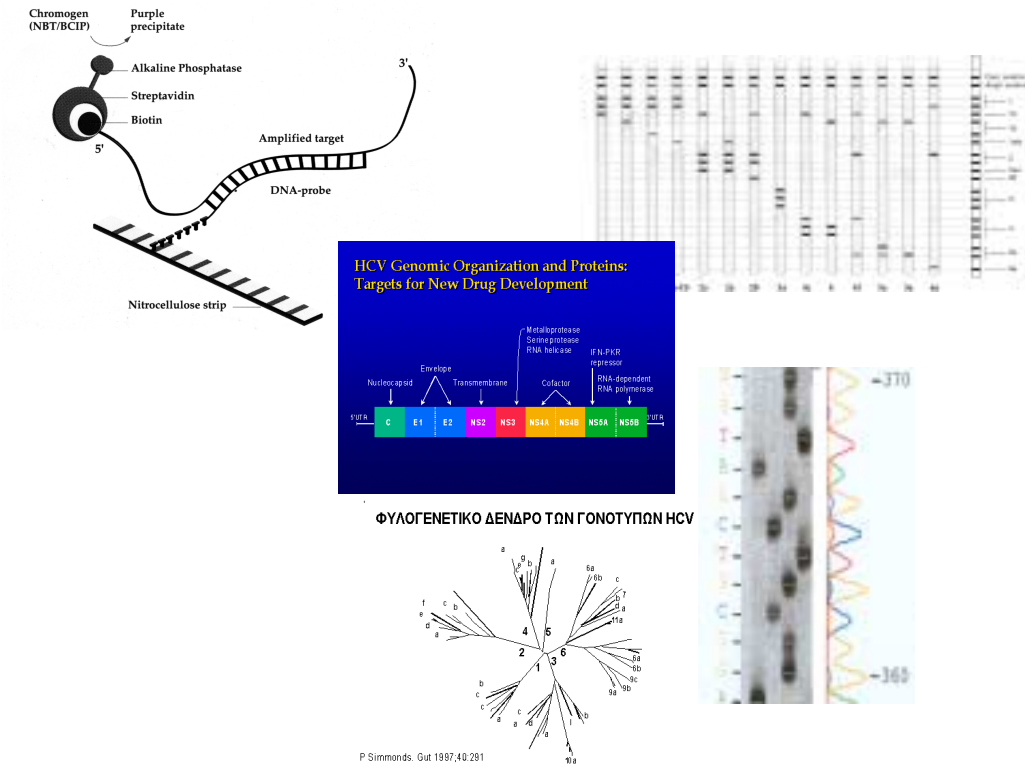


# ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γονιδιακή ανάλυση και ταξινόμηση των ιών ηπατίτιδας C. Κλινικοεργαστηριακές συσχετίσεις



της  
Ειρήνης Στρατιδάκη

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή

Μάρτιος 2001

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Η. Κουρούμαλης Αναπλ.Καθηγητής ( επιβλέπων )

Δ. Μπούρος Αναπλ.Καθηγητής

Δ.Σπαντίδος Καθηγητής

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ. Ηλιόπουλος Καθηγητής

Α. Καφάτος Καθηγητής

Η. Κουρούμαλης Αναπλ.Καθηγητής

Δ. Μπούμπας Αναπλ.Καθηγητής

Δ. Μπούρος Αναπλ.Καθηγητής

Ι. Μουζάς Επικ.Καθηγητής

Δ. Σπαντίδος Καθηγητής

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### 1

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά περί ιού ηπατίτιδας C	7
1.1.1 Οργάνωση γονιδιώματος	8
1.1.2 Επιδημιολογία του ιού	10
1.1.3 Ομάδες υψηλού κινδύνου	12
1.1.4 Οδοί μετάδοσης	14
1.2 Διάγνωση της HCV λοίμωξης	
1.2.1 Ανοσοενζυμικές μέθοδοι	16
1.2.2 Ανοσοαποτύπωμα ανασυνδυασμένων αντιγόνων	17
1.2.3 Ποιοτική και ποσοτική RT-PCR	17
1.2.4 Ποσοτική bDNA	18
1.2.5 Ποιοτική TMA	19
1.2.6 Ταυτοποίηση γονότυπων	20
1.2.7 Βιοψία ήπατος	20
1.2.8 Αξιολόγηση ποσοτικών μεθόδων	20
1.3 Γενετική ετερογένεια και ταξινόμηση σε γονότυπους.	
1.3.1 Βασικές έννοιες	22
1.3.2 Μέθοδοι προσδιορισμού του γονότυπου	25
1.3.3 Γεωγραφική κατανομή γονότυπων	27
1.4 Σχεδόν – είδη ή παρόμοια γονιδιώματα του HCV (quasispecies)	
1.4.1 Ορισμός – βασικές έννοιες	28
1.4.2 Κλινική σημασία των παρομοίων γονιδιωμάτων του HCV	29
1.5 Αντική θεραπεία και παράγοντες που την επηρεάζουν	
1.5.1 Εισαγωγή – στόχοι θεραπείας	31
1.5.2 Τα φάρμακα που διαθέτουμε και οι μηχανισμοί δράσης τους	32
1.5.2α Ιντερφερόνες	32
1.5.2β Ριμπαβιρίνη	35
1.5.2γ Ουρσοδεσοξυχολικό οξύ	36

1.5.2δ	Πεγκυλιώμενες ιντερερόνες	36
1.5.2ε	Consensus ιντερφερόνη	37
1.6	Η NS-5A περιοχή του γονότυπου 1b σαν προγνωστικός παράγοντας στην ανταπόκριση θεραπείας με IFN-a	38

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1	Υλικά	41
2.2	Μέθοδοι	41
2.2.1	Απομόνωση RNA από ορό	41
2.2.2	Αντίστροφη μεταγραφή RNA σε c-DNA & πολλαπλασιασμός του DNA με PCR	42
2.2.3	Μέθοδος προσδιορισμού γονοτύπων με INNO-LIPA	45
2.2.4	Καθαρισμός των PCR προϊόντων	49
2.2.5	Μέθοδος ανάγνωσης αλληλουχιών των PCR προϊόντων	50
2.2.6	Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του HCV-RNA	51

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1	Εισαγωγή	
3.2	Γονοτυπική επιδημιολογία του HCV στην Κρήτη	
3.2.1	Υλικά – ασθενείς – μέθοδοι	53
3.2.2	Αποτελέσματα	57
3.2.3	Συζήτηση	62
3.3	Θεραπευτικά σχήματα	
3.3.1	Υλικά – ασθενείς – μέθοδοι	66
3.3.2	Αποτελέσματα	67
3.3.3	Συζήτηση	87
3.4	Η NS-5A περιοχή σαν παράγοντας πρόγνωσης του 1b γονότυπου στην θεραπεία με IFN-a	
3.4.1	Υλικά – ασθενείς – μέθοδοι	100
3.4.2	Αποτελέσματα	105
3.4.3	Συζήτηση	111

4.	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115
----	--------------	-----

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) , αποτελεί την βασική αιτία της χρόνιας ενεργού μορφής της νόσου, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε μεγάλο ποσοστό σε κίρρωση ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα τελευταία έτη γίνεται προσπάθεια θεραπείας της χρόνιας ενεργού ηπατίτιδας C με την χορήγηση INF-a , ή συνδυασμού με άλλα φάρμακα . Η ανταπόκριση όμως των ασθενών στις διάφορες θεραπείες ποικίλουν και οι παράγοντες που καθορίζουν την ανταπόκριση αμφισβητούνται.

### **ΣΚΟΠΟΣ.**

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν

A. Επιδημιολογική μελέτη των ασθενούντων λόγω μόλυνσης με τον ιό HCV στην ευρύτερη περιοχή της νήσου Κρήτης. Εξετάσθηκε αν υπάρχει αιτιολογική σύνδεση των διαφόρων γονότυπων του ιού με το είδος της προκαλούμενης ηπατοπάθειας , και προσδιορίσθηκε τη σχέση μεταξύ των γονότυπων του HCV και δημογραφικών, παθολογικών και ιολογικών παραμέτρων σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από τον ιό

B. Θεραπευτικά σχήματα. Ανταπόκριση ασθενών σε θεραπείες. Μελέτη διαφόρων θεραπευτικών σχημάτων , βραχυχρόνιος και μακροχρόνιος , βιοχημική και ιολογική ανταπόκριση των ασθενών σε συνδυασμό φαρμάκων , και προσπάθεια καθορισμού παραγόντων που εξασφαλίζουν την βραχυχρόνια ή μακροχρόνια ανταπόκριση των ασθενών σε ένα συγκεκριμένο θεραπευτικό σχήμα.

Γ. Μελέτη των μεταλλαγών της NS-5A περιοχής του ανθεκτικού στην θεραπεία 1b υποτύπου του ιού HCV και η συσχέτιση του αριθμού των μεταλλαγών , με την ανταπόκριση ή όχι στην θεραπεία με INF-a

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### A. Επιδημιολογική μελέτη του ιού HCV στην Κρήτη.

A1. Σε 102 ασθενείς του ηπατολογικού εργαστηρίου του ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν.Η υπόπτους για ηπατίτιδα C με βάση την κλινική τους εικόνα ανιχνεύτηκε RNA του ιού ηπατίτιδας C με μοριακές τεχνικές (home made nested RT-PCR) και επιβεβαιώθηκε η ασθένεια τους.

A2. Για τους παραπάνω ασθενείς έγινε γονιδιακή ταξινόμηση σε υποτύπους με τεχνική αντίστροφου υβριδισμού (INNO-Lipa της INNOGENETICS)

A3. Για τους εν λόγω ασθενείς μετρήθηκε το ιικό φορτίο με εμπορικά διαθέσιμο Kit Amplicor HCV της Roche.

A4. Στους παραπάνω ασθενείς πάρθηκε βιοψία ήπατος , η οποία βαθμονομήθηκε και αξιολογήθηκε με βάση τα κριτήρια Ishak.

- Δεδομένα σχετικά με το φύλλο, την ηλικία, τις τρανσαμινάσες, το ιικό φορτίο, και τα ιστολογικά δεδομένα πάρθηκαν από κάθε ασθενή και συσχετίστηκαν με πολυπαραγοντική ανάλυση με τον γονότυπο. Στο 64 % των ασθενών είχαν μολυνθεί ανιχνεύτηκε ο γονότυπος 1, 13 % είχαν γονότυπο 2 , 18% είχαν γονότυπο 3 ,ενώ μόνο 5% εμφάνισαν γονότυπο 4. Δεν ανιχνεύσαμε άλλο είδος γονότυπου 5 ή 6
- Μεγαλύτερη ηλικία και οι γυναίκες ήταν ανεξάρτητες μεταβλητές σχετιζόμενες με το γονότυπο 1.
- Μικρή ηλικία ,το χαμηλό ιικό φορτίο και το υψηλό staging σχετίστηκαν με το γονότυπο 2.
- Ιστορικό ή χρήστες ναρκωτικών και υψηλή ιαιμία συσχετίστηκαν με γονότυπο 3.
- Χαμηλό staging και χαμηλή ιαιμία για γονότυπο 4.

Στατιστικά σημαντική ήταν μόνο η σχέση ηλικίας και γονοτύπου. Οι ασθενείς με γονότυπο 1 είχαν μέση ηλικία 55,8 σημαντικά μεγαλύτερη από τους μη-1 γονότυπους (p=0.007)

#### B. Θεραπευτικά σχήματα. Ανταπόκριση ασθενών σε θεραπείες.

Μετά από διαγνωσμένη με PCR ηπατίτιδα C, στην Γαστρεντερολογική κλινική του ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν.Η δημιουργήθηκαν οι παρακάτω ομάδες:

1. 30 ασθενείς υποβλήθηκαν σε 3μηνη θεραπεία με 3 MU INF-2a.
2. 35 ασθενείς υποβλήθηκαν σε 6μηνη θεραπεία με 5 MU INF-2a.
3. 60 ασθενείς υποβλήθηκαν σε 12μηνη θεραπεία με 3 MU INF-2a + UDCA.
4. 35 ασθενείς υποβλήθηκαν σε 6μηνη θεραπεία με 5 MU INF-2a + D Penicillamine.
5. 36 ασθενείς υποβλήθηκαν σε 6μηνη θεραπεία με 5 MU INF-2a + νιμεσουλίδη
6. 21 ασθενείς υποβλήθηκαν σε 12μηνη θεραπεία με INF-2a + Ριμπαβιρίνη.

Για όλους τους παραπάνω μετρήθηκαν τρανσαμινάσες , ικό φορτίο πριν και μετά την θεραπεία. Ταξινομήθηκαν γονιδιακά σε υποτύπους και υποβλήθηκαν σε βιοψία η οποία βαθμονομήθηκε κατά Ishak. Τα συμπεράσματα συνοψίζονται στα εξής

- Οι βραχυχρόνιες βιοχημικές ανταποκρίσεις κυμαίνονται από 80% για την ομάδα με 5 MU INF-2a + D Penycilamin έως 47% για την ομάδα με 3μηνη θεραπεία με 3 MU INF-2a.
- Οι βραχυχρόνιες ιολογικές ανταποκρίσεις κυμαίνονται από 48% για την ομάδα με 3 MU INF-2a + rinvabirin, έως 10% για την ομάδα με 3μηνη θεραπεία με 3 MU INF-2a.
- Οι μακροχρόνιες βιοχημικές ανταποκρίσεις κυμαίνονται από 33% για την ομάδα με INF-2a + Ριβαμπιρίνη έως 14% για τις ομάδες με 3μηνη θεραπεία με 3 MU INF-2a και 6μηνη με 5 MU INF-2a.
- Οι μακροχρόνιες ιολογικές ανταποκρίσεις κυμαίνονται από 19% για την ομάδα με INF-2a + Ριβαμπιρίνη έως 0% για την ομάδα 6μηνη θεραπεία με 5 MU INF-2a.

Γενικώς η μακροχρόνιος βιοχημική και ιολογική ανταπόκριση ήταν απογοητευτική. Η πολυπαραγοντική ανάλυση δεν έδειξε συσχέτιση της μακροχρόνιας ανταπόκρισης με το φύλο , ηλικία , ικό φορτίο , γονότυπο ή ιστολογικές παραμέτρους των ασθενών.

