do jedne trećine HBsAg pozitivnih bolesnika. Reaktivacija se češće dešava kod muškaraca i kod infekcije genotipovima D, C i B (Liaw i sar. 2010.)

Analogno genotipovima, i pojedini subgenotipovi imaju uticaj na tok HBV infekcije.

Kod bolesnika o ovom istraživanju uočena je razlika u progresiji infekcije između inficiranih pojedinih subgenotipovima. Tako je najkraće vreme do potrebe za

antivirusnom terapijom proteklo kod subgenotipa D1 samo  $11\pm 2$  godine. Nešto duže vreme je bilo potrebno do uvođenja lamivudina za subgenotipove D2 i D3 -  $15\pm 1$  i  $14\pm 1$  godina. S obzirom na povoljniji tok genotipa A i činjenice da su svi bolesnici imali subgenotip A2, najduže vreme do potrebe za antivirusnom terapijom bilo je upravo kod ove grupe bolesnika i iznosilo je  $22\pm 2$  godine.

Subgenotip A2 pored Evrope, prisutan je u SAD i na Arktiku. Kod osoba koje imaju infekciju subgenotipom A2, HCC se javlja u kasnijem životnom dobu u odnosu na osobe inficirane subgenotipom A1. Stopa komplikacija, uključujući i HCC, kod osoba sa subgenotipom A2 niža je u odnosu na genotipove D, C i F1 (Livingstone i sar. 2007., Sanches-Tapias i sar. 2002.). Poređenjem bolesnika sa subgenotipom A1 i subgenotipom A2, zaključeno je da kod infekcije subgenotipom A1 dolazi do ranijeg gubitka HBeAg i pojave antiHBe antitela u odnosu na subgenotip A2 (Hadziyannis 2011.).

Infekcija subgenotipom A1 praćena je visokom stopom HCC u Subsaharskoj Africi. Kod bolesnika sa HCC, genotip A je dominantan sa prevalencom 86,5%, te nosi 4,5 puta veći rizik za HCC u odnosu na genotipove D i E. U ovom području je dokazan samo subgenotip A1. Bolesnici sa HCC i infekcijom uzrokovanom subgenotipom A1, značajno su mlađi od bolesnika sa drugim genotipovima i HCC. Navedeni rezultati govore o visokom riziku za HCC kod subgenotipa A1 (Kew i sar. 2005.).

Uticaj HBsAg subtipova na tok bolesti retko je bio predmet ispitivanja. Kod bolesnika u ovom istraživanju dokazana je najbrža progresija u cirozu kod bolesnika sa HBsAg subtipom ayw4 koja je iznosila samo 12 godina, za razliku od ostalih dokazanih HBsAg subtipova gde se kretala od 23-26 godina. Zaključak nije sasvim pouzdan jer je u ispitivanoj grupi bilo malo bolesnika sa ovim HBsAg subtipom – samo 1,2% bolesnika.

HCC je peti najčešći tumor i po smrtnosti koju izaziva zauzima visoko treće mesto (Parkin i sar. 2005.). Više od 50% slučajeva HCC širom sveta prouzrokovano je HBV infekcijom. U područjima koja su endemska za HBV, ovaj virus je odgovoran za 70-80% slučajeva HCC. Srednje preživljavanje bolesnika sa HCC kao posledicom HBV infekcije je kraće od 16 meseci, dok se petogodišnje preživljavanje kreće od 15-26%. Smatra se da su genotipovi C, D i F, visoka viremija i core/precure mutacije, pored ostalih, faktori rizika za HCC (Nguyen i sar. 2009.).

Tokom praćenja bolesnika u ovom istraživanju, kod 6 (3,7%) bolesnika došlo je do razvoja hepatocelularnog karcinoma i smrtnog ishoda. Kod svih 6 bolesnika HCC se

razvio na terenu ciroze jetre. Radilo se o 2 bolesnika inficirana genotipom A kod kojih je vreme do pojave HCC iznosilo  $26,5 \pm 2,12$  godina i 4 bolesnika inficirana genotipom D kod kojih se HCC razvio posle  $19,6 \pm 5,13$  godina. Iako je vreme do pojave HCC kod genotipa A duže nego kod genotipa D, mali broj bolesnika sa HCC nije dozvoljavao analiziranje uticaja genotipova i subgenotipova na pojavu ovog tumora. Tako mala stopa HCC verovatno je posledica, kako kratkog trajanja hronične infekcije pre početka praćenja kod većine (na početku praćenja 65 (46,1%) bolesnika nije imalo fibrozu), tako i biohemijske i virusološke remisije tokom lečenja. Poznato je da je kontrola viremije udružena sa šest puta manjim rizikom od nastanka ciroze i HCC (Chen i sar. 2006.).

Na mnogo većoj ispitivnoj populaciji Eskima, rizik od razvoja HCC nije se značajno razlikovao za genotipove A i D, a najrizičniji je bio genotip F, sa subgenotipom F1 i to ko mlađih ispitanika (Livingstone i sar. 2007.)

Uprkos postojanju kontradiktornih rezultata, smatra se da je infekcija genotipom D češće udružena sa aktivnom bolešću jetre i uznapredovalom fibrozom u odnosu na infekciju genotipom A, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja. Veza genotipova A i D sa razvojem HCC još uvek nije precizno definisana i zahteva dalja istraživanja (Fattovich i sar. 2008.).

U ispitivanoj polupaciji nije bilo ekstrahepatičnih manifestacija HBV infekcije. Prema dostupnim literaturnim podacima, genotipovi HBV imaju uticaj na učestalost ovih manifestacija. Kod HBsAg pozitivnih Eskima (Hurlburt i sar. 2007.) nađena je najviša incidenca vaskulitisa povezanog sa HBV, ikada saopštena. Ovo je bilo najčešće kod inficiranih genotipom D. Kod kineske dece sa HHB praćene su ekstrahepatične manifestacije i njihova povezanost s genotipovima: glomerulonefritis je bio češći kod genotipa C, nego kod B (Lei i sar. 2012.).

Prevalenca HBeAg-pozitivnog nalaza kod bolesnika uključenih u ovu studiju bila je značajno viša kod genotipa A nego kod D (60,8% prema 30,9%). HBeAg-negativni nalaz bio je češći kod infekcije genotipom D (37,4% prema 21,7%) (Milošević i sar. 2013.).

Walsh i sar. (2011.) pokazali su da je HBeAg, solubilni protein, koji učestvuje u modulaciji imunskog odgovora i doprinosi perzistenciji HBV kod inficirane osobe, te je od važnog uticaja na uspostavljanje hroniciteta. Klinički i eksperimentalni podaci sugerišu da HBeAg u serumu ima imunoregulatornu ulogu u toku infekcije. Suprotno

tome, intraćelijski HBeAg služi kao “meta” imunskog odgovora. Ova dvostruka uloga HBeAg i njegova sposobnost da aktivira T ćelije, ali i da indukuje imunsku toleranciju, svedoči o kompleksnoj interakciji između HBeAg i domaćina (Milich i sar. 2003.).

U Mediteranu i zemljama u njegovom neposrednom okruženju, zastupljen je HBeAg negativan hepatitis. To u mnogome određuje epidemiologiju ove infekcije, ne samo puteve prenošenja, već i stopu prelaska akutne infekcije u hroničnu. Smatra se da je infekcija wt HBV, koja podrazumeva produkciju HBeAg, uslov da akutna infekcija pređe u hroničnu (Hadziyannis i sar. 2001.). U suprotnom infekcija će, bez obzira na uzrast inficirane osobe, imati samo akutnu fazu. Treba imati na umu da HBeAg pozitivan status zapravo predstavlja HBeAg “u višku” u serumu. Drugim rečima, HBeAg ili antiHBeAg negativan status nije apsolutan, već je zapravo stanje ravnoteže imunskih kompleksa (Walsh i sar. 2012.). Zato činjenicu da je hronicitet kod infekcije HBeAg negativnim virusom nemoguć treba primiti sa rezervom. Pored toga, kod istog HBeAg negativnog bolesnika može postojati mešovita infekcija sa wt virusom i preC mutantnom formom. Tako daljim širenjem ovakve mešovite infekcije, novoinficirana osoba može biti HBeAg pozitivna zbog selekcije wt virusa.