#### Γ. Ανάγνωση των αλληλουχιών της NS-5A περιοχής του 1b υποτύπου (sequencing NS-5A region) και συσχέτιση με την ανταπόκριση στην INF-2a

Σε 28 ασθενείς με 1b υπότυπο ενισχύθηκε η NS-5A περιοχή (6741-7275) με RT-nested PCR, απομονώθηκε και καθαρίστηκε το PCR προϊόν και ακολούθως έγινε απ' ευθείας διάβασμα της αλληλουχίας σε αυτόματο sequencer ALF-Express Pharmacia. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με την ανταπόκριση σε θεραπεία με INF-2a.

Τα συμπεράσματα συνοψίζονται στα εξής

- Τα μεταλλαγμένα στελέχη είναι πολύ σπάνια στο υλικό μας.
- Τα αρχέγονα (wild type) στελέχη είναι διαφορετικά σε επίπεδο νουκλεοτιδίων από τα Ιαπωνικά και όμοια με τα Ευρωπαϊκά

- Η βιοχημική ανταπόκριση των μεταλλαγμένων στελεχών είναι ευνοϊκή και μπορεί να προβλεφθεί από τον αριθμό των αμινοξικών μεταλλαγών .Αντιθέτως η ιολογική ανταπόκριση δεν μπορεί να προβλεφθεί .

## **SUMMARY**

### **INTRODUCTION**

Hepatitis C virus (HCV) is the cause of a chronic hepatitis that may frequently evolve into cirrhosis or hepatocellular carcinoma. In recent years many attempts of treating hepatitis C have been made with interferon, either alone or in combination with various drugs. Treatment response however is not uniform and factors determining a favourable outcome are still under investigation.

### **AIM**

The aim therefore of the present investigation was:

- A. To perform an epidemiological study of HCV genotypes in patients with chronic hepatitis C in Crete. Associations among viral genotypes in patients with chronic hepatitis C in Crete. Associations among viral genotypes and disease severity, histological classification, demographic characteristics of patients and viral load were also examined.
- B. To assess response of patients to various therapeutic regimes. Short and long term biochemical and virological response was assessed and an effort to identify factors influencing treatment response was done through univariate and multivariate analysis.
- C. Finally mutation in the NS-5A region of HCV genome were examined as possible factors determining the response to interferon treatment in patients infected with the 1b genotype of HCV.

### **RESULTS**

#### **A. Genotype epidemiology:**

A1. By a home made nested RT-PCR the presence of HCV RNA was verified in 102 patients with liver biopsy proven chronic hepatitis.



A2. Genotypic classification according to Simmonds was performed using reversed

immunoblotting (INNO-Lipa, INNOFENETICS, Belgium).

A3. Viral load was measured using the Amplicor Monitor System (Roche Diagnostics).

A4. The Ishak classification was used for grading and staging of liver biopsies.

- Age, sex, serum transaminases, alkaline phosphate,  $\gamma$ -GT, viral load, histological staging and grading were the variables used in univariate and multivariate analysis to look for correlations with genotypes. 64% of patients were infected with genotype 1. Genotype 2 was present in 13%, genotype 3 in 18% and genotype 4 in 5% of patients. Genotypes 5 and 6 were not detected.
- Female sex and older age were independent variables related to genotype 1.
- Younger age, lower viral loads and high staging were related to genotype 2.
- Intravenous drug abuse and higher viral loads were related to genotype 3.
- Lower staging and lower viral loads were related to genotype 4.

However, only the relation between statistically significant mean age of genotype 1 patients was 55,8 years, significantly higher than non – 1 genotypes ( $p=0,007$ )

#### B. Treatment response

6 treatment schedules were examined:

Group 1 : 30 patients treated for 3 months with 3MU IFN three times a week

Group 2 : 35 patients treated for 6 months with 5MU IFN three times a week

Group 3 : 60 patients treated for 12 months with 3MU IFN three times a week plus 15mg/kg ursodeoxycholate (UDCA)

Group 4 : 35 patients treated for 6 months with 5MU IFN three times a week plus 500 mg D-Penicillamine.

Group 5 : 36 patients treated for 6 months with 5MU IFN three times a week plus 150mg nimesulide

Group 6 : 21 patients treated for 12 months with 5MU IFN three times a week plus 1000mg Ribavirin

Serum enzymes, viral load and genotyping was performed in all these patients before and after treatment. A liver biopsy before treatment was graded and staged according to Ishak classification.

- Short term biochemical response varied between 80% for the D-penicillamine group and 47% for group 1.
- Short term virological response varied between 48% for the ribavirin group and 10% for group 1
- Long term biochemical response varied between 33% for the ribavirin group and 14% for groups 1 and 2.
- Long term virological response varied between 19% for the ribavirin group and 0% for group 2

Long term biochemical and virological response were generally disappointing. Multivariate analysis showed no relation to treatment response of age, sex, viral load, genotypes or histological grading and staging.

#### C. Sequencing of NS-5A region of 1b genotype:

An amplification of the region 6741-7275 of the NS-5A area of 1b genotype was performed by RT-nested PCR in 28 patients infected with this genotype.

The PCR product was isolated and purified and then a direct sequencing of nucleotides was done in an automatic sequencer. Results were correlated with response to IFN treatment. Conclusions can be summarized as follows:

- Mutated viral clones were very rare in Crete
- Wild type clones were different at nucleotide levels from Japanese clones and similar to other reported European clones.

- Biochemical response of mutated viruses is favorable and prediction of response can be made from the number of amino acid mutations. By contrast, virological response cannot be predicted.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Γενικά περί ιού ηπατίτιδας C

Μια μη- A , μη- B , ηπατίτιδα αναγνωρίστηκε στα μέσα της δεκαετίας 1970 αλλά η ταυτοποίηση της με συμβατικές μεθόδους αποδείχθηκε δύσκολη υπόθεση (1-2). Το 1989 ο Choo και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν μοριακές τεχνικές και κατάφεραν να κλωνοποιήσουν ένα γονιδίωμα ιού από χιμπατζήδες που είχαν πειραματικά μολυνθεί με ένα συμπυκνωμένο ανθρώπινο μολυσματικό παράγοντα (contaminated human factor VIII concentrate)(3) Στη συνέχεια με την ανάπτυξη μιας ανοσολογικής δοκιμασίας βασιζόμενης στον προσδιορισμό των κυκλοφορούντων αντισωμάτων έναντι ενός ανασυνδυασμένου επίτοπου , απέδειξαν ότι ο ιός αυτός , που είχε χαρακτηριστεί ως ιός ηπατίτιδας C (HCV) , ήταν η αιτία των περισσότερων περιπτώσεων ανάπτυξης μη-A ,μη -B ηπατίτιδας (4)

Έτσι ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) υπήρξε ο πρώτος ιός ο οποίος έχει ανιχνευθεί και χαρακτηριστεί αποκλειστικά με τη βοήθεια μεθόδων μοριακής βιολογίας , χωρίς προηγουμένως να έχουν καθοριστεί ειδικοί ορολογικοί δείκτες και πριν ακόμα δει κανείς τον ιό κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο .Πριν ακόμα την κλωνοποίηση του ιού , ήταν γνωστές μερικές από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του. Ο ιός ήταν ευαίσθητος σε οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο. Η διάμετρος του υπολογίστηκε γύρω στα 55-65 nm από μελέτες με φίλτρα διαφόρων πόρων και μετάδοση σε χιμπατζήδες .

Αρχικά διατυπώθηκε η υπόθεση ότι επρόκειτο για RNA ιό , συγγενικό με τους Toga η Flavi (5-6) . Χρησιμοποιώντας τον αρχικό κλώνο σαν ανιχνευτή , κατέστη δυνατή η ανακάλυψη και άλλων κλώνων που κάλυπταν όλο το γονιδίωμα του ιού . Φάνηκε ότι η γενετική του οργάνωση ήταν όμοια με εκείνη της οικογένειας των flaviviridae (7) .Στην οικογένεια αυτή μέχρι την ανακάλυψη του HCV , υπαγόταν δυο γένη . Εκείνο των flavi-ίων , με μέλη τον ιό του κίτρινου πυρετού (YF) του δαγείου πυρετού και των Pestiv-ίων, που προκαλούν διάρροια στα βοοειδή (BVDV)και χολέρα στους χοίρους (HgCV) (8) . Οι διαφορές του HCV από αυτούς τους ιούς σε επίπεδο νουκλεοτιδίων αλλά και αμινοξέων , είναι ποικίλες ,ώστε δικαιολογείται η τοποθέτηση του σε δικό του αποκλειστικά γένος .

### 1.1.1 Οργάνωση γονιδιώματος

Ο HCV ιός είναι ένας θετικής αλυσίδας RNA ιός . Το γονιδίωμα του αποτελείται από περίπου 9500 νουκλεοτίδια που σχηματίζουν ένα μονόκλωνο θετικής κατεύθυνσης RNA, το οποίο ενεργώντας ως αγγελιαφόρο RNA με ένα και μοναδικό πλαίσιο αναγνώσεως (ORF = open reading frame) , μπορεί να μεταφραστεί απευθείας σε πρωτεΐνη.

Στο 5' άκρο του πλαισίου υπάρχουν 324-341 νουκλεοτίδια που συνιστούν μία μη κωδικογραφούσα περιοχή (UTR = untranslated region). Η περιοχή αυτή είναι η πλέον συντηρημένη περιοχή , γι αυτό χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό primers – εκκινήτων για την ανίχνευση του ιού με μοριακές τεχνικές PCR . Παρουσιάζει επίσης εκτεταμένη δευτεροταγή δομή λόγω του ενδομοριακού ζευγαρώματος νουκλεοτιδίων με αντίστοιχες περιοχές που έχουν συμπληρωματική ομολογία . Αυτό το ζευγάρισμα έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό αγκυλών που αποτελούνται από θηλιές και είναι αναγνωριστικά στοιχεία της περιοχής . Έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανάγνωση του πλαισίου ORF. Επίσης είναι η εσωτερική περιοχή εισόδου των ριβοσωμάτων ( IRES = internal ribosome entry site )

Στο 3' άκρο μια σειρά από πολυαδενίνες ποικίλου μήκους αποτελούν μια δεύτερη μη κωδικογραφούσα περιοχή (9-11). Η περιοχή του 3' άκρου έχει ρυθμιστικό ρόλο κατά την αναπαραγωγή του ιού και κυρίως για την σύνθεση του αρνητικής κατεύθυνσης γονιδιώματος , που αποτελεί τη μήτρα για σύνθεση των θετικής κατεύθυνσης γονιδιωμάτων των νέων στελεχών του ιού . Τελευταία αποτελεί περιοχή – στόχο για εφαρμογή αντικής θεραπείας με anti-sense ολιγονουκλεοτίδια .

Το πλαίσιο αναγνώσεως κωδικογραφεί μια πολυπρωτεΐνη μήκους 3010 αμινοξέων περίπου , η οποία μετά την μετάφρασή της διαιρείται στις δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Η δομική περιοχή που βρίσκεται στο αμινικό άκρο του γονιδιώματος κωδικογραφεί την πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου (p22) μήκους 191 αμινοξέων , και τις δυο γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος E1 (gp35) και E2/NS1 (gp72) μήκους 192 και 367 αμινοξέων αντιστοίχως .

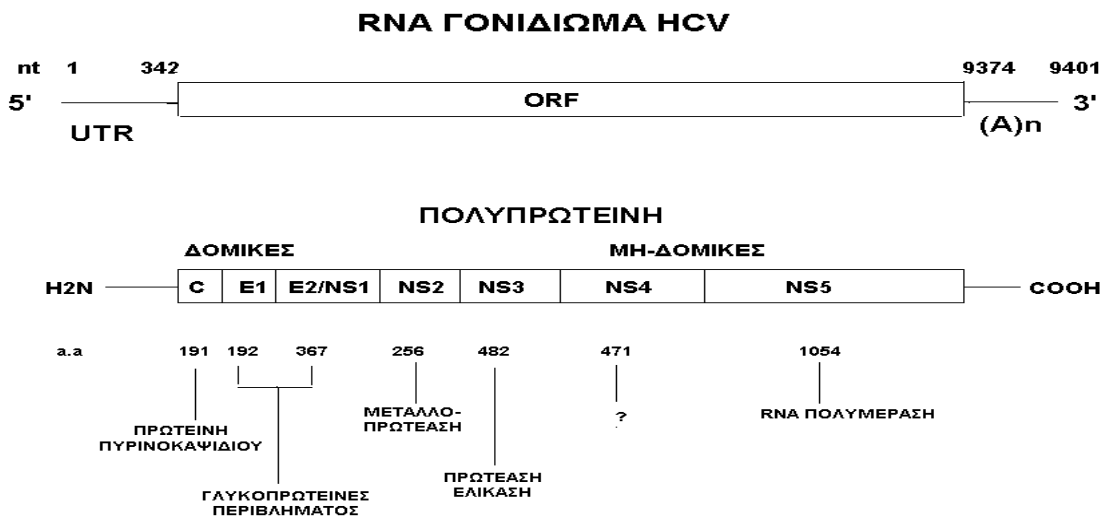
Η περιοχή του πυρηνοκαψιδίου είναι πολύ καλά διατηρημένη με ομολογία 90-100% σε επίπεδο αμινοξέων μεταξύ γονοτύπων . Χρησιμοποιώντας συνθετικά ολιγοπεπτίδια εντοπίστηκε ένας αντιγονικός επίτοπος μεταξύ των αμινοξέων 31-45

που αντιδρά με όλους τους ορούς . Έτσι δικαιολογείται η ευρεία χρησιμοποίηση της πρωτεΐνης αυτής στις διαγνωστικές δοκιμασίες δεύτερης γενιάς (12,13).

Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του περιβλήματος, οι γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2/ NS1 παρουσιάζουν ετερογένεια όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών στελεχών που έχουν απομονωθεί σε διάφορα μέρη του κόσμου , αλλά και μεταξύ στελεχών που έχουν απομονωθεί από διαφορετικούς ασθενείς ή και στον ίδιο ασθενή σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα , μία περιοχή της E1 και δύο της E2 παρουσιάζουν υπερμεταβλητότητα , πιο πολύ όμως η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 386-411 της πολυπρωτεΐνης που βρίσκεται στην αρχή του αμινικού άκρου της E2/ NS1 (14).

Οι μη δομικές πρωτεΐνες είναι γνωστές σαν NS2 , NS3 , NS4 , και NS5 μήκους 256 , 482 , 471 και 1054 αμινοξέων αντιστοίχως. Χαρακτηριστικές λειτουργίες έχουν αποδοθεί στις μη δομικές πρωτεΐνες λόγω της ομολογίας νουκλεοτιδίων με άλλες πρωτεΐνες με γνωστή λειτουργικότητα ή απευθείας χρησιμοποιώντας λειτουργικούς προσδιορισμούς ( functional assays).Για παράδειγμα αναφέρουμε ότι η περιοχή NS5 κωδικογραφεί μια πρωτεΐνη 1054 αμινοξέων που ενεργεί σαν RNA πολυμεράση στον πολλαπλασιασμό του ιού. Η άποψη αυτή βασίστηκε στην παρουσία του μοτίβου GDD, δηλαδή γλυκίνη και δύο μόρια ασπαραγινικού οξέος , που είναι χαρακτηριστικό όλων των RNA πολυμερασών θετικής κατευθύνσεως των RNA ιών ζώων και φυτών ( 15 ).

Η NS2 έχει ιδιότητες μεταλλοπρωτεϊνάσης . Η NS3 είναι από τις πιο πολυμελετημένες πρωτεΐνες του ιού και αποτελεί στόχο για νέες προσεγγίσεις αντικής θεραπείας . Έχει ιδιότητες σεριν-πρωτεάσης με ρόλο στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης , καθώς και ελικάσης σχετιζόμενης με τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η πρωτεΐνη αυτή δεν υπόκειται σε περαιτέρω πρωτεολυτική επεξεργασία για το διαχωρισμό των δύο ιδιοτήτων. Αυτό ίσως υποδηλώνει λειτουργική αλληλεξάρτηση μεταξύ των δύο τομέων (16,17).

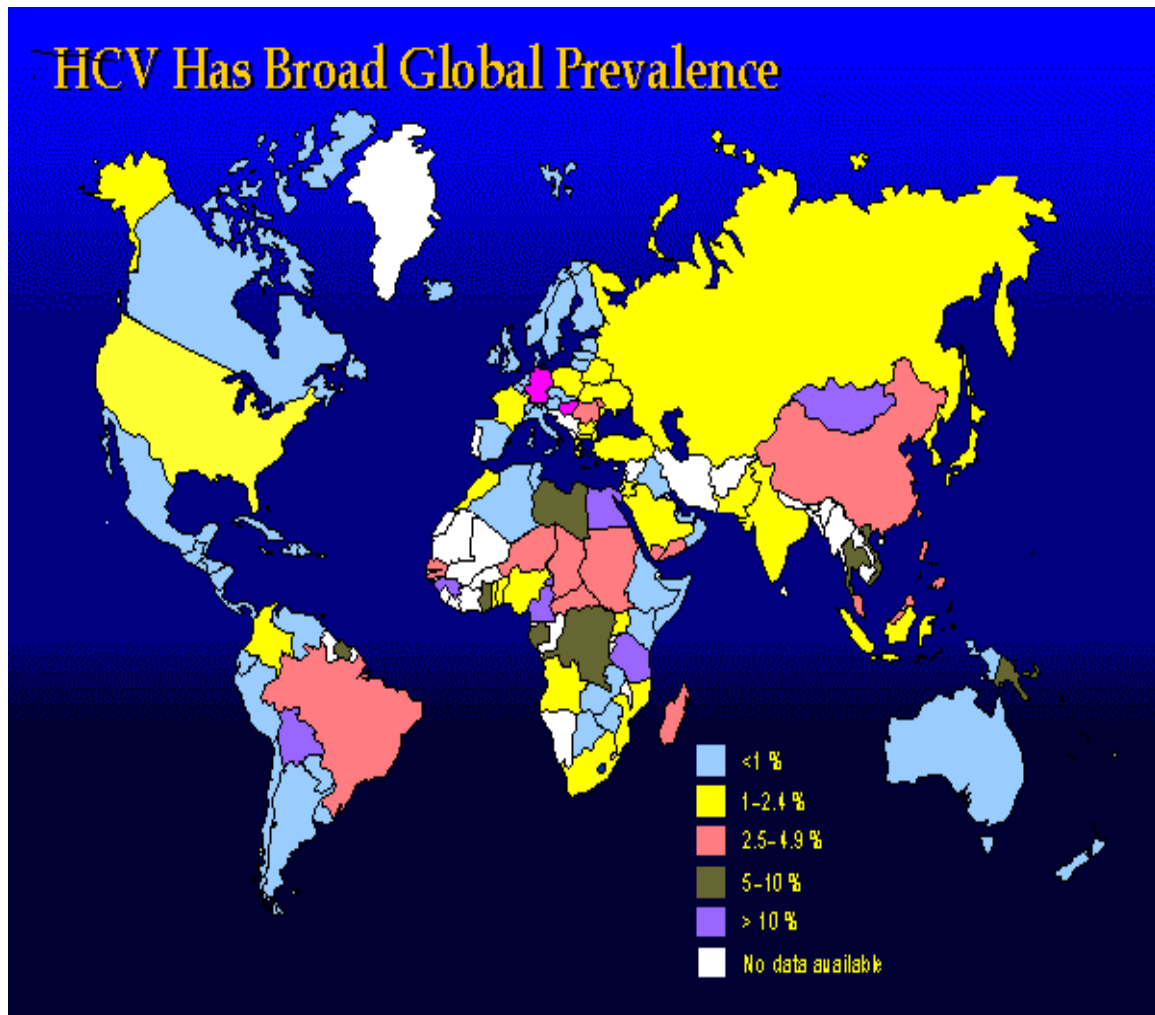


Σχήμα 1. Γενετική οργάνωση του γονιδιώματος και της πολυπρωτεΐνης του HCV.

### 1.1.2 Επιδημιολογία του ιού της ηπατίτιδας C

Η ηπατίτιδα C αποτελεί σήμερα πολύ σημαντικό πρόβλημα υγείας. Η παγκόσμια οργάνωση υγείας υπολογίζει ότι υπάρχουν τουλάχιστον 250 εκατομμύρια φορείς σε παγκόσμια κλίμακα από τους οποίους 4 εκατομμύρια είναι στις ΗΠΑ και 5 εκατομμύρια στη Δυτική Ευρώπη (18). Μόνο στις ΗΠΑ ο HCV είναι υπεύθυνος για 8.000-10.000 θανάτους ετησίως λόγω χρόνιας ηπατοπάθειας ή ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Ο επιπολασμός φαίνεται να είναι υψηλότερος στην Ανατολική από ότι στη Δυτική Ευρώπη

Στο χάρτη που ακολουθεί φαίνεται ο επιπολασμός του ιού σε παγκόσμια κλίμακα



Η εμφάνιση νέων κρουσμάτων φαίνεται να είναι 1-3 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα ετησίως. Στην πραγματικότητα η ταχύτητα διάδοσης είναι υψηλότερη διότι η πλειοψηφία των φορέων δεν εμφανίζει πρόβλημα υγείας. Παρά ταύτα ο όρος ασυμπτωματικός φορέας δεν πρέπει να χρησιμοποιείται στην ηπατίτιδα C , δεδομένου ότι τα περισσότερα των προσβεβλημένων ατόμων χωρίς συμπτώματα ή βιοχημικές διαταραχές εμφανίζουν ιστολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ. Φαίνεται όμως ότι η ταχύτητα εξάπλωσης έχει μειωθεί για δύο κυρίως λόγους

- Η μετάδοση από το αίμα και τα παράγωγα του έχει σχεδόν μηδενιστεί, λόγω του έλεγχου των αιμοδοτών
- Η προσοχή σε ενδονοσοκομειακές και παραϊατρικές πράξεις έχει μειώσει την μετάδοση του ιού. Ο μόνος δρόμος για την μετάδοση μένει η παρεντερική χρήση ναρκωτικών . Αλλά και εκεί η ενημέρωση για την μη χρήση βελόνων



πολλαπλών χρήσεων έχει επιφέρει κάποια θετικά αποτελέσματα τουλάχιστον στο να μην αυξάνεται ο επιπολασμός

Η λοίμωξη από τον HCV χαρακτηρίζεται από υψηλού βαθμού μετάπτωση σε χρονιότητα , γεγονός που δημιουργεί σοβαρά προβλήματα δημόσιας υγείας . Όπως εμφανίζονται στο σχήμα 2 τα συμπεράσματα του Γαλλικού Συναινετικού Συνεδρίου 1997 , το 80-85% των προσβεβλημένων ατόμων θα μεταπέσουν σε χρόνια λοίμωξη , το 20% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C θα αναπτύξει κίρρωση μετά από περίπου 15 χρόνια , ενώ το 3-5% των κίρρωτικών από HCV θα αναπτύξει καρκίνο (19) ( Σχήμα 2 )

Έτσι η ηπατίτιδα C είναι μια νόσος που αρκετοί από τους ασθενείς θα πεθάνουν από μια σχετική με το ήπαρ αιτία , αλλά γενικά η πλειοψηφία των μολυνθέντων θα ζήσουν σχεδόν φυσιολογικά . Αρκετοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πιθανή ανάπτυξη κίρρωσης

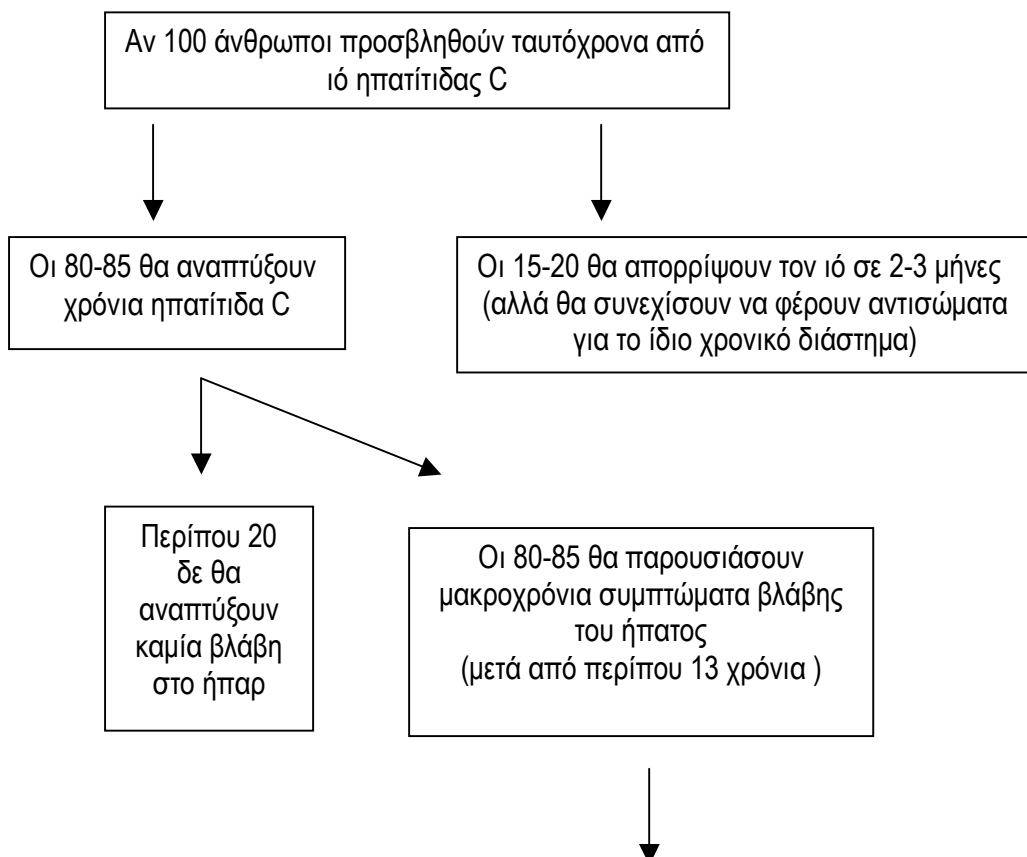
- Η ηλικία κατά την στιγμή της μετάδοσης: Οι νεότεροι έχουν πιο βραδεία εξέλιξη της νόσου
- Αλκοολισμός :Όλες οι μελέτες δείχνουν ότι το αλκοόλ είναι συνενεργός παράγοντας στην μετάπτωση από χρόνια ηπατίτιδα σε κίρρωση
- Συν-μόλυνση με HIV και HBV (19)

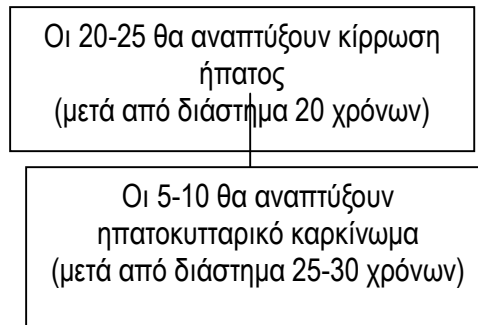
### 1.1.3 Ομάδες υψηλού κινδύνου

Το Γαλλικό συναινετικό Συνέδριο το 1999 (18) έθεσε ερωτήματα με πρακτική σημασία από πλευράς κλινικής ιατρικής και δημόσιας υγείας , όπως για την αναγκαιότητα ορολογικού ελέγχου διαλογής (screening ) για ηπατίτιδα C . Η απάντηση στο ερώτημα ποιοι πρέπει να εξετάζονται ορολογικά για πιθανή μόλυνση από τον HCV, περιλαμβάνει τις παρακάτω πληθυσμιακές ομάδες:

- Πολυμεταγγιζόμενοι , άτομα που είχαν πάρει προϊόντα αίματος πριν το 1991
- Ασθενείς σε αιμοκάθαρση
- Άτομα με πολλαπλούς ερωτικούς συντρόφους
- Άτομα με ιστορικό χρήσεως παρεντερικών ναρκωτικών ( IVDA )
- Άτομα με νοσοκομειακές νοσηλείες
- Πληθυσμοί περιοχών υψηλής HCV ενδημικότητας
- Λήπτες οργάνων

Σχήμα 2 : Πιθανή εξέλιξη προσβολής από τον ιό της ηπατίτιδα C





#### 1.1.4 Οδοί μετάδοσης του ιού C

Ο ιός της ηπατίτιδας C μεταδίδεται κυρίως παρεντερικά με τις παρακάτω διαδικασίες

- Αίμα και παράγωγα του αίματος
- Αιμοκάθαρση – Μεταμοσχεύσεις
- Βελόνες ναρκομανών
- Τατουάζ – εμβόλια

Ως αφανείς παρεντερικοί μηχανισμοί διασποράς ενοχοποιούνται κυρίως η

- γενετήσια επαφή
- ενδοοικογενειακή σχέση
- περιγεννητική (μητέρα – νεογνό )

Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από την συνεκτίμηση των αποτελεσμάτων των διαφόρων επιδημιολογικών μελετών σε παγκόσμια κλίμακα , είναι ότι ο κύριος τρόπος μετάδοσης του HCV είναι η απ'εύθειας παρεντερική έκθεση . Ο κίνδυνος διασποράς με τους αφανείς παρεντερικούς δρόμους είναι υπαρκτός αλλά πολύ περιορισμένος και σαφώς δυσκολότερος από τον τρόπο μετάδοσης του HBV . Η μετάδοση με γενετήσια επαφή είναι σπάνια .Η μετάδοση από μολυσμένους αλλά σταθερούς ερωτικούς συντρόφους, είτε ετερόφυλους ,είτε ομοφυλόφιλους είναι υπαρκτή αλλά μικρή ,ενώ είναι υψηλότερη σε άτομα με πολλούς ερωτικούς συντρόφους (20) .