Podaci iz literature govore da je prevalenca HBeAg negativnog hepatitisa 33% na Mediteranu, 15% u Aziji i 15% u SAD i severnoj Evropi (Funk i sar. 2002.). Pre-C mutacija koja za posledicu ima prestanak sinteze HBeAg, zastupljena je kod 60% ovih bolesnika. U ovom istraživanju nije bila analizirana učestalost pre-C mutacije, ali na osnovu prevalencije HBeAg negativnih slučajeva, može se pretpostaviti da je naša epidemiološka slika slična mediteranskom modelu, budući da je u oblasti Mediterana ova mutacija zastupljena kod 92% HBeAg negativnih hepatitisa (Funk i sar. 2002, Walsh i sar. 2012.).

Za razliku od genotipa D, klasična G1896A mutacija sa posledičnim prestankom sinteze HBeAg, nije karakteristična za genotip A. Genotip A poseduje citozin na poziciji 1858 umesto timidina, koji je prisutan kod većine drugih genotipova. To za posledicu ima stabilizaciju pre-C regiona, te otežava nastanak G1896A mutacije (McMahon 2009.). U jednom istraživanju, poređem genotipova A i D, pre-C mutacija je otkrivena isključivo kod genotipa D (Tanaka i sar. 2004.). Pored toga, Lin i sar. (2011.) pokazali su da genotip D ima višu prevalencu BCP A1762T/G1764A mutacija u odnosu na genotip A.

HBeAg/antiHBe status određuje i rizik za perinatalnu transmisiju HBV infekcije. Ukoliko se ne primene vakcina i hepatitis B imunoglobulin, rizik od HBV infekcije za decu HBeAg pozitivnih majki kreće se do čak 100%, uz rizik za nastanak hroniciteta do 90% (Mast i sar. 2005., Baesly 1983.). Kod majki koje su HBeAg negativne i antiHBe pozitivne, rizik za vertikalnu transmisiju infekcije je manji od 25%, a za hronicitet kod inficirane dece je samo 10-15% (Mast i sar. 2005., Baesly 1983.). Smatra se da je uzrast inficiranih žena u kome dolazi do HBeAg/antiHBe serokonverzije, ključni faktor koji određuje da li će doći do infekcije deteta na rođenju i neposredno posle rođenja.

Poznato je da je i stepen viremije određen HBeAg/antiHBe statusom: kod HBeAg pozitivnih osoba potvrđene su visoke vrednosti viremije od  $10^5$ - $10^{10}$  kopija/ml, a značajno niža viremija, ispod  $10^4$  kopije/ml, kod HBeAg negativnih osoba. I bolesnici u ovom istraživanju sa prisutnim HBeAg imali su više vrednosti viremije u poređenju sa HBeAg-/antiHBe+ i HBeAg-/antiHBe- bolesnicima. Vrednosti HBV DNK u ove tri serološke grupe bile su 4,24, 2,67 i 2,69 log<sub>10</sub> IU/ml HBV DNK. Nismo utvrdili da genotip imao uticaj na viremiju (Milošević i sar. 2013.).

Kod samo 4 (2,5%) bolesnika iz ove studije, jednog s genotipom A i tri sa D, infekcija je prenetá vertikalno (Milošević i sar. 2013.). Ovo je u saglasnosti sa ervo-mediteranskim epidmiološkim modelom HBV infekcije. Objašnjenje za ovu pojavu bi mogla biti mala učestalost HBeAg pozitivnosti među ženama u toku reproduktivnog perioda (Hadziyannis 2011.). Nasuprot ovome, u Aziji je drugačija slika, sa većom verovatnoćom za perinatalno prenošenje HBV. Smatra se da je najmanje 50% žena HBeAg pozitivno u vreme porođaja, za razliku od 15% žena u Africi i severozapadnoj Aljasci, gde je perinatalna transmisija retka (Livingstone i sar. 2007). Slično je pokazano i kod Eskimki inficiranih genotipovima A i D u odnosu na C. Utvrđeno je da kod 50% inficiranih genotipovima A i D došlo do gubitka HBeAg pre 20. godine, za razliku od inficiranih genotipom C, kod kojih se serokonverzija desila čak 30 godina kasnije, u 5. deceniji (Livingstone i sar. 2007.). Ovakvi rezultati ukazuje da Eskimke inficirane genotipom C imaju HBeAg tokom reproduktivnog perioda, za razliku od žena inficiranih A i D genotipovima, koje u reproduktivnom dobu imaju antiHBe antitela (Livingstone i sar. 2007.). Ovi zaključci sugerišu da u delovima sveta gde je perinatalna transmisija glavni put infekcije, dominira genotip C. Možemo da zaključimo da su odsustvo genotipa

C i dominacija genotipa D, za koji je karakterističan nedostatak HBeAg, moguće objašnjenje za malu zastupljenost vertikalne transmisije u Srbiji.

Pre uvođenja lamivudina u terapiju HHB, jedina terapijska opcija bila je interferon alfa. Veliki napredak je učinjen razvitkom pegilovanog interferona koji je konformniji za bolesnika, uz stabilnu apsorpciju, povećanu raspoloživost leka, stabilniju i dugotrajniju koncentraciju u serumu, samnjenu enzimsku razgradnju itd. Ispitivanje HIV infekcije i ulazak u eru antiretrovirusne terapije, značio je nove terapijske mogućnosti za lečenje hronične HBV, s obzirom da je za oba virusa enzim reverznu transkriptazu, neophodan za replikaciju. Prvi lek iz grupe NA korišćen u terapiji HHB, bio je lamivudin, a potom su sledili adefovir, entekavir, telbivudin i tenofovir. Ovi lekovi inhibiraju HBV DNK polimerazu direktnom ugradnjom u toku replikacije virusne DNK, čime blokiraju elongaciju virusne DNK ili ireverzibilnim blokiranjem reverzne transkriptaze.

Stopa HBeAg/antiHBe serokonverzije kreće se oko 30% lečenih konvencionalnim ili pegilovanim interferonom alfa i oko 20% kod terapije NA posle 48 nedelja terapije.

Prvi rezultati o uticaju genotipova HBV na uspeh antivirusne terapije tiču se lečenja interferonom alfa. Istraživanja su pokazala da je terapijski uspeh standardnim interferonom bolji kod bolesnika sa genotipom B u odnosu na genotip C, kao što je uspeh u lečenju infekcije genotipom A veći nego kod genotipa D (Liu i sar. 2005.). Prema dostupnim podacima genotipovi E, F i H su senzitivni na interferon (Erhardt i sar. 2009.).

Hou i saradnici (2007.) ispitali su uticaj genotipova A i D na uspeh terapije interferonom kod 103 evropska bolesnika sa HHB. Utvrđeno je da je genotip A pozitivan prediktor za uspeh kratkotrajne terapije (16 nedelja). Nasuprot tome, genotipovi HBV nisu imali uticaj na uspeh duže terapije (32 nedelje). Sudeći po ovim rezultatima optimalna dužina terapije HHB interferonom alfa mogla bi da varira u zavisnosti od genotipa (Hou i sar. 2007.).

U jednom istraživanju uspeha terapije HHB pegilovanim interferonom kod 542 bolesnika, zaključeno je da je infekcija genotipom A sa visokom aktivnošću ALT i/ili niskom viremijom nosila verovatnoću od 30% za terapijski uspeh. Šansa za uspešnu terapiju pegilovanim interferonom kod bolesnika sa infekcijom genotipom D bila je mala,

nezavisno od vrednosti ALT i viremije, te inficirani genotipom D nisu kandidati za terapiju pegilovanim interferonom (Buster i sar. 2009.).

Kod 307 HBeAg pozitivnih holandskih bolesnika, Janssen i sar. (2005.) sproveli su lečenje pegilovanim interferonom alfa-2b i kombinacijom ovog leka i lamivudina. Kombinovana terapija nije uticala na uspeh lečenja, tačnije nije se pokazala superiornom u odnosu na monoterapiju pegilovanim interferonom alfa-2b. Gubitak HBeAg kod lečenih bolesnika zavisio je od genotipa: najbolji rezultati su bili kod genotipa A (47%), potom kod genotipa B (44%), genotipa C (28%) i najlošiji kod genotipa D (25%).