Η πιθανότητα μετάδοσης από την μητέρα στο παιδί είναι μικρότερη απο 6% ( 21 ) . Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει στην πιθανότητα μετάδοσης από την μητέρα στο νεογνό , το επίπεδο ιαιμίας στην μητέρα . Ο ιός μεταδόθηκε σε ποσοστό 50% σε νεογνά που γεννήθηκαν από μητέρες με τίτλο HCV – RNA  $10^6/ml$  , σε σχέση

με νεογνά που γεννήθηκαν από μητέρες με αρνητικό HCV – RNA ή με τίτλο μικρότερο από  $10^6$  / ml ( 22 ).Παρά ταύτα τα παιδιά συνήθως αρνητικοποιούν το HCV-RNA 6-12 μετά τη γέννηση τους. Αντιθέτως δεν συσχετίζεται ο θηλασμός με την μετάδοση του ιού από τη μητέρα στο βρέφος (23)

Υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών που δεν έχει κανένα απολύτως ιστορικό παρεντερικής ή άλλης πιθανής οδού μετάδοσης της νόσου . Η άγνωστης οδού μετάδοσης ηπατίτιδα C φέρεται σαν σποραδική ή ως αποκτηθείσα στην κοινότητα HCV λοίμωξη . Η κατά καιρούς ενοχοποίηση κουνουπιών και γενικώς αρthropόδων οχημάτων μεταφοράς και μετάδοσης του HCV δεν έχει αποκλειστεί ούτε επιβεβαιωθεί

## 1.2 Διάγνωση HCV λοίμωξης

Οι εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται και είναι αποδεκτές σήμερα για την ανίχνευση του ιού της ηπατίτιδας C , και για την ταυτοποίηση της λοίμωξης είναι κυρίως

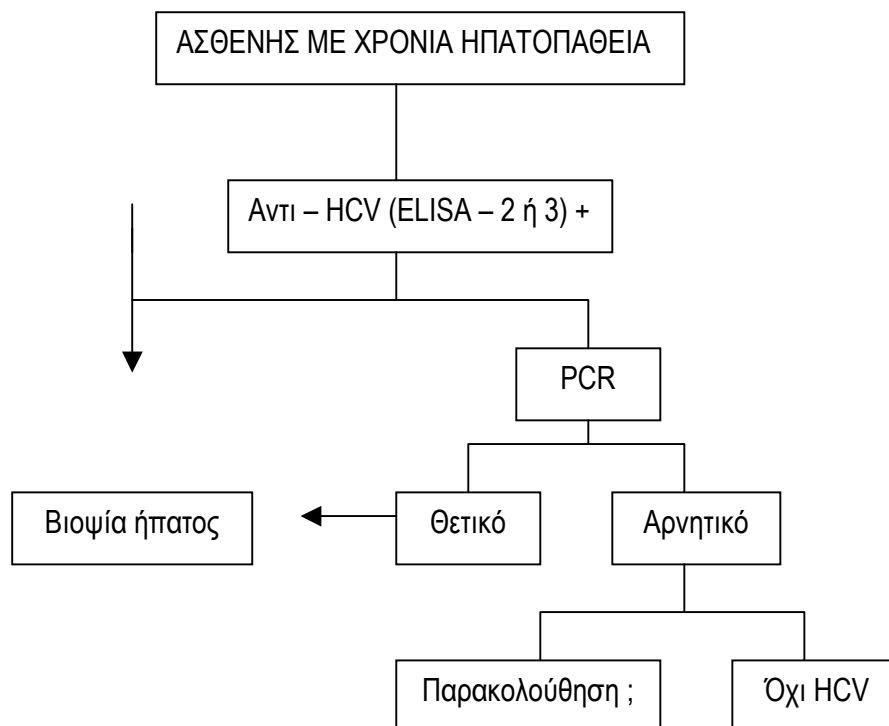
- Ανίχνευση αντισωμάτων ( αντι – HCV )
  - Ανοσοενζυμικές μέθοδοι 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενεάς ( ELISA – 2 , ELISA – 3 )
  - Ανοσοαποτύπωμα ανασυνδυασμένων αντιγόνων ή και συνθετικών πεπτιδίων 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενεάς ( RIBA – 2 , RIBA – 3 )
- Προσδιορισμός HCV RNA
  - Ποιοτική ή ποσοτική εκτίμηση με RT – PCR
  - Ποιοτική εκτίμηση με TMA
  - Ποσοτική εκτίμηση με bDNA
- Ταυτοποίηση γονοτύπων
- Βιοψία ήπατος

Οι ELISA δοκιμασίες είναι σχετικά φτηνές και εύκολες στη χρήση και συνιστώνται για αρχικό έλεγχο γενικού πληθυσμού. (18). Αυτές οι δοκιμασίες είναι αξιόπιστες στους περισσότερους ασθενείς και στο γενικό πληθυσμό, ενώ μπορούν να παρουσιάσουν πρόβλημα στους αιμοκαθαριζόμενους και στους

ανοσοκατεσταλμένους. Ένας ποιοτικός προσδιορισμός του RNA του HCV ενδείκνυται για τελική θετική επιβεβαίωση στα άτομα αυτά.

Σε υψηλής επικινδυνότητας πληθυσμούς και σε κλινικές δοκιμασίες όπου υποψιαζόμαστε παρουσία ηπατίτιδας C , τα θετικά ELISA πρέπει να επιβεβαιώνονται με ποιοτικό προσδιορισμός του RNA του HCV. Σε ασθενείς με αρνητική ELISA δοκιμασία και χρόνια ηπατίτιδα άγνωστης προέλευσης , πρακτικά δηλαδή σε αιμοκαθαριζόμενους και ανοσοκατεσταλμένους πρέπει να γίνεται ποιοτική ανίχνευση του RNA του HCV (Σχήμα 3). Γονοτύπηση και ποσοτική εκτίμηση του RNA συνίσταται μόνο σε ασθενείς πριν την ένταξη τους σε κάποιο θεραπευτικό σχήμα.

Σχήμα 3 : Αλγόριθμος για ασθενή με χρόνια ηπατοπάθεια



### 1.2.1 Ανοσοενζυμικές μέθοδοι 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενεάς ( ELISA – 2 , ELISA – 3

Οι 2<sup>ης</sup> γενεάς ανοσοενζυμικές μέθοδοι ανιχνεύουν αντισώματα από την core ( C22 ) και τις μη δομικές περιοχές 3 και 4 . Στην ορολογική αυτή μέθοδο χρησιμοποιούνται 4 αντιγόνα ( C22 ) , ( C33 ) , ( C –100 –3 ) και (5-11) . Είναι εύκολη στη χρήση και αξιόπιστη .

Σχετικά πρόσφατα εφαρμόστηκε και η 3<sup>ης</sup> γενεας ανοσοενζυμική μέθοδος η οποία διαφέρει από την 2<sup>ης</sup> ότι ενσωματώνει αντιγόνα από την μη δομική περιοχή 5 (NS5) . Είναι πιο ευαίσθητη από την ELISA – 2 αλλά η ευαισθησία εμφανίζεται στην ικανότητα ανίχνευσης κυρίως των αντι- C33 (12,13) .

### 1.2.2 Ανοσοαποτύπωμα ανασυνδυασμένων αντιγόνων ή και συνθετικών πεπτιδίων 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενεάς ( RIBA – 2 , RIBA – 3 )

Το ανοσοαποτύπωμα ανασυνδυασμένων αντιγόνων ή και συνθετικών πεπτιδίων 2<sup>ης</sup> γενεάς ( RIBA – 2 ) , ελέγχει την παρουσία των αντισωμάτων έναντι των 4 αντιγόνων ( C22 ) , ( C33 ) , ( C –100 –3 ) και (5-11) που χρησιμοποιεί και η ELISA - 2. Η RIBA – 3 διαφέρει από τη RIBA – 2 , διότι έχει επιπλέον ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες από την NS5 περιοχή , συνθετικά πεπτίδια από την core και NS3 περιοχή και έτσι βοηθά να αποσαφηνιστούν πολλά αμφίβολα με τη RIBA – 2 δείγματα . Τα αντιγόνα στη δοκιμασία RIBA είναι καθηλωμένα σε ταινίες . Θετική θεωρείται η δοκιμασία όταν αντιδρά με δυο τουλάχιστον ικά αντιγόνα . Η RIBA τεχνικές δεν αποτελούν πραγματικές επιβεβαιωτικές δοκιμασίες , διότι είναι ορολογικές εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούν τα ίδια αντιγόνα του HCV που χρησιμοποιούν και οι ELISA τεχνικές και επιπλέον είναι 100-1000 φορές λιγότερο ευαίσθητες από την ELISA Η τεχνική όμως είναι τέτοια ώστε να αποφεύγονται οι ψευδοθετικές αντιδράσεις που οφείλονται σε υπεργαμμασφαιριναιμία . Καλύτερα να αποφεύγονται και σαν επιβεβαίωση να χρησιμοποιείται η PCR ( 24,25 ) .

### 1.2.3 Ποιοτική ή ποσοτική εκτίμηση με RT - PCR

Πραγματικά, επιβεβαιωτική διαγνωστική εξέταση αποτελεί ο προσδιορισμός του HCV – RNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ( PCR ) . Η άμεση

ανίχνευση των νουκλεϊνικών οξέων του HCV σε ανθρώπινα δείγματα , που έχει καταστεί δυνατή με τη χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας , αντανακλά την ύπαρξη και τον αριθμό των ιικών σωματιδίων και δίνει κατευθείαν στοιχεία σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό του .

Οι τεχνικές PCR αποτελούν τις πιο ευαίσθητες μεθόδους ανίχνευσης HCV – RNA, επιτρέποντας την ανίχνευση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων .Υπάρχουν τεχνικές PCR που αναπτύσσουν μεμονωμένα εργαστήρια , ( in house PCR ) , και εμπορικά διαθέσιμα kit .

Οι in house PCR έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν δυνητικά να ανιχνεύσουν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ( 50 – 100 HCV copies / ml ) ( 26 ) καθώς και πολύ χαμηλό κόστος . Τα σημαντικά μειονεκτήματα των τεχνικών αυτών είναι η χαμηλή αξιοπιστία και επαναληψιμότητα . Σε έλεγχο που πραγματοποιήθηκε το 1993 σε 31 Ευρωπαϊκά Εργαστήρια για την αξιολόγηση της in house PCR μόνο το16% επέτυχε την απολύτως ορθή αξιολόγηση όλων των δειγμάτων (27) . Από τους διάφορους παράγοντες που μπορούν να συμβάλλουν στην αξιοπιστία της μεθόδου είναι

- Συνθήκες αποθήκευσης
- Διαχείριση ορών
- Σχεδιασμός εκκινητών
- Μεταβλητότητα βιοχημικών αντιδράσεων
- Επιμόλυνση προϊόντων αντίδρασης
- Ανίχνευση αποτελέσματος
- Προσωπικό υψηλής εξειδίκευσης

Η ανάγκη να υπάρξουν μέθοδοι ευρέως διαθέσιμοι χωρίς τα παραπάνω προβλήματα της ποιοτικής PCR , που θα μετρούν τα επίπεδα ιαιμίας και θα προσαρμόζουν την θεραπεία αναλόγως , οδήγησε στην ανάπτυξη των ποσοτικών μεθόδων ανίχνευσης του HCV RNA

Οι κύριες εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι PCR έχουν παρασκευασθεί από την εταιρεία Roche Diagnostics . Πρόκειται για την Amplicor HCV (ποιοτική PCR) και Monitor HCV ( ποσοτική PCR ) Οι δοκιμασίες αυτές συνδυάζουν την τεχνική της PCR ,με τον υβριδισμό σημασμένων ανιχνευτών ,που δίνουν φωτομετρικά ανιχνεύσιμο προϊόν δυνάμενο να μετρηθεί ποσοτικά .

Στην ποσοτική PCR , ο καθορισμός της αρχικής ποσότητας των μορίων – στόχων στην αντίδραση επιτυγχάνεται με την χρήση μιας συνθετικής αλληλουχίας , που χρησιμεύει σαν εσωτερικός μάρτυρας και πολλαπλασιάζεται μαζί με την αλληλουχία στόχο .

Η ευαισθησία και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι πολύ υψηλή αφού ανιχνεύει μέχρι και 1000 copies / ml .Στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι υπερτιμά τις συγκεντρώσεις του HCV RNA ορού σε ασθενείς με γονότυπο 2, 3, και 4 . Επίσης δεν έχει καλή αξιοπιστία σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις , οπότε χρειάζεται αραιώση των δειγμάτων ( 29 , 28 )

#### 1.2.4 Ποσοτική εκτίμηση με bDNA

Η πλέον χρησιμοποιούμενη στην κλινική πράξη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού είναι η τεχνική του διακλαδιζόμενου DNA ( bDNA ) .Η εταιρεία Chiron Diagnostics διαθέτει εμπορικά την μέθοδο ( Quantiplex 2.0 ) . Η τεχνική αυτή δεν απαιτεί πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου, αλλά βασίζεται στον πολλαπλασιασμό του σήματος που παράγεται με τον υβριδισμό των νουκλεϊκών οξέων του ιού με ειδικούς ανιχνευτές και ένα συνθετικό μόριο διακλαδιζόμενου DNA (30).

Η ευαισθησία της φθάνει στα 200.000 HCV Eq /ml . Αξιοσημείωτο είναι ότι οι μονάδες copies / ml και Eq / ml που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση του HCV RNA , δεν είναι ισοδύναμες και κατά συνέπεια η ακριβής σύγκριση της ευαισθησίας των τεχνικών Monitor HCV και bDNA δεν είναι δυνατή

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της bDNA Quantiplex 2.0 είναι η καλή αξιοπιστία και επαναληψιμότητα ανεξάρτητα από τον γονότυπο . Δεν παρουσιάζει συχνές επιμολύνσεις λόγω της απουσίας PCR .Βέβαια η πρώτης γενεάς bDNA 1.0 της ίδιας εταιρείας είχε χαμηλότερη ευαισθησία ( 350.000 Eq / ml ) και υποεκτιμούσε το ιικό φορτίο σε ασθενείς με γονότυπο 2 ή 3 γεγονός που δεν συμβαίνει για το δεύτερης γενεάς bDNA Quantiplex 2.0. Παρά ταύτα η τεχνική αυτή σήμερα εγκαταλείπεται λόγω χαμηλής ευαισθησίας.

#### 1.2.5 Ποιοτική εκτίμηση με TMA



Η ποιοτική μέθοδος προσδιορισμού TMA (Transcription-mediated Amplification ) είναι μια ισοθερμική αυτοκαταλυόμενη μέθοδος ενίσχυσης του στόχου RNA που εμφανίσθηκε στην αγορά πρόσφατα .Βασίζεται στην δέσμευση των RNA του ιού σε μαγνητικά σφαιρίδια και στην μετέπειτα ενίσχυση τους με T7 RNA πολυμεράσης. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται υψηλή ευαισθησία 93% και 100% για 25 και 50 copies / ml αντίστοιχα (121).Η ευαισθησία αυτή αναφέρεται ότι είναι ανεξάρτητη από το είδος του HCV γονότυπου.

Περιληπτικά η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει τα εξής στάδια (122) :

1. Προετοιμασία δείγματος : 550 μl ορού με ένα εσωτερικό control επωάζεται με ένα αντιδραστήριο λύσης . Ακολούθως το RNA υβριδίζεται και προσδένεται σε ακινητοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια πάνω σε μαγνητικά σφαιρίδια , ενώ με πολλαπλές εκπλύσεις απομακρύνεται οτιδήποτε άλλο εκτός από το εσωτερικό control και το RNA στόχο.
2. Ενίσχυση στόχου : Προσθήκη δύο ενζύμων (Reverse transcriptase και T7 RNA polymerase) και δυο primers όπου ο ένας περιέχει την αλληλουχία του T7 promotor . Ο εκκινητής που περιέχει το T7 promotor υβριδίζεται στο RNA στόχο και ξεκινά η σύνθεση του c-DNA με την Reverse transcriptase. Η T7 RNA polymerase αναγνωρίζει τον T7 promotor και συνθέτει αντίγραφα.
3. Ανίχνευση – Προσδιορισμός : Για την ανίχνευση χρησιμοποιούνται probes σημασμενοι με εστέρες ακριδίνης που υβριδίζονται στα αντίγραφα του στόχου και στα εσωτερικά controls.

### 1.2.6 Ταυτοποίηση γονοτύπων

Η γονοτύπωση των ιών της ηπατίτιδας C μας δίνει πολύτιμες πληροφορίες για επιδημιολογικές μελέτες αλλά δεν μας βοηθά στη διάγνωση του ιού . Γενικά είναι παραδεκτό ότι οι γονότυποι 1 και 4 δεν ανταποκρίνονται τόσο καλά στην θεραπεία ,όσο οι γονότυποι 2 και 3 , αλλά αυτό δεν αποτελεί λόγο για να μην ενταχθούν σε θεραπευτικά σχήματα οι παραπάνω γονότυποι. Αναλυτικά η μέθοδος περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

### 1.2.7 Βιοψία ήπατος

Η βιοψία ήπατος τείνει να είναι απαραίτητο πλέον στοιχείο τόσο στην διάγνωση ,όσο και στην πορεία της νόσου . Μας δίνει πολύτιμες πληροφορίες για να εκτιμήσουμε την απόδοση θεραπευτικών σχημάτων. Είναι ενδεδειγμένο και πολύτιμο να έχουμε βιοψία πριν ξεκινήσει οποιοδήποτε θεραπευτικό σχήμα. Η βιοψία ήπατος μας δίνει την δυνατότητα να βαθμονομήσουμε την σοβαρότητα της νέκρωσης που έχει επιφέρει η ασθένεια και να σταδιοποιήσουμε την εξέλιξη της ίνωσης (31) . Η εικόνα που μας δίνει η βιοψία σε συνδυασμό με την υπολογιζόμενη διάρκεια της νόσου , την κλινική εικόνα και τις βιοχημικές ανωμαλίες μας οδηγεί στις αποφάσεις που θα πάρουμε για το θεραπευτικό σχήμα . Γενικά είναι παραδεκτό ασθενείς με ήπια ή σοβαρή ίνωση να εντάσσονται σε θεραπευτικά σχήματα

### 1.2.8 Αξιολόγηση των ποσοτικών μεθόδων

Το επίπεδο ευαισθησίας της ποσοτικής PCR Monitor είναι 500 – 1000 αντίγραφα / ml και της bDNA version 2 είναι 200.000 genome Eq / ml . Όμως δεν αντιπροσωπεύουν συγκρίσιμη ποσότητα HCV RNA διότι δεν υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ των μονάδων τους ( copies / ml , και genome Eq / ml ) . Εμφανής είναι επίσης η έλλειψη διεθνούς δείγματος αναφοράς. Φαίνεται όμως ότι η ευαισθησία της ποσοτικής PCR Monitor υστερεί στην ανίχνευση γονοτύπων 2 και 3 , ενώ η bDNA –2 , έχει διορθώσει αυτή την αδυναμία . Ενδιαφέρον εμφανίζει η TMA μέθοδος που έχει δυνατότητα να ανιχνεύσει 25 και 50 copies / ml με ευαισθησία 93% και 100% αντίστοιχα (121). Η ευαισθησία αυτή αναφέρεται ότι είναι ανεξάρτητη από το είδος

του HCV γονότυπου. Όμως η μέθοδος αυτή δεν έχει ακόμη εφαρμοστεί ευρέως στην πράξη.

Παρόλα αυτά η μέθοδος ποσοτικής PCR παρουσιάζει συνολικά υψηλότερη ευαισθησία από την μέθοδο ενίσχυσης σήματος . Έχει βρεθεί ότι το 10–30% των ασθενών θετικών με PCR είναι αρνητικοί στο bDNA (32) . Γενικά όλοι οι ασθενείς που είναι αρνητικοί με την μέθοδο bDNA πρέπει να ελεγχθούν με ποσοτική PCR για να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο να έχουν χαμηλά επίπεδα ιαιμίας που δεν ανιχνεύονται με τη λιγότερη ευαίσθητη μέθοδο .Η παράμετρος της ευαισθησίας είναι πολύ σημαντική για να αξιολογηθεί η ανταπόκριση στην θεραπεία , αφού αν υπάρχουν έστω και χαμηλά επίπεδα ιαιμίας στους 3 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας με IFN συνιστάται η διακοπή της ως μη αποτελεσματική ( 18 ) .

Όσον αφορά στην ειδικότητα και αξιοπιστία των μεθόδων, η ποσοτική PCR Monitor εμπεριέχει όλους τους κινδύνους μίας PCR ,. Βέβαια η ποσοτική PCR Monitor εμπεριέχει ενδογενές σύστημα περιορισμού των επιμολύνσεων και κατά συνέπεια των ψευδώς θετικών αντιδράσεων. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι υπερτιμά τις συγκεντρώσεις του HCV RNA ορού σε ασθενείς με γονότυπο 2, 3, και 4 . Επίσης δεν έχει καλή αξιοπιστία σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις , οπότε χρειάζεται αραίωση των δειγμάτων (29,28).

Η bDNA τεχνική δεν παρουσιάζει προβλήματα επιμολύνσεων επειδή δεν έχουμε πολλαπλασιασμό του σήματος . Τα δείγματα μπαίνουν και διαβάζονται εις διπλούν σύμφωνα με τον κατασκευαστή , αυξάνοντας κατά πολύ την ειδικότητα της μεθόδου . Η συχνότητα των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων αυξάνεται στην μέθοδο bDNA στους υπερλιπιδαιμικούς όρους και στα όρια ευαισθησίας της μεθόδου (cut – off) Στις δύο αυτές περιπτώσεις τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή .

Απαιτείται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων σε ορούς σε ασθενείς υπό θεραπεία , γιατί μπορεί να παρατηρηθούν ανακολουθίες των τίτλων με την μέθοδο Monitor λόγω της σχετικά χαμηλής επαναληψιμότητας της μεθόδου . Έτσι συνιστάται οι τιμές του HCV RNA να εκφράζονται σε δεκαδικούς λογαρίθμους και να μην αξιολογούνται διαφορές μικρότερες από 0,5 log

Προσοχή απαιτείται στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων σε δείγματα με πολύ υψηλό τίτλο πάνω από  $5 \times 10^5$  αντίγραφα / ml για το Monitor και πάνω από  $120 \times 10^6$  Eq / ml για το bDNA , αλλά και σε δείγματα που δεν ανήκουν στο γονότυπο 1 αφού η αξιοπιστία και των δύο μεθόδων σε αυτές τις περιπτώσεις μειώνεται .

Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων εξαρτάται από την συλλογή και την φύλαξη των δειγμάτων .Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται στους  $-70^{\circ}\text{C}$  , δεν πρέπει να παγώνουν και να ξεπαγώνουν , δεν πρέπει να είναι αιμολυμένα ούτε να χρησιμοποιείται ηπαρίνη για δείγματα που θα ελεγχθούν με PCR .

### 1.3 Γενετική ετερογένεια και ταξινόμηση σε γονοτύπους

#### 1.3.1 Εισαγωγή - βασικές έννοιες

Μία κοινή φυσική ιδιότητα πολλών RNA ιών είναι η γενετική ποικιλομορφία τους Και ο ιός της ηπατίτιδας C εμφανίζει υψηλό βαθμό ετερογένειας , η οποία μπορεί να έχει σημαντικές βιολογικές επιπτώσεις (33). Η ιική ετερογένεια οφείλεται στο γεγονός ότι ο πολλαπλασιασμός των RNA ιών είναι μια διαδικασία επιρρεπής σε σφάλματα για δυο λόγους

- 1- Υπάρχει σε σημαντικό βαθμό η πιθανότητα σφάλματος της RNA πολυμεράσης (42) .Συγκεκριμένα η συχνότητα εσφαλμένης ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων είναι  $10^{-4}$  έως  $10^{-5}$  ανά νουκλεοτιδική θέση ,ανά κύκλο πολλαπλασιασμού του HCV .
- 2- Η RNA πολυμεράση δεν διαθέτει διορθωτική εξωνουκλεάση , άρα είναι εμφανής η απουσία οιοδήποτε μηχανισμού διόρθωσης των σφαλμάτων κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού .

Η κατανομή των μεταλλαγών κατά μήκος του γονιδιώματος δεν είναι τυχαία .Κατά πρώτον εξαρτάται από την επίδραση που θα έχουν στην μεταγραφή του ιού .Μεταλλαγές που διαταράσσουν το κύκλο ζωής του ιού προφανώς δεν είναι βιώσιμες. Έτσι διαφορετικού βαθμού ετερογένεια έχει παρατηρηθεί στις διάφορες περιοχές του HCV γονιδιώματος . Η 5' μη –κωδικοποιούσα περιοχή , η NS4B και η περιοχή του πυρηνοκαψιδίου είναι οι πιο συντηρημένες περιοχές . Αντίθετα οι περιοχές του περιβλήματος , οι περιοχές NS2 , NS4 , NS5A και 3' NCR παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ποικιλομορφία . Στο πίνακα 1 συνοψίζεται η ετερογένεια ανά περιοχή στο γονιδίωμα (33).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : Κατανομή ετερογενειας ανά περιοχή του γονιδιώματος του HCV

ΠΕΡ	5'NCR	CORE	E1	E2	NS2	NS3	NS4	NS5A	NS5B	3'NCR
A	0.015-	0.3-7.8	1.2-9.8	0.7-15.7	0.7-13.2	0.3-10.3	0.17-11	0.3-10.3	0.4-7.5	0.1-0.7
B	1-3.3	9.0-13.0	24.2-30	23.7-29	26.0-32	20.0-23	10.3-24	23.7-30	16.5-20	14.2-38
C	5.5-12	15.7-19	33.3-45	29.5-36	40.0-45	29.8-32	29.7-40	35.3-40	29.0-31	30.3-73

A : Επί της εκατό διαφορές δειγμάτων που ανήκουν στο ίδιο υπότυπος (από υπότυπους 1a ,1b , 2a , 2b ,3a ,3b)

B :Επί της εκατό διαφορές δειγμάτων που ανήκουν στο ίδιο τύπο αλλά διαφορετικούς υπότυπους (από υπότυπους 1a ,1b , 2a , 2b ,3a ,3b)

C : Επί της εκατό διαφορές δειγμάτων που ανήκουν σε διαφορετικό τύπο (από υπότυπους 1a ,1b , 2a , 2b ,3a ,3b)

Έτσι σαν επακόλουθο της χαμηλής ακριβείας του μηχανισμού του ιικού πολλαπλασιασμού , ο HCV δεν υπάρχει ποτέ in vivo σαν ομοιογενής πληθυσμός ταυτοσήμων RNA γονιδιωμάτων . Από το 1990 που προσδιορίστηκε όλο το γονιδίωμα ενός HCV ιού , γνωστού σαν HCV-US η HCV-1 έως σήμερα , έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες ταξινόμησης των ιών σε ομάδες (34) . Σήμερα η διεθνής επιστημονική κοινότητα έχει αποδεχθεί ένα σύστημα κατάταξης που βασίζεται σε μια τριπλή ιεραρχία . Κάνοντας sequencing στην core / E1 και η στην NS5B περιοχή και στην συνέχεια φυλογενετική ανάλυση έχουν αποδεχθεί :

- 1) Γονιδιακές αλληλουχίες που διαφέρουν περισσότερο από 68% ανήκουν σε διαφορετικούς τύπους .
- 2) Αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομοιότητες μεταξύ 77 και 80% ανήκουν στον ίδιο τύπο.
- 3) Αλληλουχίες των οποίων οι ομοιότητες στο γονιδίωμα είναι περισσότερες από 85% ανήκουν στον ίδιο υπότυπο και μαζί με συγγενείς υπότυπους συνιστούν τύπο

Ο ιός έχει ταξινομηθεί σε τέσσερις ιεραρχικά κατηγορίες ( 34 ) . Κάθε επίπεδο αποτελείται από ιούς που δεν είναι ταυτόσημοι μεταξύ τους , αλλά ποικίλουν και μεταξύ των διαφόρων ατόμων και στο ίδιο άτομο .