U jednom multicentričnoj studiji kod 266 HBeAg pozitivnih bolesnika lečenih pegilovanim interferonom alfa-2b, ispitivan je gubitak HBsAg u zavisnosti od genotipa. Rezultati su pokazali da je gubitak HBsAg iznosio je 14% za genotip A, 9% za genotip B, 3% za genotip C i samo 2% za genotip D. Nedvosmisleno je dokazan bolji terapijski uspeh kod genotipa A, ne samo u odnosu na genotip D, već i na genotipove B i C (Flink i sar. 2006.).

Za razliku od interferona, ispitivanje uticaja genotipova na terapijski odgovor kod nukleozidnih/nukleotidneih analoga davalo je kontradiktorne rezultate. Smatra se da se uspeh ne razlikuje značajno u zavisnosti od genotipa HBV (Liu i sar. 2005., EASL 2012.). Poznato je da se tokom terapije lamivudinom, pored ostalih, javljaju i mutacije u YMDD (tirozin, metionin, aspartat, aspartat) motivu C domena DNK polimeraze, koje su odgovorne za neuspeh terapije.

Lamivudinom lečeno je 85 bolesnika koji su ispunili kriterijume za započinjanje antivirusne terapije (EASL 2012.). Nije bilo neželjnih efekata vezanih za terapiju ovim lekom.

U grupi lečenih, 41 (48,2%) bolesnik je bio HBeAg pozitivan. Stopa HBeAg/antiHBe serokonverzije iznosila je 36,6% posle  $2,4 \pm 0,9$  godina. Značajno višu stopu HBeAg/antiHB serokonverzije, tokom terapije lamivudinom, zabeležena je kod bolesnika sa genotipom D (93,3%) u odnosu na genotip A (6,7%). Najčešće se serokonverzija u antiHBe pojavljala kod subgenotipa D3 (60%), potom kod D2 (26,7%), a najređe kod D1 i A2 (6,7%). U ovoj podgrupi bolesnika HBsAg subtip ayw2 je bio najčešći (66,7%), potom je sledio HBsAg subtip ayw3 (26,7%), dok adw2 bio najređi (samo 6,7%, što je očekivano jer su svi sa infekcijom genotipom A imali ovaj HBsAg subtip).



U ovom istraživanju uspeh terapije lamivudinom nije se razlikovao kod bolesnika sa genotipom A u odnosu na D. Slična zapažanja u vezi terapije lamivudinom, izneli su Zalewska i sar. 2005. godine za poljske bolesnike, kod kojih dominira genotip A u odnosu na D. Posle 12 meseci terapije lamivudinom došlo je do pada viremije i aktivnosti ALT kod oba genotipa. Nije bilo razlike između genotipova A i D u pogledu viremije, HBeAg serokonverzije i aktivnosti ALT (Zalewska i sar. 2005.).

Rezultati nekih istraživanja, pak, govore o različitom ishodu antivirusne terapije kod genotipova A i D. Kod indijskih bolesnika uspeh terapije lamivudinom bio je veći kod genotipa D, nego kod A (28,8% prema 3,5%) (Thakur i sar. 2005.). Palumbo navodi da je stopa rezistencije na lamivudin značajno viša kod genotipa A u odnosu na D, što bi bio razlog većem terapijskom uspehu kod genotipa D (Palumbo 2007.).

Kod HBeAg pozitivnih bolesnika, stopa serokonverzije je tokom prve godine lečenja oko 16%. Nastavak terapije povećava stopu serokonverzije, a neuspeh terapije je određen pojavom mutacija u YMDD motiva. Poznato je da se stopa stopa rezistencije na lamivudin kreće oko 20% za svaku godinu lečenja, te je oko 66% posle tri godine terapije, odnosno preko 80% posle 4 godine (Lok i sar. 2000.). U jednoj azijskoj multicentričnoj studiji kod bolesnika lečenih pet godina, kumulativna stopa YMDD mutacija bila je 15, 38, 55, 67 i 69% za svaku godinu terapije (Leung 2002.).

S obzirom na karakteristike HBV – visok stepen replikacije i nedostatak mehanizama za ispravljanje grešaka tokom nje, neminovno je nastajanje mutacija. Savremena saznanja govore o postojanju YMDD mutacija kod bolesnika koji prethodno nisu lečeni NA, čime je uspeh buduće terapije dodatno kompromitovan. U velikoj kineskoj, multicentričnoj studiji u koju je uključeno preko 1000 nelečenih s NA dokazano je prisustvo YMDD mutacija kod čak 23,3%. Kod većine bolesnika se radilo o mešovitoj wt i YMDD infekciji. Većina bolesnika sa YMDD mutacijama bila je antiHBe-negativna, te autori sugerišu da do YMDD mutacija lakše dolazi u prisustvu pre-C mutacija. Uočena je jasna veza između YMDD mutacija i viremije: veća od  $10^5$  kopija HBV DNK/ml. Isti autori su pokazali povezanost spontano nastalih YMDD mutacija i genotipa C, najbrojnijeg kod ispitivane populacije (Tan i sar. 2012.). Slična veza između genotipa C i YMDD mutacija kod nelečenih bolesnika potvrđena je i u jednoj irskoj studiji, dok kod infekcije genotipom D ove mutacije nisu dokazane (Hogan i sar. 2006.).

Veza između YMDD i genotipova B i C bila je predmet istraživanja i drugih autora, ali nije potvrđena veza između YMDD mutacija nastalih tokom terapije lamivudinom i ova dva genotipa (Kao i sar. 2002., Yuen i sar. 2003.).

Ispitivanjem uticaja HBsAg subtipova na pojavu rezistencije na lamivudin, došlo se do rezultata da HBsAg subtip *adw* (koji korespondira da genotipom A) nosi 20-struko veći rizik za rezistenciju od subtipa *ayw* (karakteričnog za genotip D) (Zöllner i sar. 2001.). HBsAg subtipovi nisu uticali na pojavu rezistencije na lamivudin u ovoj ispitivanoj populaciji.

Dalja istraživanja istog autora, govore o različitim stopama i profilima rezistencije genotipova A i D. Kod genotipa D stopa mutacije *rt204V* bila je značajno viša nego kod genotipa A (81% prema 31%), mada se kod genotipa A brže razvijala. Mutacija *rt180M* bila karakteristična za genotip A, mada je dokazana i kod genotipa D. Druge mutacije karakteristične za rezistenciju dokazane su samo kod genotipa D (Zöllner i sar.2004).

S obzirom da su u Indiji prisutni genotipovi koji cirukulušu i u našoj sredini, zanimljiva su istraživanja koje su sproveli indijski autori. U jednoj indijskoj studiji (Ismail i sar. 2013.) lečeno je 147 bolesnika lamivudinom. Prosečna dužina lečenja je bila 13 meseci (od 8 do 24 meseca). Određivanje vrednosti HBV DNK bilo je mera uspeha terapije. Kod bolesnika su određivane mutacije u domenu revrezne transkriptaze odgovorne za rezistenciju na lamivudin. Razmatrani su faktori koji su uticali na terapijski uspeh i rezistenciju na lamivudin. Povoljan terapijski odgovor zabeležen je kod 35%, dok je terapijski neuspeh zabeležen kod 57%, slično kao u ovom istraživanju. Na pojavu mutacija uticali su visoka viremija i duže lečenje. Visoka aktivnost ALT na početku lečenja bila je u prediktor uspeha terapije. Genotipovi, subgenotipovi i HBsAg subtipovi nisu bili u vezi sa uspehom terapije, ni sa pojavom rezistencijom na lamivudin, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja (Ismail i sar. 2013.).

Kod većine bolesnika terapija lamivudinom dovodi do normalizacije aktivnosti ALT posle 12 meseci terapije, uz supresiju HBV DNK. Stopa normalizacije aktivnosti ALT i nedektibilne HBV DNK viša je kod infekcije genotipom B nego genotipom C. U jednoj japanskoj studiji dokazano je visok nivo HBV DNK nezavini faktor za pojavu YMDD mutacija. Rezultati studije su pokazali da su kod bolesnika sa genotipom C, dominantnim u Japanu, visoka HBV DNK i prisustvo HBeAg faktori udruženi sa pojavom rezistencije (Suzuki i sar. 2003.).