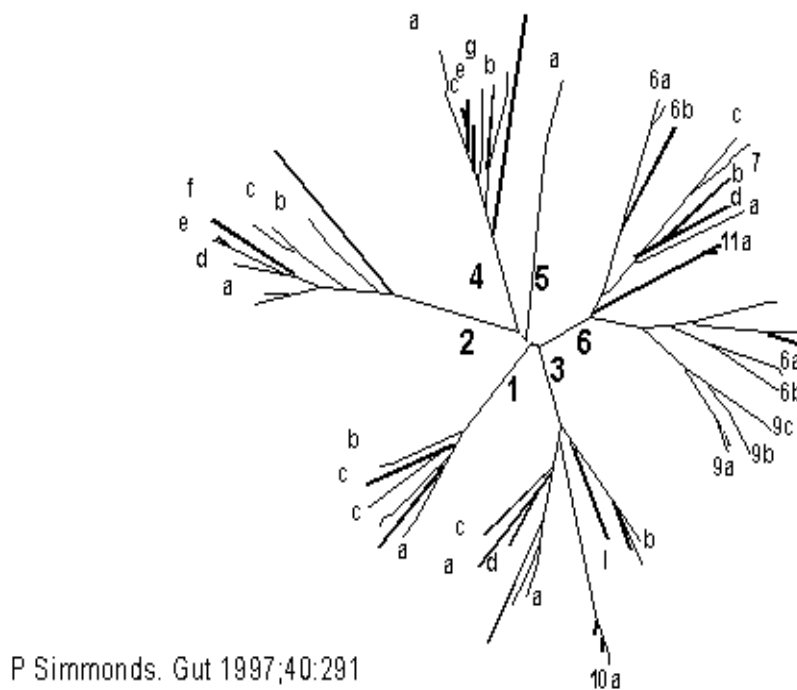
\*Γονότυποι (genotypes) . Έξη κύριοι γονότυποι (1 έως 6) έχουν περιγραφεί , που διαφέρουν περισσότερο από 30% της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος τους .

\*Υπότυποι (subgenotypes) Περισσότεροι από 70 υπότυποι είναι σήμερα γνωστοί που διαφέρουν περισσότερο από 20% . Αναγνωρίζονται με την προσθήκη μικρών στοιχείων της αλφαβήτου (1a , 1b , 1c κλπ )

\*Στελέχη (isolates) Ο όρος στελέχη , αν και ανακριβής , χρησιμοποιείται συχνά για να ορίσει το ιικό στέλεχος που υπάρχει σε κάθε ασθενή

\*Σχεδόν είδη (quasispecies) . Τα σχεδόν είδη συμπεριλαμβάνουν ένα κύριο γονιδίωμα, που είναι ποσοτικά κυρίαρχο , και μια πληθώρα λιγότερο σημαντικών γονιδιωμάτων ,που αντιπροσωπεύουν ποικίλες αναλογίες του συνολικού πληθυσμού

## ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ ΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΗCV



### 1.3.2 Μέθοδοι προσδιορισμού του γονότυπου

Η διαδικασία για τον προσδιορισμό γονότυπου ΗCV είναι η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος του υπό έρευνα στελέχους , η συστοίχιση των αλληλουχιών με άλλα χαρακτηρισμένα στελέχη και φυλογενετική ανάλυση αυτών των γονιδιωμάτων ( 34,35 ) .

Έχει αποδειχθεί ότι η ανάλυση μικρών αλλά τεκμηριωμένης διακριτικής ικανότητας γι' αυτό το σκοπό τμημάτων του γονιδιώματος του HCV , αποτελεί αξιόπιστη μεθοδολογία για την ταξινόμηση των στελεχών σε διάφορους γονότυπους . Τέτοια τμήματα είναι οι περιοχές E1 και τμήμα 340 bp του NS5B . Ειδικά για την αλληλουχία των συγκεκριμένων 340 βάσεων του NS5B γονιδίου , η ανάλυση της κατανομής συχνοτήτων των φυλογενετικών αποστάσεων πολλών διαφορετικών στελεχών του HCV , έδειξε ότι στελέχη που ανήκουν στον ίδιο υπότυπο έχουν εξελικτικές φυλογενετικές αποστάσεις  $<0,127$  και στελέχη που ανήκουν στον ίδιο τύπο  $<0,328$ , αντίστοιχα ( 36 ). Αυτές οι φυλογενετικές αποστάσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αξιόπιστα αριθμητικά όρια για την ταξινόμηση των διαφόρων στελεχών σε τύπους και υπότυπους

Από πρακτική άποψη η ανάλυση της αλληλουχίας DNA των συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος του HCV που προαπαιτείται της φυλογενετικής ανάλυσης ,είναι ακριβή και εξειδικευμένη μέθοδος με περιορισμένη χρήση . Γι αυτό έχουν αναπτυχθεί δύο κατηγορίες τεχνικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του γονότυπου του HCV στον ορό αίματος των ασθενών .

- 1) Τεχνικές με βάση την μοριακή βιολογία
- 2) Τεχνικές ορολογικού προσδιορισμού

#### 1 ) Τεχνικές με βάση την μοριακή βιολογία

I) Η ανάλυση γίνεται μετά από δύο διαδοχικές PCR της περιοχής core του HCV , χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (primers) για κάθε γονότυπο ( 37 ) . Η τεχνική αυτή είναι επίπονη και έχει υψηλό ποσοστό διασταυρούμενης ενίσχυσης του DNA , άρα μη ειδικό προσδιορισμό γονοτύπου .

II) Διενέργεια RT - PCR , χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού και ανάλυση των πολυμορφισμών της σχετικά σταθερής γενετικά 5' μη κωδικογραφουσας περιοχής (5' NC ). Η τεχνική είναι εύχρηστη και χαμηλού κόστους όμως δεν κυκλοφορεί σε μορφή τυποποιημένου αντιδραστηρίου .

III) Διενέργεια RT - PCR , ανάλυση με την μέθοδο του αντίστροφου υβριδισμού και χρήση ειδικών για κάθε γονότυπο ολιγονουκλεοτιδίων υβριδισμού ( probes ) που

αντιστοιχούν σε αλληλουχίες είτε της 5'NC( INNO - LiPA , Innogenetics, Gent Belgium ) είτε της 5'NC και Core περιοχής του γονιδιώματος του HCV (Gen . Etik™ DEIA HCV , DiaSorin , Saluggia , Italy ) . Οι τεχνικές αυτές είναι τυποποιημένες και εμπορικά διαθέσιμες (38).

IV) Πρόσφατα έχει αναπτυχθεί μια τυποποιημένη μέθοδος άμεσης ανεύρεσης και χαρακτηρισμού της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων της 5'NC και της NS5B περιοχής του γονιδιώματος του HCV ( Tru Gene™ , Visible Genetics Inc. Toronto, Ontario) .

## 2 ) Τεχνικές ορολογικού προσδιορισμού

Οι τεχνικές ορολογικού προσδιορισμού βασίζονται στην ανίχνευση αντισωμάτων που υπάρχουν στους ασθενείς με λοίμωξη C , σαν ειδική ανοσολογική απόκριση έναντι ειδικών για κάθε γονότυπο του HCV επιτόπων των πρωτεϊνών NS4 και Core .

Δύο τεχνικές έχουν αναπτυχθεί , με βάση ανταγωνιστική EIA ( Murex HC 1-6 Serotyping Assay , Murex Diagnostics Ltd , Dartford , UK ) και η ανοσοαποτύπωση (RIBATM HCV Serotyping Assay , Chiron Diagnostics , Emeryville California ) . Οι μέθοδοι ορολογικού προσδιορισμού έχουν ευαισθησία κυμαινόμενη από 85% έως 90% σε σύγκριση με τις μεθόδους μοριακής βιολογίας . Η ταυτότητα αποτελέσματος σε σύγκριση με τις μεθόδους αυτές είναι 95% κατά μέσον όρο , για δείγματα που μπορούν να τυποποιηθούν (39) .

### 1.3.3 Γεωγραφική κατανομή γονότυπων

Η συσσώρευση των μεταλλαγών , η επιλογή των πλέον προσαρμοσμένων ιικών στελεχών , και η μετάδοση των αντιστοιχών γονιδιωμάτων με την πάροδο του χρόνου εντός συγκεκριμένων γεωγραφικών περιοχών , η επιδημιολογικών ομάδων, συνετέλεσαν στην προοδευτικά χρονική γενετική διαφοροποίηση – απόσχιση των



γονότυπων του HCV από το αρχέγονο στέλεχος του ιού , σαν φυσική συνέπεια μιας κλασσικής εξελικτικής διαδικασίας .

Κάποιοι γονότυποι αρχικά περιορισμένοι σε γεωγραφικά απομονωμένες ομάδες πληθυσμού ενδέχεται να διαδόθηκαν εξαιτίας πληθυσμιακών επιμειξιών και ανάδυσης νέων αποτελεσματικών τρόπων μετάδοσης του ιού .

Η μετάγχιση αίματος για παράδειγμα , φαίνεται να ευθύνεται για την παγκόσμια διάδοση του γονότυπου 1b , που έχει πιθανώς την προέλευση του στην κεντρική η Δυτική Αφρική . Η χρήση ενδοφλεβίων τοξικών ουσιών συσχετίζεται με την μετάδοση του γονότυπου 3 a , που φαίνεται να προήλθε από την Ινδία η τη Νότιο-Ανατολική Ασία (40).

Η γνώση της γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων παρέχει πληροφορίες όχι μόνο σε σχέση με την αρχική εμφάνιση του ιού και τους τρόπους μετάδοσης του αλλά και σημαντικές πληροφορίες σε σχέση με την ανάπτυξη εμβολίων . Από επιδημιολογικές μελέτες γνωρίζουμε ότι

- Στην Δυτική Ευρώπη και στις Ηνωμένες πολιτείες κυριαρχούν οι γονότυποι 1,2 και 3 αν και η συχνότητα τους ποικίλλει
- Στη Νότια και Ανατολική Ασία συχνότερα απαντάται ο γονότυπος 1b
- Στη Μέση Ανατολή όπως και στην Βόρεια και Κεντρική Αφρική επικρατεί ο γονότυπος 4
- Στη Νότιο Αφρική , πολύ συχνός είναι ο γονότυπος 5 που περιορίζεται σε αυτή τη γεωγραφική περιοχή
- Ο γονότυπος 6 απαντάται μόνο στην Νότιο – Ανατολική Ασία (40).

#### 1.4 Σχεδόν – είδη ή παρόμοια γονιδιώματα του HCV (quasispecies)

##### 1.4.1 Ορισμός - βασικές έννοιες

Ο ιός HCV , όπως και άλλοι RNA ιοί υφίσταται μεγάλο αριθμό λαθών κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των , με συνέπεια να συνυπάρχει ένας μεγάλος αριθμός στενά συσχετιζόμενων γονιδιωμάτων αλλά γενετικά διακριτών στον ίδιο

ασθενή .Έτσι σε κάθε C λοίμωξη ενυπάρχουν παρόμοια γονιδιώματα που παρουσιάζουν γενετική ομολογία νουκλεοτιδίων 95% - 99% .

Αυτή η διασπορά μη-ομοίων αλλά παρομοίων εξαιτίας των μεταλλαγών γονιδιωμάτων του ιού ορίζεται ως σχεδόν είδη (quasispecies) . Είναι μια σύνθετη και εξελικτικά δυναμική γενετική κατανομή , η οποία προσδίδει στον ιό σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης κατά την διαδικασία της μοριακής του εξέλιξης .

Η παρουσία τους προσφέρει ένα σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης καθόσον η ταυτόχρονη παρουσία πολλαπλών γονιδιωμάτων και η ταχεία αναπαραγωγή νέων διευκολύνει την επιλογή μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων με καλύτερη προσαρμοστικότητα σε κάθε νέα περιβαλλοντική συνθήκη. Τα πλέον λοιμογόνα γονιδιώματα επιλέγονται από την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους , καθώς και από την πίεση επιλογής που εξασκείται από τα κύτταρα του ξενιστή και την ανοσολογική απόκριση .Εκλεκτική και ανοσολογικής φύσης , πίεση επιλογής εξασκείται σε περιοχές που κωδικογράφουν κυτταροτοξικούς και αδρανοποιητικούς επιτόπους . Για παράδειγμα , η περιοχή HVR1 του γονιδιώματος εδράζεται στο 5' άκρο του γονιδίου E2 του περιβλήματος του ιού και κωδικογραφεί 27 αμινοξέα που αποτελούν τον κύριο στόχο των αδρανοποιητικών αντισωμάτων έναντι του HCV . Είναι η περιοχή που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση πολλαπλών σχεδόν – ειδών (41) .

Η ετερογένεια των παρόμοιων γονιδιωμάτων οφείλεται στην σημαντική πιθανότητα σφάλματος της RNA – εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης που όπως έχουμε ήδη αναφέρει κωδικογραφείται από το γονίδιο NS5B (42). Επομένως σε ένα άτομο με HCV λοίμωξη , ο ρυθμός με τον οποίο επισωρεύονται οι μεταλλαγές κατά την διαδικασία του πολλαπλασιασμού του ιού , εξαρτάται από το επίπεδο πιστότητας της ιικής RNA πολυμεράσης και την ιδιαίτερη κινητική – δυναμική πολλαπλασιασμού του κάθε στελέχους του ιού

Κατά την περίοδο της HCV λοίμωξης τα παρόμοια γονιδιώματα του ιού είναι σε ένα στάδιο δυναμικής εξελικτικής ισορροπίας σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή . Η σύσταση τους μπορεί να αλλάξει σε μικρό ή μεγάλο βαθμό από αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του ιού . Τέτοιες αλλαγές περιλαμβάνουν :

- Σύνθετες βιοχημικές αλληλεπιδράσεις με το ξενιστή

- Άλλες λοιμώξεις
- Φάρμακα ή αντική θεραπεία

#### 1.4.2 Κλινική σημασία των παρόμοιων γονιδιωμάτων του HCV

##### 1) Εμμένουσα λοίμωξη

Μετά την οξεία φάση της λοίμωξης, ο πολλαπλασιασμός του HCV εμμένει στο 85% των περιπτώσεων, με αποτέλεσμα την εξέλιξη σε χρόνια ηπατοπάθεια. Η παρουσία των quasispecies φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Η εμμένουσα ιαμία συσχετίζεται με την πρόιμη γενετική πολυπλοκότητα, σε αντίθεση με την αυτόματη κάθαρση του ιού που συναρτάται με γενετική ομοιογένεια (43).

Κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού νέα γονιδιώματα παράγονται ικανά να διαφεύγουν την άμυνα του ξενιστή. Κύρια αιτία για την εξέλιξη αυτή είναι η υπέρ μεταβλητή περιοχή 1 (HVR1). Η HVR1 ευρίσκεται στο 5' άκρο του δεύτερου γονιδίου του περιβλήματος (E2), και αποτελεί ένα από τους κύριους στόχους των αδρανοποιητικών αντισωμάτων. Η HVR1 όμως επιδεικνύει ανοχή στις περισσότερες υποκαταστάσεις αμινοξέων. Έτσι κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού του ιού παράγονται συνεχώς νέα γονιδιώματα με ιδιαίτερες HVR1 αλληλουχίες.

Είναι σήμερα αποδεκτό ότι η εμμένουσα λοίμωξη προκύπτει τουλάχιστο κατά ένα μεγάλο βαθμό από την συνεχή παραγωγή νέων μεταλλαγμένων στην HVR1 περιοχή γονιδιωμάτων και της συνεχούς επιλογής εκείνων που διαφεύγουν την εξουδετέρωση από τα αδρανοποιητικά αντισώματα (41).

##### 2) Κυτταρική διαμερισματοποίηση των quasispecies

Ο πολλαπλασιασμός του HCV λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ. Όμως, πειραματικά δεδομένα βασιζόμενα σε ανίχνευση αρνητικών ελίκων του HCV – RNA, που αποτελούν ενδιάμεσες μορφές κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού, υποδεικνύουν και εξωηπατικά σημεία πολλαπλασιασμού. Φαίνεται ότι ο HCV πολλαπλασιάζεται τουλάχιστο σε κάποια μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) (44).

Έχει αποδειχθεί ότι παρόμοια C γονιδιώματα που ανιχνεύθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από διαφορετικά διαμερίσματα , όπως ήπαρ , ορός του αίματος και τα PBMCs του ίδιου ασθενή κατά την ίδια χρονική στιγμή , έχουν διαφορετικές αλληλουχίες , αν και η φυλογενετική τους ανάλυση καταδεικνύει την στενή τους σχέση και την προέλευση τους από το ίδιο λοιμώδες στέλεχος

Η διαμερισματοποίηση αυτή των διαφόρων παρομοίων HCV γονιδιωμάτων πιθανόν να οφείλεται σε διαφορές στην κινητική της κάθε αλληλουχίας στα διάφορα διαμερίσματα ή σε διαφορετικό ιστικό – κυτταρικό τροπισμό

### 3) Επίδραση των quasispecies στην αντιική θεραπεία

Η γενετική πολυπλοκότητα των παρόμοιων HCV γονιδιωμάτων στην έναρξη της θεραπείας είναι ένας σημαντικός παράγοντας ιολογικής απόκρισης στην μονοθεραπεία με IFN – α . Μόνο σε ασθενείς με μικρού βαθμού γενετική πολυπλοκότητα και εντροπία , επιτυγχάνεται πλήρης και διαρκής κάθαρση του HCV (45)

Σε ασθενείς με μεγάλο βαθμού εντροπία των quasispecies είναι σπανιότατη η πλήρης και διαρκή κάθαρση του ιού . Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι υπάρχει πάντα η πιθανότητα ένα από τα γονιδιώματα να διαφύγει τη δράση της IFN – α και να αναδειχθεί ως κυρίαρχο . Συγχρόνως συντελούνται και σημαντικές αλλαγές στη σύσταση των παρομοίων HCV γονιδιωμάτων σε διάφορες περιοχές του ιού όπως η HVR1 , NS5A , και η 5'NC

## 1.5 Αντιική θεραπεία και παράγοντες που την επηρεάζουν

### 1.5.1 Εισαγωγή- Στόχοι της θεραπείας

Τα περισσότερα άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό HCV έχουν χρόνια ενεργό ηπατίτιδα , που μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση και ηπατικό καρκίνωμα . Στις βιομηχανικές χώρες της Δύσης ο θεωρητικά υπολογιζόμενος επιπολασμός είναι 1% έως 2% .Έως σήμερα το μόνο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία των χρόνιων HCV λοιμώξεων είναι η Ιντερφερόνη άλφα (IFN). Όμως τα

αποτελέσματα της θεραπείας είναι απογοητευτικά. Σε μετα-ανάλυση θεραπευτικών μελετών με IFN σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C , το ποσοστό των πλήρως βιοχημικά ανταποκρινόμενων ασθενών δεν υπερέβαινε το 22% (46) Συνολικά είναι σήμερα αποδεκτό ότι ποσοστό ασθενών όχι μεγαλύτερο από 8-12% παρουσιάζουν πλήρη και διαρκή ιολογική ανταπόκριση μετά από θεραπεία (101,107,108,109) .

Ο λόγος για τον οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών ανθίσταται στη θεραπεία παραμένει υπό διερεύνηση . Αρκετοί παράγοντες έχουν επισημανθεί που μπορούν να προβλέψουν την διαρκούσα ιολογική ανταπόκριση στην IFN . Η ηλικία , η παρουσία κίρρωσης του ήπατος στη βιοψία , ο τίτλος των IGM anti-HCV core , αλλά και αμιγώς ιολογικές παράμετροι όπως ιαιμία , ο γονότυπος του ιού και η γονιδιακή ετερογένεια της υπερμεταβλητής περιοχής (HVR1) του γονιδιώματος του ιού HCV έχουν κατά καιρούς μελετηθεί ( 47-54 ). Η μη προφανής συσχέτιση κάποιου από τους παραπάνω παράγοντες έχει οδηγήσει τους ερευνητές στο ερώτημα αν ενδογενή χαρακτηριστικά στελεχών του HCV επιδίδουν την ευαισθησία ή την ανθεκτικότητα στη θεραπεία με IFN .

Οι στόχοι της θεραπείας στη χρόνια ηπατίτιδα C είναι να μειωθεί η βιοχημική δραστηριότητα της νόσου , να επέλθει αν είναι δυνατόν ιολογική κάθαρση, να βελτιωθεί η ιστολογική εικόνα και να προληφθεί η εξέλιξη σε τελικού σταδίου ηπατική ανεπάρκεια η ακόμη και σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο . Τελικός βέβαια στόχος είναι η μείωση της θνητότητας από την νόσο.

### 1.5.2 Τα φάρμακα που διαθέτουμε και οι μηχανισμοί δράσης τους

Οι φορείς της ηπατίτιδας C σε παγκόσμια κλίμακα ανέρχονται σε  $250 \times 10^6$  άτομα Ένα ποσοστό 80% θα αναπτύξει χρόνια ενεργό ηπατίτιδα (18). Λόγω του μεγέθους του προβλήματος γίνονται συνεχώς προσπάθειες με διάφορες ουσίες με στόχο την ίαση . Όμως αυτό που έως τώρα έχει επιτευχθεί είναι η αδρανοποίηση του ιού και όχι η πλήρης εξαφάνισή του από τα ανθρώπινα κύτταρα (ηπατοκύτταρα , λεμφοκύτταρα κ.λ.π) και αυτό σε κάποιο ποσοστό άρρωστων.

Οι ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην προσπάθεια αδρανοποίησης του HCV είναι : ιντερφερόνες , ριμπαβιρίνη , θυμοσίνη α1 , ιντερλευκίνη-2 ,

αναστολείς πρωτεασών , αντιχολοστατικά φάρμακα (UDCA), πεγκυλιωμένες ιντερφερόνες (PEG-IFN) , antisense ολιγονουκλεοτίδια (ODN) , κ.λ.π

Όμως αποτελεσματικότερα αποδεικνύονται τα σχήματα που περιλαμβάνουν συνδυασμό ενός φαρμάκου με ιντερφερόνη όπως αναλύονται σε επόμενο κεφάλαιο.

### 1.5.2 A Ιντερφερόνες (Interferons)

Οι ιντερφερόνες είναι σύνθετη ομάδα από μικρές , φυσικά υπάρχουσες πρωτεΐνες η γλυκοπρωτεΐνες , με μη ειδική αντιική δράση σε ομόλογα κύτταρα. Υπάρχουν τρεις τύποι ιντερφερόνης που διακρίνονται με βάση την κυτταρική τους προέλευση (alpha, beta, gamma) (55)

\* Η alpha – ιντερφερόνη είναι ανθρώπινη πρωτεΐνη που παράγεται από αρκετούς τύπους κυττάρων ( μακροφάγα , κύτταρα null ) , σαν απάντηση σε κάποιο ιικό ή αντιγονικό ερεθισμό. Σαν φάρμακο έχει ευρεία χρήση και παράγεται είτε με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (α-2α η α-2β) είτε από καλλιέργειες λεμφοκυττάρων (λεμφοβλαστοειδής - α1) .

\*Η beta – ιντερφερόνη παράγεται φυσικά από τους ινοβλάστες μετά από ιικό ερεθισμό και για φαρμακευτική χρήση με τη τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Έχει παρόμοια δράση με την α-ιντερφερόνη .

\*Η gamma – ιντερφερόνη παράγεται από βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και έχει έντονη ανοσοτροποποιητική δράση αλλά περιορισμένη αντιική δράση .

Από τους τρεις τύπους αυτός που κυρίως χρησιμοποιείται για θεραπεία είναι οι alpha - ιντερφερόνες

Οι κυριότερες δράσεις της alpha – ιντερφερόνης

Η alpha – ιντερφερόνη δρα μέσω επιφανειακών υποδοχέων και επάγει ένα σύνολο ενδοκυττάρων ενζύμων ( 56 ) .Οι κυριότερες δράσεις της alpha – ιντερφερόνης είναι

\* Κυτταροτοξική - κυτταροστατική . Πιθανολογείται ότι αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό , επάγοντας ένζυμα όπως η φωσφοδιεστεράση , η πρωτεϊνική κινάση και η 2' , 5' –ολιγο-αδενυλική συνθετάση ( 57 ) . Τα ένζυμα αυτά είναι γνωστό ότι μειώνουν η αναστέλλουν τη σύνθεση του RNA και του DNA κατά την μεταμιτωτική περίοδο υποχρεώνοντας έτσι το κύτταρο είτε να μπει σε φάση

ηρεμίας είτε να εξακολουθήσει τον αναπαραγωγικό του κύκλο με εξαιρετικό βραδύ ρυθμό ( 58 ). Ακόμη η alpha – ιντερφερόνη μπορεί να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δρώντας ως αρνητικός αυξητικός παράγοντας ,ο οποίος αναστέλλει την έκφραση των κυτταρικών ογκογονιδίων

\*Ανοσο-τροποποιητική .Πιθανοί μηχανισμοί δράσης είναι η αύξηση της έκφρασης των HLA αντιγόνων στα μολυσμένα κύτταρα και η αύξηση της κυτταροτοξικότητας των T – λεμφοκυττάρων και των φυσικών φονικών κυττάρων .Όμως η ανοσο-τροποποιητική δράση των ιντερφερονων φαίνεται να ακολουθεί ένα διττό τρόπο δόσης – ανταπόκρισης . Ανάλογα με την δοσολογία και τον χρόνο χορήγησης τους οι ιντερφερόνες μπορεί να αυξάνουν είτε να μειώνουν την κυτταροτοξική δραστηριότητα των T-λεμφοκυττάρων , των φυσικών φονικών κυττάρων και των μακροφάγων καθώς και να αυξάνουν η να μειώνουν την δραστηριότητα των B-λεμφοκυττάρων ( 59 , 60 ).

\*Αντι-ικκή . Πιθανός μηχανισμός δράσης η αναστολή της σύνθεσης των ικών πρωτεϊνών . Η ιντερφερόνη συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη ενός μη μολυσμένου κυττάρου μέσω ειδικού υποδοχέως , και δραστηριοποιεί το κύτταρο έναντι ενδεχόμενης προσβολής του από ιό , ενεργοποιώντας τα υπεύθυνα γονίδια για την παραγωγή ισχυρών αντί-ικών ουσιών (ενζύμων) . Οι αντί-ικές αυτές ουσίες πιστεύεται ότι παρεμβάλλονται στην πορεία σύνθεσης των πρωτεϊνών του ιού η ότι καταστρέφουν το πυρηνικό οξύ του ιού ( 61 ) .

Η δράση της ιντερφερόνης στη χρόνια ηπατίτιδα C δεν είναι γνωστή. Φαίνεται ότι υπερτερεί η αντί-ικη δράση έναντι της ανοσολογικής , ανοσοδιεγερτικής αφού μετά την έναρξη της θεραπείας δεν εμφανίζεται έξαρση της νόσου

Προγνωστικοί δείκτες καλής ανταπόκρισης στην ιντερφερόνη στη χρόνια ηπατίτιδα C κατά την έναρξη της θεραπείας

Οι προγνωστικοί δείκτες είναι δυνατόν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες

- Παράγοντες που έχουν σχέση με τον ξενιστή
  - Νεαρή ηλικία
  - Βραχεία διάρκεια νόσου
  - Γυναικείο φύλο

- Απουσία κίρρωσης( 47 )
- Χαμηλό Σωματικό βάρος
- Χαμηλές τιμές γ-GT( 48 )
- Χαμηλός ιστολογικός δείκτης ( 49 )
- Χαμηλή περιεκτικότητα σιδήρου στην ηπατική βιοψία( 50 )
- Παράγοντες που έχουν σχέση με τον ιό
  - Χαμηλό ιικό φορτίο( 51,52,53 )
  - Απουσία μεγάλου αριθμού σχεδόν ειδών(quasispecies) ( 62 )
  - Παρουσία γονότυπων 2 και 3 ( 47,54 )
  - Παρουσία πολλαπλών μεταλλαγών στην περιοχή NS5A (2209-2248) για τον 1b γονότυπο ( 63 ) .
  - Παρουσία αντισωμάτων IgM διαφόρων περιοχών του ιού

Από τους παραπάνω προγνωστικούς δείκτες πιο αξιόπιστοι θεωρούνται το χαμηλό ιικό φορτίο , η απουσία κίρρωσης και η απουσία γονότυπου 1 ( 64 ). Οι γονότυποι από την άλλη μεριά , αν και έχουν συζητηθεί πολύ , είναι πιθανόν να μην αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες στην ανταπόκριση στη θεραπεία . Πολλοί ερευνητές συσχετίζουν τον γονότυπο 1 με μεγαλύτερο ιικό φορτίο ( 65 ) και βαρύτερη ηπατική νόσο ( 66 ) , που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με πτωχότερη απάντηση στη θεραπεία .