Praćenjem vrednosti aktivnosti serumskih transaminaza, kod bolesnika u ovom istraživanju tokom terapije lamivudinom, otkrivena je statistički značajnu razliku između genotipova ( $48.3 \pm 32.4$  kod genotipa A u odnosu na  $79.78 \pm 54.8$  kod genotipa D, što je posledica porasta aktivnosti ALT kod genotipa D u odnosu na preterapijske vrednosti). Tokom dugotrajne terapije lamivudinom, beleži se porast aktivnosti serumskih transaminaza. Biohemijski proboj, indirektno, ukazuje na prethodno nastali virusološki proboj usled razvoja rezistencije na ovaj NA. Rezistencija na lamivudin, definisana kroz biohemijski i virusološki proboj, dogodila se kod 35% naših bolesnika, posle  $2,4 \pm 0,9$  godina. Prema podacima iz literature godišnja stopa rezistencije na lamivudin je 20-25%, dok posle trogodišnje terapije doseže čak 70% (Lai i sar. 2003.). I pored niže stope HBeAg serokonverzije, ovi rezultati su bolji u odnosu na one iz literature u pogledu stope rezistencije. Rezistencija na lamivudin se u ovom istraživanju javljala nezavisno od pola, uzrasta, nivoa preterapijske viremije. Utvrđeno je da je na pojavu rezistencije na lamivudin kod ispitivanih bolesnika uticao stepen fibroze. Kod onih koji su na početku praćenja imali umerenu do tešku fibrozu, postojala je veća verovatnoća da se razvije rezistencija na lamivudin (76,1%) u odnosu na bolesnike bez fibroze ili sa blagom fibrozom (48,9%) (Milošević i sar. 2013.). I rezultati drugih autora govore da je uspeh terapije NA neizvestan kod uznapredovale bolesti jetre. U jednom istraživanju sprovedenom na bolesnicima sa HBeAg negativnom cirozom, nije bilo razlike u pogledu razvoja HCC i krvarenja iz variksa između lečenih NA (lamivudin, adefovir, entekavir, telbivudin) i kontrolne grupe koja je dobijala simptomatsku terapiju (Jie i sar. 2010.).

Predmet istraživanja je bio i uticaj genotipova na uspeh terapije adefovinom, nakon razvoja rezistencije na lamivudin. Rezultati su bili kontradiktorni. U jednoj multinacionalnoj studiji, kod 694 bolesnika inficiranih genotipovima A, B, C i D nije dokazana veza između uspeha lečenja i pojedinih genotipova (Westland i sar. 2003.). Nasuprot tome, rezultati studije koju su sproveli Buti i sar. (2007.) pokazali su da su genotip D i niska bazalna viremija bili nezavisni prediktori gubitka HBeAg.

U ispitavnoj grupi do smrtnog ishoda došlo je kod 9 (5,6%) bolesnika. Prosečno preživljavanje ispitivanih bolesnika bilo je 28,4 godine i nije zavisilo od pola, uzrasta preko 40 godina, genotipova HBV, subgenotipova i HBsAg subtipova. Vreme preživljavanja nije zavisilo ni od preterapijskog nivoa viremije. Preživljavanje je iznosilo

26,7, 25,3 i 28,8 godina kod bolesnika sa viremijom ispod 2000, 2000–20000 i iznad 20000 IU/ml. Ni preterapijski HBeAg/antiHBe status nije uticao na dužinu preživljavanja. Preživljavanje bolesnika sa progresijom u ESLD iznosilo je 25 godina, i bilo je, očekivano, značajno kraće od preživljavanja bolesnika bez progresije u cirzou koji su imali verovatnoću 100% da prežive 30 godina infekcije.

Uspeh terapije lamivudnom kod bolesnika u ovoj studiji nije zavisio od genotipova, subgenotipova HBV i HBsAg subtipova, što je u saglasnosti sa EASL preporukama za lečenje HHB.

I pored dostupnih rezultata iz drugih zemalja, svakako bi trebalo ispitati uticaj genotipova HBV na uspeh terapije interferonom i drugim NA u populaciji ispitivanih bolesnika sa HHB. U idealnom slučaju, kada bi određeni genotip bio udružen sa lošim terapijskim odgovorom na određeni lek, trebalo bi lečenje započeti sa drugom terapijskom opcijom čime bi se postigao željeni uspeh i smanjili troškovi lečenja. Optimalnu terapiju hronične HBV infekcije treba započeti što ranije, mnogo pre nego što se razvije unapredovala fibroza odnosno ciroza, jer tada uspeh antivirusne terapije dramatično opada ili je ona kontraindikovana. Dosadašnje rezultate ispitivanja uticaja genotipova HBV na uspeh antivirusne terapije, možda treba uzeti sa izvesnom rezervom. Uticaj različitih genotipova na uspeh antivirusne terapije ispitivan je samo kod bolesnika koji su se, u najvećem broju slučajeva, javljali lekaru onda kada su se javile manifestacije manje ili više unapredovale bolesti. Ne treba zaboraviti da u ispitivanje uticaja genotipova na uspeh antivirusne terapije, nisu bili uključeni bolesnici sa manje unapredovalom bolešću kod kojih bi terapija imala najviše koristi. Na žalost, priroda hronične HBV infekcije je takva da izražene tegobe bolesnika najčešće znače da je izgubljeno dragoceno vreme za uspešno lečenje.

## 6. ZAKLJUČCI

S obzirom na postavljene ciljeve istraživanja, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

1. genotipovi A i D, subgenotipovi i HBsAg subtipovi nisu uticali na aktivnost ALT i koncentraciju serumskih albumina kod bolesnika sa HHB tokom 12-mesečnog praćenja;

2. kod bolesnika sa HHB inficiranih genotipom D beleži se produženje protombinskog vremena tokom 12-mesečnog praćenja, za razliku od inficiranih genotipom A, kod kojih se ovaj parametar nije značajno menjao;

3. HBeAg pozitivnost je bila češća kod bolesnika inficiranih genotipom A (a tim i subgenotipom A2 i HBsAg subtipom adw2), u odnosu na genotip D odnosno ostale dokazane subgenotipove i HBsAg subtipove (60,9% prema 30,9%);

4. nivoi preterapijske HBV DNK nisu se značajno razlikovali u zavisnosti od genotipa, subgenotipa i HBsAg subtipova;

5. kod HBeAg pozitivnih bolesnika potvrđena je viša viremija u odnosu na HBeAg-/antiHBe+ i HBeAg-/antiHBe- bolesnike (4,24 log<sub>10</sub> IU/ml u odnosu na 2,67 i 2,69 log<sub>10</sub> IU/ml);

6. kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom B inficiranih genotipom D, dokazana je bržu progresiju bolesti u cirozu jetre, nego kod bolesnika inficiranih genotipom A (15,1±8,4 u odnosu na 23,2±3,4 godine);

7. uspeh terapije lamivudinom, definisan kroz stabilnu imunsku kontrolu, nije zavisio od genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova;

8. teška fibroza i ciroza jetre bili su negativni prediktivni faktori za uspešnost lečenja lamivudinom, definisanu kroz stabilnu imunsku kontrolu, kod bolesnika sa hroničnom hepatitis B virusnom infekcijom;

9. kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom B, bez fibroze i sa lakom fibrozom verovatnoća razvoja rezistencije na lamivudin je niža (48,9%) u odnosu na bolesnike sa teškom fibrozom i cirozom jetre (76,1%);

10. preživljavanje bolesnika sa hroničnom HBV infekcijom nije zavisilo od pola, uzasta, HBV genotipova, subgenotipova i HBsAg subtipova.

## 7. LITERATURA

### A

Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T i sar. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol* 2003;38:315-321.

Alvarado-Mora MV, Pinhro JR. Distribution of HBV genotypes in latin America. *Antivir Ther.* 2013;18:459-465.

Andernach IE, Hübschen JM, Muller CP. Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Rev Med Virol* 2009;19:231-240.

Arankalle VA, Murhekar KM, Gandhe SS, Murhekar MV, Ramdasi AY, Padbidri VS i sar. Hepatitis B virus: predominance of genotype D in primitive tribes of the Andaman and Nicobar islands, India (1989-1999). *J Gen Virol* 2003;84:1915-1920.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83:2059–2073.

### B

Beasley RP, Hwang LY, Lee GC, Lan CC, Roan CH, Huang FY i sar. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet* 1983;2:1099-1102.

Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 2007;11:685-706

Blumberg, BS; Alter, HJ; Visnich, S. A "New" antigen in leukemia sera. *JAMA.* 1965;191:541–546.

Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967;66:924-931.

Blumberg BS. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science* 1977;197:17-125.

Bojović K. Klinički i terapijski značaj genotipova i koncentracije virusne nukleinske kiseline kod hepatitis B i hepatitis C virusne infekcije. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici: 2007.

Bojović K, Božić M, Stanojević B, Popović N. The first results of genotyping hepatitis B virus in Serbia and Montenegro. *Falk Symposium 157. Chronic Hepatitis: Metabolic, Cholestatic, Viral and Autoimmune*. October 10-11, 2006.

Bortolotti F, Guido M, Bartolacci S, Cadrobbi P, Crivellaro C, Noventa F i sar. Chronic hepatitis B in children after e antigen seroclearance: final report of a 29-year longitudinal study. *Hepatology* 2006;43:556-562.

Bouvier GL, Williams A. Serotypes of hepatitis B antigen (HBs Ag): the problem of "new" determinants, as exemplified by "t". *Am J Med Sci* 1975;270:165-71.

Brunetto MR, Giarin MM, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A i sar. Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4186-4190.

Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007;13:65-73.

Buster EH, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW i sar. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology* 2009;137:2002-2009.

## C

Calin R, Guiguet M, Desire N, Imbert-Bismut F, Munteanu M, Poynard T i sar. Role of genotype G hepatitis B virus mixed infection on the progression of hepatic fibrosis in HIV positive patients over 5 years of follow-up. *J Clin Virol* 2013;58:408-414.

Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol* 2009;15:5761-9.

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A i sar. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989;2:588-591.

Chan HL, Tsang SW, Liew C, Tse C, Wong M, Ching JY i sar. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroent* 2002; 97: 406-412.

Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *J Clin Microbiol* 2003;41:1277-1279.

Chan HL, Hui AY, Wong ML, Tse AM, Hung LC, Wong VW i sar. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2004; 53:1494-1498.



Chandra PK, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Panigrahi R, Chakrabarti S i sar. Subgenotypes of hepatitis B virus genotype D (D1, D2, D3 and D5) in India: differential pattern of mutations, liver injury and occult HBV infection. *J Viral Hepat* 2009;16:749-756.

Chang TT, Lai CL, Chien RN, Guan R, Lim SG, Lee CM i sar. Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19:1276-1282.

Chen CJ, Yang HI. Natural history of chronic hepatitis B REVEALed. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:628-638.

Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN i sar. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65-73.

Chen JD, Liu CJ, Lee PH, Chen PJ, Lai MY, Kao JH i sar. Hepatitis B genotypes correlate with tumor recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:64-71.

Chen M, Sallberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV i sar. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 2005;79:3016-3027.

Chen YC, Jeng WJ, Chu CM, Liaw YF. Decreasing Levels of Hepatitis B Surface Antigen Predict Hepatitis B Surface Antigen Seroclearance in Patients With Inactive Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:297-302.

Chen Y, Yu D, Zhang W, Qiu C, Xiang G, Dai W i sar. HBV Subgenotype C2 Infection, A1762T/G1764A Mutations May Contribute To Hepatocellular Carcinoma with Cirrhosis in Southeast China. *Iran J Public Health* 2012;41:10-18.

Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58:258-266.

Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila- Pico C, et al. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003;125:444-451.

Chu CM, Liaw YF. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: A longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline. *J Hepatol* 2005;43:411-417.

Coppola N, Tonziello G, Colombatto P, Pisaturo M, Messina V, Moriconi F i sar. Lamivudine-resistant HBV strain rtM204V/I in acute hepatitis B. *J Infect* 2013;67:322-328.

Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang* 1983;44:197-211.

Curtis M, Hinkle J, Harris J, Borroto-Esoda K, Zhu Y. Tenofovir is equally active in vitro against wild-type HBV clinical isolates of genotypes A-H. Poster presented at: 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases; October 31-November 4, 2008; San Francisco, CA.

## D

Dai CY, Tseng TC, Wong GL, Huang JF, Wong VW, Liu CJ i sar. Consolidation therapy for HBeAg-positive Asian chronic hepatitis B patients receiving lamivudine treatment: a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:2332-2338.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695-698.

Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J i sar. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137.

Delić D. Hronični virusni hepatitis. Zavod za udžbenike: Beograd, 2012.

Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD, Gervain J, Nemecek V, Srtunecy O i sar. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol* 2008;80:1707-1711.

Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC i sar. Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol* 2008;80:20-26.

Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res* 2007;127:177-184.

Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 2008;359:1486-1500.

Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH i sar. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Gastroenterology* 1997;113:1668-74.

Duong TN, Horiike N, Michitaka K, Yan C, Mizokami M, Tanaka Y i sar. Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: a clinical and molecular biological study. *J Med Virol* 2004;72:551-557.

## **E**

Echevarría JM, Avellón A, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J Med Virol* 2005;76:176-184.

El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745-50

Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T i sar. Response to interferon alfa in hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005;54:1009-1013.

Epivir package insert. (PDF). GlaxoSmithKline. Retrieved January 20, 2011. [http://us.gsk.com/products/assets/us\\_epivir\\_hbv.pdf](http://us.gsk.com/products/assets/us_epivir_hbv.pdf)

Erhardt A, Göbel T, Ludwig A, Lau GK, Marcellin P, van Bömmel F i sar. Response to antiviral treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes E-H. *J Med Virol* 2009;81:1716-1720.

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2012;57:167-185.

## **F**

Fattovich G, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW, Christensen E. Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort of 297 patients. *Am J Gastroenterology* 2002;97:2886–2895.

Fattovich G. Natural history of hepatitis B. *Journal of Hepatology*. 2003;39:50–58.

Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 2008;48:335-352.

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-172.

Flink HJ, van Zonneveld M, Hansen BE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Treatment with Peg-interferon alpha-2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *Am J Gastroenterol* 2006;101:297-303.

Fung SK, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology* 2004;40:790-792.

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

## **G**

Gandhe SS, Chadha MS, Arankalle VA. Hepatitis B virus genotypes and serotypes in western India: lack of clinical significance. *J Med Virol* 2003;69:324-330.

Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.

Ganne-Carrié N, Williams V, Kaddouri H, Trinchet JC, Dziri-Mendil S, Alloui C i sar. Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J Med Virol* 2006;78:335-340.

Garcia ML, Byfield R, Robek MD. Hepatitis B Virus Replication and Release are Independent of Core Lysine Ubiquitination. *J Virol* 2009;83:4923-4933.

Ghosh S, Banerjee P, Deny P, Mondal RK, Nandi M, Roychoudhury A i sar. New HBV subgenotype D9, a novel D/C recombinant, identified in patients with chronic HBeAg-negative infection in Eastern India. *J Viral Hepat* 2013;20:209-218.

Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 2007;13:22-38.

Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* 2005;34:1329-39.

Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007;47:598-607.

Guo H, Xu C, Zhou T, Block TM, Guo JT. Characterization of the host factors required for hepadnavirus covalently closed circular (ccc) DNA formation. *PLoS One*. 2012; 7(8): e43270. doi:10.1371/journal.pone.0043270

## **H**

Hadgiyannis SJ. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B – form clinical recognition to pathogenesis and treatment. *Viral hepatitis* 1995;1: 7-36.

Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Immunopathogenesis of hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B infection. *Antiviral Res* 2001;52:91–98.

Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M i sar. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 2003;348:800-807.

Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: natural history and treatment. *Semin Liver Dis* 2006;26:130-41.

Hadziyannis SJ. Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African Countries. *J Hepatol* 2011;55:183-191

Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D, Hadziyannis E. The natural course of chronic hepatitis B virus infection and its management. *Adv Pharmacol* 2013;67:247-249.

Halfon P, Bourlière M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M i sar. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 2006;13:329-335.

Horgan M, Brannigan E, Crowley B, Levis J, Fanning LJ. Hepatitis B genotype and YMDD profiles in an untreated Irish population. *J Clin Virol* 2006;35:203-204.

Hou J, Schilling R, Janssen HL, Hansen BE, Heijntink R, Sablon E i sar. Genetic characteristics of hepatitis B virus genotypes as a factor for interferon-induced HBeAg clearance. *J Med Virol* 2007;79:1055-1063.

Hübschen JM, Mbah PO, Forbi JC, Otegbayo JA, Olinger CM, Charpentier E i sar. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:88-94.

Hurlburt KJ, McMahon BJ, Simonetti JP, Livingston SE, Bulkow LR, Snowball MM i sar. Hepatitis B-associated vasculitis in Alaska Natives: viral genotype, clinical and serologic outcome. *Liver Int* 2007;27:627-32.

## **I**

Ismail AM, Samuel P, Ramachandran J, Eapen CE, Kannangai R, Abraham P. Lamivudine Monotherapy in Chronic Hepatitis B Patients from the Indian Subcontinent: Antiviral Resistance Mutations and Predictive Factors of Treatment Response. *Mol Diagn Ther* 2013 Sep 13.

## **J**

Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y i sar. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005;365:123-129.

Jazayeri SM, Carman WF. Evolution of Hepatitis B Genotype D in the Middle East and South Asia. *Hepat Mon* 2009;9:9-11.

Jie YS, Chen LB, Shu X, Yang XA, Zhang K, Xu QH i sar. The effect of antiviral therapy for patients with HBeAg-negative cirrhosis. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2010;24:45-47.

## **K**

Kann M, Schmitz A, Rabe B. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2007;13:39-47.

Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L, Kane M. Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bull World Health Organ* 1997; 77(10):801-807.

Kao JH. Molecular epidemiology of hepatitis B. *Korean J Intern Med* 2011;26:255-61.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcome in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-859.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-334.

Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002;36:303-304.

Kawaoka T, Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Arase Y, Sezaki H i sar. Efficacy of lamivudine therapy in elderly patients with chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol*. 2007;42:395-401

Kim BK, Revill PA, Ahn SH. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2011;16:1169-1186.

Kim do Y, Chang HY, Lim SM, Kim SU, Park JY, Kim JK i sar.. Quasispecies and pre-existing drug-resistant mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *Gut Liver*. 2013;7:329-334.

Kim K, Kim KH, Kim HH, Cheong J. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXR alpha. *Biochem J* 2008;416:219-230.

Kew MC, Kramvis A, Yu MC, Arakawa K, Hodgkinson J. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype in Bantu-speaking sub-Saharan Africans. *J Med Virol* 2005;75:513–521.

Kim SY, Kim JK, Kim HJ, Ahn JK. Hepatitis B virus X protein sensitizes UV-induced apoptosis by transcriptional transactivation of Fas ligand gene expression. *IUBMB Life* 2005;57:651-8.

Kitrinos KM, Corsa A, Liu Y, Flaherty J, Snow-Lampart A, Marcellin P i sar. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2013.doi: 10.1002/hep.26686.

Klingmuller U, Schaller H. Hepadna virus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol* 1993;67: 7414-7422.

Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T i sar. Clinical features of hepatitis B virus genotype A in Japanese patients. *J Gastroenterol* 2003;38:656-662.

Kobayashi M, Suzuki F, Arase Y, Akuta N, Suzuki Y, Hosaka T i sar. Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001. *J Gastroenterol* 2004;39:844-850.

Koh H, Baek SY, Chung KS. Lamivudine therapy for korean children with chronic hepatitis B. *Yonsei Med J.* 2007 Dec 31;48:927-933.

Koibuchi T, Hitani A, Nakamura T, Nojiri N, Nakajima K, Jyuji T i sar. Predominance of genotype A HBV in an HBV-HIV-1 dually positive population compared with an HIV-1-negative counterpart in Japan. *J Med Virol* 2001;64:435-440.

Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 1967;200:365–373.

Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. *Indian J Gastroenterol* 2005;24:19-22.

Kumar GT, Kazim SN, Kumar M, Hissar S, Chauhan R, Basir SF i sar. Hepatitis B virus genotypes and hepatitis B surface antigen mutations in family contacts of hepatitis B virus infected patients with occult hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:588-98.

Kumar A, Dwivedi M, Misra SP, Narang S, Tiwari BK, Pandey R. Clinical profile, genotype and management updates of hepatitis B virus. *Indian J Virol* 2011;22:1-10.

Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol* 2008;82:8241-8242.

Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology* 2010;40:14-30.

## L

Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI i sar. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:61-68.

Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C i sar. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003;36:687-696.

Lai CL, Gane E, Liaw YF, Hsu CW, Thongsawat S, Wang Y i sar. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2007;357:2576-2588.

Lang T, Lo C, Skinner N, Locarnini S, Visvanathan K, Mansell A. The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *J Hepatology* 2011;55:762-769.

Lazarević I, Čupić M, Delić D, Švrtlih NS, Simonović J, Jovanović T. Distribution of HBV genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes among chronically infected patients in Serbia. *Arch Virol*, 2007;152:2017-2025.

Lazarević I. Analiza genetičke varijabilnosti izolata hepatitisa B virusa. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu: 2008.

Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-45.

Lei XY, Gao X, Yang JL, Sun YH, Sai YP, Yuan H. Relationship between B/C genotype of hepatitis B virus and hepatitis B virus related-nephritis in children. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2012;50:376-379.

Leung N. Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *J Gastroenterol Hepatology* 2002;17:409-414.



Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51:581-592.

Li X, Xu WF. China's efforts to shed its title of "Leader in liver disease". *Drug Discov Ther* 2007;1:84-85.

Li GJ, Hue S, Harrison TJ, Yang JY, Chen QY, Wang XY i sar. Hepatitis B virus candidate subgenotype II varies in distribution throughout Guangxi, China and may have originated in Long An county, Guangxi. *J Med Virol* 2013;85:799-807.

Lin CL, Chen JD, Liu CJ, Lee PH, Chen PJ, Lai MY i sar. Clinicopathological differences between hepatitis B viral genotype B- and C-related resectable hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2007;14: 64–69.

Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C i sar. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*. 2003;36:687–696.

Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver Int* 2009;29:100-107.

Liaw YF, Brunetto MR, Hadziyannis S. The natural history of chronic HBV infection and geographical differences. *Antivir Ther* 2010;15:25-33.

Liaw YF, Sheen IS, Chen TJ, Chu CM, Pao CC. Incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum HBsAg in chronic hepatitis B virus infection: a prospective study. *Hepatology*. 1991;13:627-631.

Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype:Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:123-130.

Livingston SE (a), Simonetti JP, Bulkow LR, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH i sar. Clearance of Hepatitis B e Antigen in Patients With Chronic Hepatitis B and Genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology* 2007;133:1452-1457.

Livingston SE (b), Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE i sar. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis* 2007;195:5-11.

Liu CJ, Kao JH. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin Liver Dis* 2013;33:97-102.

Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int* 2005;25:1097-1107.

Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis* 2005;25:9-19.

Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. *Antivir Ther* 2010;3:3-14.

Lok AS, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, Jovine E i sar. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. *Hepatology* 2000;32:1145-1153.

Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-539.

Lok AS, Ward JW, Perrillo RP, McMahon BJ, Liang TJ. Reactivation of Hepatitis B During Immunosuppressive Therapy: Potentially Fatal Yet Preventable. *Ann Intern Med* 2012;156:743-745.

Luo L, Chen S, Gong Q, Luo N, Lei Y, Guo J i sar. Hepatitis B virus X protein modulates remodelling of minichromosomes related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *Int J Mol Med* 2013;31:197-204.

Lusida MI, Nugrahaputra VE, Soetjipto, Handajani R, Nagano-Fujii M, Sasayama M i sar. Novel subgenotypes of hepatitis B virus genotypes C and D in Papua, Indonesia. *J Clin Microbiol* 2008;467:2160-2166.

Lutgehetmann M, Volz T, Köpke A, Broja T, Tigges E, Lohse AW i sar. In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatology* 2010;52:16-24.

Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M i sar. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 2011;55:996-1003.

Lürman A. Eine icterusepidemie. *Berliner Klinische Wochenshrft* 1985; 22:20-23.

## **M**

Ma M, He M, Liao L, Guo Y, Yu D, Xiong Z i sar. Molecular epidemiology and population dynamics of hepatitis B virus in Dianjiang County, Chongqing, China. *Arch Virol*. 2013 Aug 3.

Madan K, Batra Y, Sreenivas V, Mizokami M, Tanaka Y, Chalamalasetty SB i sar. HBV genotypes in India: do they influence disease severity? *Hepatol Res* 2009;39:157-163.

Madden CR, Slagle BL. Stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein. *Dis Markers* 2001; 17(3): 153-7.

Magnius LO, Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 1972;80:335-337.

Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML i sar. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348:808-816.

Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2008;359:2442-2455.

Marciano S, Galdame OA, Gadano AC. HBV genotype F: natural history and treatment. *Antivir Ther* 2013;18:485-488.

Margeridon-Thermet S, Shulman NS, Ahmed A, Shahriar R, Liu T, Wang C. i sar. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naive patients. *J Infect Dis* 2009;199:1275-1285.

Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC. *Viral Hepatitis.* U: Evans AS, Kaslow RA (eds). *Viral Infection of Humans (Fourth Edition)*, Plenum Medical Book Co., New York, 1997, 363-418.

Mast EE, Alter MJ, Margolis HS. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine* 1999;17:1730-1733.

Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA i sar. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR Recomm Rep* 2005;54:1-31.

Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M i sar. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol* 2009;47:1476-1483.

Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999;6:299-304.

McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2009;3:334-342.

McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis D i sar. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis* 1985;151:599-603.

McMahon BJ, Bulkow L, Simons B, Zhang Y, Negus S, Homan C i sar. Relationship Between Level of HBV DNA and Liver Disease - a Population-Based Study of Hepatitis B e Antigen-Negative Persons with Hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Sep 11. doi:pii: S1542-3565(13)01299-8. 10.1016/j.cgh.2013.09.005.

Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W, Urban S. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* 2013;58:31-34.

Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 2005;79:9810-20.

Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003;38:1075–1086.

Milošević I, Delić D, Lazarević I, Pavlović IP, Korać M, Bojović K i sar. The significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes for the disease and treatment outcome among patients with chronic hepatitis B in Serbia. *J Clin Virol* 2013;58:54-58.

Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003;46:329–338.

Mulyanto, Depamede SN, Surayah K, Tsuda F, Ichiyama K, Takahashi M i sar. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. *Arch Virol* 2009;154:1047-1059.

## N

Nakayoshi T, Maeshiro T, Nakayoshi T, Nakasone H, Sakugawa H, Kinjo F i sar. Difference in prognosis between patients infected with hepatitis B virus with genotype B and those with genotype C in the Okinawa Islands: a prospective study. *J Med Virol* 2003;70:350-354.

Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res* 2008;134:235-249.

Na TY, Shin YK, Roh KJ, Kang SA, Hong I, Oh SJ i sar. Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein-induced lipogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;49:1122-31.

Neisters GMH, Pas S, de Man R. Detection of hepatitis B virus genotypes and mutants: current status. *J Clin Virol* 2005;1:S4-S8.

Nguyen VT, Law MG, Dore GJ. Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden. *J Viral Hepat*. 2009;16:453-463.

Ni YH, Chang MH, Wang KJ, Hsu HY, Chen HL, Kao JH i sar. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:1733–1738.

Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK i sar. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289–309.

Norder H, Courouce A M, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489–503.

## O

Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T i sar. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1777-1780.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y i sar. Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-2583.

## P

Palumbo E. Hepatitis B genotypes and response to antiviral therapy: a review. *Am J Ther* 2007;14:306-309.

Pan C, Zhang JX. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005; 2:36-40.

Panessa C, Hill WD, Giles E, Yu A, Harvard S, Butt G i sar. Genotype D amongst injection drug users with acute hepatitis B virus infection in British Columbia. *J Viral Hepat* 2009;16:64-73.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108

Pollicino T, Saitta C, Raimondo G. Hepatocellular carcinoma: the point of view of the hepatitis B virus. *Carcinogenesis* 2011;32:1122-1132.

Pourkarim MR, Lemey P, Amini-Bavil-Olyae S, Maes P, Van Ranst M. Novel hepatitis B virus subgenotype A6 in African-Belgian patients. *J Clin Virol.* 2010;47:93-96.

## R

Rabe B, Glebe D, Kann M. Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol* 2006;80:5465-5473.

Reijnders JG, Perquin MJ, Zhang N, Hansen BE, Janssen HL. Nucleos(t)ide Analogues Only Induce Temporary Hepatitis B e Antigen Seroconversion in Most Patients With Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 2010;139:491-498.

Roman S, Panduro A. HBV endemicity in Mexico is associated with HBV genotypes H and G. *World J Gastroenterol* 2013;19:5446-5453.

## S

Sampliner RE, Hamilton FA, Iseri OA, Tabor E, Boitnott J. The liver histology and frequency of clearance of the hepatitis B surface antigen (HBsAg) in chronic carriers. *Am J Med Sci* 1979;277:17-22.

Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients, *Gastroenterology* 2002; 123:1848–1856.

Sayan M, Buğdacı MS. HBV vaccine escape mutations in a chronic hepatitis B patient treated with nucleos(t)ide analogues. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47:544-549.

Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2007;13:14–21.

Schulze A, Mills K, Weiss TS, Urban S. Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* 2012;55:373-383.

Segovia MC, Chacra W, Gordon SC. Adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B: history and current uses. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:245-254.

Sheldon J, Rodès B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano A. Mutations Affecting the Replication Capacity of the Hepatitis B Virus. *J Viral Hepat* 2006;13:427-434.

Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 2006;28:112-25

Shi W, Zhu C, Zheng W, Zheng W, Ling C, Carr MJ i sar. Subgenotyping of genotype C hepatitis B virus: correcting misclassifications and identifying a novel subgenotype. *PLoS One* 2012;7:47271.

Shi YH. Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes. *Jpn J Infect Dis* 2012;65:476-482.

Shi Z, Yang Y, Ma L, Li X, Schreiber A. Lamivudine in late pregnancy to interrupt in utero transmission of hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2010;116:147-159.

Song CZ, Bai ZL, Song CC, Wang QW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1521-1524.

Stanojević B, Osiowy C, Schaefer S, Bojović K, Blagojević J, Nešić M i sar. Molecular characterization and phylogenetic analysis of full-genome HBV subgenotype D3 sequences from Serbia. *Infect Genet Evol* 2011;11:1475-1480.

Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, Lee WC. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med* 1975;292:771-774.

Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF i sar. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* 2000;81:67-74.

Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T i sar. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003;37:19-26.

Suzuki Y, Kobayashi M, Ikeda K, Suzuki F, Arase Y, Akuta N i sar. Persistence of acute infection with hepatitis B virus genotype A and treatment in Japan. *J Med Virol* 2005;76(1):33-39.

Suzuki F, Tsubota A, Arase Y, Suzuki Y, Akuta N, Hosaka T i sar. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology* 2003;46:182-189.

Swenson PD, Riess JT, Krueger LE. Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies. *J Virol Methods* 1991;33:27-38.

## **T**

Takkenberg RB, Zaaijer HL, Molenkamp R, Menting S, Terpstra V, Weegink CJ i sar. Validation of a sensitive and specific real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in plasma of chronic hepatitis B patients. *J Med Virol*. 2009;81:988-995.

Tan YW, Ge GH, Zhao W, Gan JH, Zhao Y, Niu ZL i sar. YMDD motif mutations in chronic hepatitis B antiviral treatment naïve patients: a multi-center study. *Braz J Infect Dis* 2012;16:250-255.

Tanaka Y, Hasegawa I, Kato T, Orito E, Hirashima N, Acharya SK i sar. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology* 2004;40:747–755.

Tanwar S, Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Curr Gastroenterol Rep* 2012;14:37–46.

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T i sar. A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. *J Virol*. 2009;83:10538-10547.

Teo CG. Molecular epidemiology of hepatitis B in England and Wales. *J Clin Virol*. 2005;34:S13-14.

Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malkotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroent Hepatol* 2002;17:165-170.

Thakur V, Sarin SK, Rehman S, Guptan RC, Kazim SN, Kumar S. Role of HBV genotype in predicting response to lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Indian J Gastroenterol* 2005;24:12-15.

Thung S. Histologic findings in recurrent HBV. *Liver Transpl* 2006;12:S50-53.

Tralhao JG, Roudier J, Morosan S, Giannini C, Tu H, Goulenok C i sar. Paracrine in vivo inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6991-6996.

Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol* 2008;82:5657-5663.

Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F i sar. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 2010;91:1854-64.

## V

Vaezjalali M, Alavian SM, Jazayeri SM, Nategh R, Mahmoodi M, Hajibeigi B, Azad TM. Genotype of Hepatitis B Virus Isolates from Iranian Chronic Carriers of the Virus. *Hepat Mon* 2008;8:97–100.

## W



Wang HC, Wu HC, Chen CF, Fausto N, Lei HY, Su IJ. Different Types of Ground Glass Hepatocytes in Chronic Hepatitis B Virus Infection Contain Specific Pre-S Mutants that May Induce Endoplasmic Reticulum Stress. *Am J Pathol* 2003;163: 2441–2449.

Walsh R, Nuttall S, Revill P, Colledge D, Cabuang L, Soppe S i sar. Targeting the hepatitis B virus precore antigen with a novel IgNAR single variable domain intrabody. *Virology* 2011;1;411:132-141.

Wasley A, Grytdal S, Gallagher K. Surveillance for acute viral hepatitis--United States, 2006. *MMWR Surveill Summ* 2008;57:1-24.

Westland C, Delaney W 4th, Yang H, Chen SS, Marcellin P, Hadziyannis S i sar. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 2003;125:107-116.

WHO. The World Health Report. WHO, 1997.

WHO. Hepatitis B Fact Sheet No.204 (Revised August 2008). WHO Web site, 2000.

Wong GL, Chan HL, Yu Z, Chan HY, Tse CH, Wong VW. Liver fibrosis progression is uncommon in patients with inactive chronic hepatitis B - a prospective cohort study with paired transient elastography examination. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jul 5.doi: 10.1111/jgh.12327

## Y

Yalcin K, Degertekin H, Bahcecioglu IH, Demir A, Aladag M, Yildirim B i sar. Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey. *Infection* 2004;32(1):24-29.

Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL i sar. REVEAL-HBV Study Group. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1134-1143.

Yi W, Liu M, Cai HD. Safety of lamivudine treatment for chronic hepatitis B in early pregnancy. *World J Gastroenterol* 2012;18:6645-6650.

Yim HJ. Hepatitis B virus genetic diversity and mutant. *Korean J Hepatol*. 2008;14:446-464.

Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006;43:S173-S181.

Yin J, Zhang H, Li C, Gao C, He Y, Zhai Y i sar. Role of hepatitis B virus genotype mixture, subgenotypes C2 and B2 on hepatocellular carcinoma: compared with chronic hepatitis B and asymptomatic carrier state in the same area. *Carcinogenesis* 2008;29:1685–1691.

You J, Sriplung H, Chongsuvivatwong V, Geater A, Zhuang L, Huang JH i sar. Profile, spectrum and significance of hepatitis B virus genotypes in chronic HBV-infected patients in Yunnan, China. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7:27-29.

Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ i sar. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:265–272.

Yuen MF, Lai CL. Adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B infection. *Expert Opin Pharmacother* 2004;5:2361-2367.

Yuen MF, Tanaka Y, Lai CL. Hepatitis B genotypes in chronic hepatitis B and lamivudine therapy. *Intervirology* 2003;46:373-376.

## **Z**

Zachou K, Sarantopoulos A, Gatselis NK, Vassiliadis T, Gabeta S, Stefanos A i sar. Hepatitis B virus reactivation in hepatitis B virus surface antigen negative patients receiving immunosuppression: A hidden threat. *World J Hepatol* 2013;5:387-392.

Zalewska M, Domagała M, Simon K, Gładysz A. Hepatitis B virus genotypes and the response to lamivudine therapy. *Pol Arch Med Wewn* 2005;114:1190-1199.

Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J i sar. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. *J Viral Hepat* 2005;12:609-617.

Zhang HW, Yin JH, Li YT, Li CZ, Ren H, Gu CY i sar. Risk factors for acute hepatitis B and its progression to chronic hepatitis in Shanghai, China. *Gut* 2008;57:1713-1720.

Zhao H, Li J, Li XF, Si CW, Yu M, Gong WB i sar. Clinical characteristics and distribution of hepatitis B virus genotype and sub-genotype. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2007;28:74-77.

Zhong YW, Li J, Song HB, Duan ZP, Dong Y, Xing XY i sar. Virologic and clinical characteristics of HBV genotypes/subgenotypes in 487 Chinese pediatric patients with CHB. *BMC Infect Dis* 2011;11:262-266.

Zöllner B, Peterson J, Puchhammer-Stöckl E, Kletzmayer J, Sterneck M, Fischer L i sar. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004;39:42-50.

Zöllner B, Petersen J, Schröter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 2001;357:934-935.

Zöllner B, Petersen J, Schäfer P, Schröter M, Laufs R, Sterneck M i sar. Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment. *Clin Infect Dis* 2002;34:1273-1277.

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

Zoulim F, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol* 1994;68:6-13.

## SPISAK SKRAĆENICA

HBV	<i>hepatitis B virus</i>
HHB	<i>hronični hepatitis B</i>
HCC	<i>hepatocelularni karcinom</i>
HBsAg	<i>hepatitis B s (površinski) antigen</i>
HBcAg	<i>hepatitis B c antigen (eng. core jezgro)</i>
HBeAg	<i>hepatitis B antigen</i>
antiHBe	<i>antitela na hepatitis B e antigena</i>
cccDNK	<i>cirkularna kovalentno spojena DNK (eng. circular covalently closed DNA)</i>
ELISA	<i>enzimoimuno test (enl. Enzyme-linked immunosorbent assay)</i>
PCR	<i>reakcija lančanog umnožavanja (eng. polymerase chain reaction)</i>
NI	<i>nukleot(z)idni analozi</i>

## BIOGRAFIJA

Dr Ivana Milošević je rođena 1972. godine u Kraljevu. Medicinski fakultet u Beogradu upisala sam školske 1991/92.godine, a diplomirala 2000. godine sa srednjom ocenom 9,30. Pripravnički staž obavila je na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Od 2000. godine je u radnom odnosu u Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije. Poslediplomske studije iz Gastroenterologije upisala je školske 2000/01. godine. Usmeni magistarski ispit je položila 2004. godine sa ocenom deset (10). Magistarsku tezu pod nazivom "Oboljenja jednjaka kod pacijenata inficiranih virusom humane imunodeficijencije (HIV-om)" odbranila je 28.2.2005. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Specijalistički staž iz Infektologije započela je oktobra 2000. godine, a jula 2006. položila je specijalistički ispit sa odličnim uspehom.

Od 2002. godine dr Milošević radi na Stomatološkom fakultetu u Beogradu, najpre kao asistent-pripravnik za predmet Infektivne bolesti, a 2011. godine izabrana je u zvanje asistenta. Od 2011. godine radi i kao klinički asistent na Medicinskom fakultetu.

Bila je član radne grupe Ministarstva zdravlja Srbije za izradu Nacionalog pravilnika za borbu protiv intrahospitalnih infekcija. Član je Komisije za intrahospitalne infekcije Kliničkog centra Srbije. Usavršavala se iz oblasti Intrahospitalnih infekcija u Švajcarskoj (Kantonalna bolnica u Arau, Univerzitetska bolnica u Bazelu). Pohađala je Medicinski seminar iz infektivnih bolesti u Salzburgu 2013. godine. Autor je i koautor više stručnih radova i publikacija, od kojih je šest objavljeno u časopisima indeksiranim u CC/SCI bazi podataka. Član je Lekarske komore Srbije, Srpskog lekarskog društva, Jugoslovenskog društva za antimikrobnu terapiju.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisana Ivana Milošević

broj upisa \_\_\_\_\_

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

**„UTICAJ GENOTIPA VIRUSA HEPATITISA B  
NA KLINIČKI TOK I ISHOD HRONIČNE INFEKCIJE“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

*Marta Murawelau*

U Beogradu, 24.2.2014.

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske  
verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora: Ivana Milošević

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada: "Uticaj genotipa virusa hepatitisa B na klinički tok i ishod hronične infekcije"

Mentor: Prof. Dr Dragan Delić

Komentor: Doc. Dr Ivana Lazarević

Potpisana Ivana Milošević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 24.2.2014.

*Ivana Milošević*

Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### „UTICAJ GENOTIPA VIRUSA HEPATITISA B NA KLINIČKI TOK I ISHOD HRONIČNE INFEKCIJE“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 24.2.2014.