Τα αντισώματα IgM κατά διαφόρων περιοχών του ιού έχουν κατά καιρούς συσχετισθεί με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Το IgM anti-c100-3 όταν είναι θετικό προ της θεραπείας , συσχετίζεται με καλή ανταπόκριση. Η εξαφάνιση του στο τέλος της θεραπείας έχει συσχετισθεί με μόνιμη μακρόχρονη ανταπόκριση ( 67, 68 ) . Από την άλλη πλευρά όμως απουσία του IgM anti-core προ της θεραπείας έχει συσχετισθεί με μόνιμη ανταπόκριση ( 48, 69, 70 ) . Αν και πολλές είναι οι ερευνητικές εργασίες που δημοσιεύονται κάθε χρόνο και αφορούν την πρόγνωση του αποτελέσματος της θεραπείας στη χρόνια ηπατίτιδα C , τα αποτελέσματα δεν φαίνεται να είναι άμεσα εφαρμόσιμα στη θεραπεία .

### 1.5.2B Ριμπαβιρίνη (Ribavirin)

Η Ριμπαβιρίνη (1-beta-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide) είναι γνωστή από το 1972 , οπότε επιτεύχθηκε η σύνθεση της . Έχει ευρεία δράση



έναντι αρκετών DNA και RNA ιών συμπεριλαμβανομένων αυτών της ομάδας flavivirus ( 72,73 ) Η αποτελεσματικότητα της έχει δειχθεί σε κλινικές μελέτες έναντι ανθρωπίνων ιών όπως influenza A και B , Lassa fever , respiratory syncytial virus .

Η ριμπαβιρίνη είναι υδατοδιαλυτή νουκλεοσίδη ανάλογος της γουανοσιδης . Ο μηχανισμός δράσης της είναι εν πολλοίς άγνωστος . Πιθανολογείται ότι μειώνει την ενδοκυττάρια δεξαμενή της τριφωσφορικής γουανοσιδης με αποτέλεσμα την σύνθεση RNA με παθολογική 5'cap δομή , είτε ότι έχει άμεση κατασταλτική δράση στην ενεργοποίηση της ιικής RNA πολυμεράσης. Ενδεχόμενα να τροποποιεί την ανοσολογική απάντηση αναστέλλοντας τη δράση των Th2 κυτταροκινών ( 73 ).

Από πλευράς φαρμακοκινητικής έχει γρήγορη απορρόφηση , καλή βιοδιαθεσιμότητα , ρυθμό απομάκρυνσης 6-14 ημέρες και ψηλή συγκέντρωση στα ερυθρά αιμοσφαίρια . Η μονοθεραπεία με ριμπαβιρίνη βελτιώνει τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών , αλλά δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα του HCV RNA ( 71 ).

Ο Lee et al(71) μελέτησαν την επίδραση ριμπαβιρίνης στο ιικό φορτίο και την τυχόν μεταβολή στα quasispecies

15 ασθενείς εντάχθηκαν σε θεραπευτικό σχήμα ριμπαβιρίνης

17 ασθενείς παρακολούθηθηκαν παράλληλα.

Στις 4 εβδομάδες μετρήθηκε ιικό φορτίο και ανιχνεύθηκαν τα quasispecies με single-strand conformation polymorphism (sscp).

6 από τους 15 της ριμπαβιρίνης μείωσαν τις ALT τουλάχιστον κατά 30%. Κανείς από τους 17 μη ενταγμένους σε θεραπεία δεν μείωσε τις ALT.

Δεν παρουσιάστηκε σημαντικά στατιστική μεταβολή ιικού φορτίου, ούτε στην ομάδα της μονοθεραπείας με ριμπαβιρίνη ούτε στην control ομάδα. Αλλαγές στα quasispecies παρατηρήθηκαν σε 1 από την ομάδα ριμπαβιρίνης και σε 3 από την control ομάδα. Άρα η μονοθεραπεία με ριμπαβιρίνη δεν έχει επίδραση στην αλλαγή quasispecies ή μεταβολή ιικού φορτίου.

### 1.5.2 Γ Ουρσοδεσοξυχολικό οξύ (UDCA)

Είναι υδρόφιλο χολικό άλας που χορηγείται σε ασθένειες που χαρακτηρίζονται από χρόνια χολόσταση . Βελτιώνει την ηπατική βιοχημεία χωρίς να

βελτιώνει τη φυσική ιστορία της νόσου , εκτός από περιπτώσεις πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης .Βελτιώνει την ηπατική βιοχημεία στη χρόνια ηπατίτιδα C χωρίς να επιδρά στα επίπεδα του HCV RNA ( 74 ) . Φαίνεται ότι προκαλεί ελαφρά ανοσοκαταστολή . Όταν χορηγείται σε συνδυασμό με IFN-a επισπεύδει τη βιοχημική απάντηση και καθυστερεί τη βιοχημική υποτροπή ( 75 ) . Είναι μη τοξικό και καλά ανεκτό από τους ασθενείς. Τυχαιοποιημένη μελέτη 80 ασθενών , 40 με IFN-a και 40 με συνδυασμό IFN-a και UDCA , έδειξε καλύτερη μόνιμη ανταπόκριση στο συνδυασμό χωρίς όμως η διάφορα να φθάσει σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ( 38% έναντι 18%  $p=0,008$  ) ( 76 ) .

### 1.5.2 Δ Πεγκυλιωμένες Ιντερφερόνες (PEG-IFN)

Η πεγκυλίωση της ιντερφερόνης είναι η προσθήκη μορίων πολυμερούς (πολυαιθυλικής γλυκόλης ) στο μόριο της πρωτεΐνης . Η προσθήκη αυτή μειώνει την ανοσολογική αντίδραση και έτσι αποφεύγεται η δημιουργία αντισωμάτων και η βαρύτητα των παρενεργειών και δεύτερον ελαχιστοποιεί την διάσπαση του μορίου από πρωτεολυτικά ένζυμα , αυξάνοντας έτσι το χρόνο ημιζωής και τα επίπεδα ιντερφερόνης στο αίμα. Η PEG-IFN έχει βρεθεί να παραμένει στο αίμα περισσότερες από 100 ώρες σε σύγκριση με την απλή ιντερφερόνη που παραμένει για 8 ώρες ( 77 ) .

Η ιδιότητα αυτή προσδίδει πλεονεκτήματα στη θεραπεία γιατί ομαλοποιεί τα επίπεδα της ιντερφερόνης στο αίμα με μια μόνο ένεση τη εβδομάδα και αποφεύγεται έτσι το φαινόμενο της ανάδυσης μεταλλαγμένων στελεχών του ιού που κυρίως συμβαίνουν το διάστημα που τα επίπεδα της ιντερφερόνης πέφτουν κάτω από το θεραπευτικό επίπεδο αναστολής του ιού , πράγμα που συμβαίνει όταν χορηγείται IFN 3 φορές την εβδομάδα

### 1.5.2 E Consensus Ιντερφερόνη

Η consensus ιντερφερόνη παρήχθη συνθετικά στο εργαστήριο , μετά από μελέτη της αλληλουχίας των αμινοξέων στο μόριο πολλών ιντερφερονών-a . Για κάθε θέση αμινοξέος της consensus ιντερφερόνης επιλέχθηκε το αμινοξύ που συχνότερα όλων των άλλων απαντάται στη συγκεκριμένη θέση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας των φυσικών ιντερφερονών-a ( 78 ) .

Με την παρασκευή της consensus ιντερφερόνης δημιουργήθηκαν μεγάλες προσδοκίες για καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Με τη χορήγηση 15 µg CIFN τρεις φορές την εβδομάδα για 24 ή 48 εβδομάδες βρέθηκε να επιτυγχάνεται αρχική ιολογική ανταπόκριση σε ποσοστό 18% (26/144) των ασθενών που δεν είχαν ανταποκριθεί σε προηγούμενη χορήγηση 9 µg CIFN ή 3 MU IFNa ( 79 ). Μακροχρόνια ιολογική ανταπόκριση παρατηρήθηκε σε 13% (9/69) των ασθενών της παραπάνω μελέτης που έλαβαν CIFN για 48 εβδομάδες και σε 5% (4/75) εκείνων που έλαβαν CIFN για 24 εβδομάδες . Από την ίδια ομάδα εδείχθη ότι ασθενείς που φέρουν γονότυπο μη-1 έχουν 4,7 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μακροχρόνια ανταπόκριση σε consensus ιντερφερόνη από ότι οι ασθενείς με γονότυπο 1.

Πρόσφατα η ίδια ομάδα ανακοίνωσε ( 80 ) ότι η θεραπεία με 15 µg CIFN είχε σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα σε ασθενείς με φαινόμενα διαφυγής (παροδικά φυσιολογικές τρανσαμινάσες ή και αρνητικό HCV RNA ) κατά τη διάρκεια του αρχικού σχήματος θεραπείας. Ειδικότερα το 28% (5/18) των ασθενών με φαινόμενα διαφυγής παρουσίασε μακροχρόνια ιολογική ανταπόκριση , έναντι 8% (4/50) εκείνων χωρίς φαινόμενα διαφυγής κατά το αρχικό θεραπευτικό σχήμα (p=0,048)

#### 1.6 Η NS5A περιοχή του γονότυπου 1b σαν προγνωστικός παράγοντας στην ανταπόκριση θεραπείας με IFN

Ο ιός της ηπατίτιδας C θεωρείται ως η κύρια αιτία της μη – A και μη – B ηπατίτιδας .Ο HCV συνήθως υπάρχει σαν ένας πληθυσμός από ιούς με διαφορετικές γονιδιακές αλληλουχίες ακόμη και στον ίδιο ασθενή , ένα φαινόμενο που περιγράφεται σαν «σχεδόν είδη» . Κλωνοποιώντας και διερευνώντας την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο DNA του ιού από ορό ασθενούς μολυσμένο με ένα μοναδικό γονότυπο , προέκυψαν πολλαπλά σχεδόν είδη . Αμέσως προέκυψε το ερώτημα ποία μπορεί να είναι η κλινική επίδραση αυτής της γενετικής ποικιλομορφίας του HCV ; Αρχικά είχε αναφερθεί ότι ο γονότυπος 1b συσχετιζόταν με πιο οξεία ασθένεια και πιο γρήγορη μετάπτωση σε κίρρωση σε σχέση με άλλους γονότυπους και κυρίως με τους 2 και 3 (47,54). Ωστόσο γρήγορα αμφισβητήθηκε αυτή η υπόθεση γιατί συσχετίστηκαν και άλλοι παράγοντες , όπως η ηλικία του ασθενούς , η διάρκεια της

μόλυνσης κ.λ.π Αυτό όμως που προέκυψε σαν γεγονός ήταν ο συσχετισμός των γονοτύπων με την ανταπόκριση στην θεραπεία με ιντερφερόνη .

Η ιντερφερόνη αποτελεί την κύρια θεραπευτική αγωγή για την χρόνια ηπατίτιδα C αν και μόνο ένα ποσοστό 25% ανταποκρίνεται πλήρως μετά από 6 έως 12 μήνες θεραπείας. Τα ποσοστά ανταπόκρισης στην θεραπεία με ιντερφερόνη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των HCV γονότυπων (34). Σε πολλές μελέτες από διαφορετικές περιοχές του κόσμου αναφέρθηκε η συσχέτιση των γονοτύπων 1b και 1a με την χαμηλή μακροχρόνια ανταπόκριση στην θεραπεία με IFN – α .Συγκεκριμένα , ενώ για το γονότυπο HCV – 1b το ποσοστό αρχικής πλήρους ανταπόκρισης κυμαίνεται από 10 έως 40% ,για τους γονότυπους HCV - 2a και HCV - 2b κυμαίνεται σε ποσοστά από 60% έως 90% (81,49,82). Ανάλογα ισχύουν και για τους υπόλοιπους γονότυπους .

Ο HCV – 1b είναι ο πιο συχνά απαντώμενος γονότυπος ανά την υφήλιο , με επιπολασμό 37 έως 80% περίπου σε περιοχές όπως η Ασία , Αμερική και Ευρώπη . Τα άτομα που έχουν μολυνθεί από στελέχη HCV – 1b είναι πιθανότερο να αναπτύξουν κίρρωση και καρκίνο του ήπατος , εν σχέση προς τους υπόλοιπους οροθετικούς που έχουν μολυνθεί από διαφορετικό γονότυπο .

Ωστόσο η μη ανταπόκριση του HCV – 1b στην θεραπεία με ιντερφερόνη είναι ένα σημαντικό ζήτημα στην αντιμετώπιση του προβλήματος του HCV. Επειδή η ιντερφερόνη είναι πολύ ακριβή και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παρενέργειες στον ασθενή , θα ήταν πολύ χρήσιμο να μπορούσε να προβλεφθεί η ανταπόκριση κάποιου ασθενή με HCV – 1b λοίμωξη στη θεραπεία .

NS5A: περιοχή που αποφασίζει την ευαισθησία στην ιντερφερόνη (interferon sensitivity determining region, ISDR)

Με διάθεση να προσδιορισθεί η γενετική βάση της αντίστασης του ιού της ηπατίτιδας C στη θεραπεία με IFN , ο Enomoto και συν ( 83 ) προχώρησαν στην αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος στελεχών του γονότυπου 1b του ιού HCV , από τρεις ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν σε διάφορες

δόσεις και σχήματα INF - a . Έγινε ανάλυση πριν την έναρξη της θεραπείας και στο τέλος της. Η ανάλυση αποκάλυψε πολλαπλές διαφορές στο επίπεδο των αμινοξέων σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος , όπως στην E2 envelope πρωτεΐνη στην NS2 πρωτεΐνη καθώς και στο –COOH ήμισυ της περιοχής NS5A (από το αμινοξύ 2209 – 2248) .

Η κατευθείαν ανάλυση της NS5A περιοχής σε ορούς 6 μη ανταποκρινόμενων ασθενών σε σύγκριση με ανάλυση της ίδιας περιοχής από 9 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με IFN έδειξε ενδιαφέροντα στοιχεία . Τα στελέχη που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην IFN , είχαν αλληλουχία αμινοξέων στην αντίστοιχη περιοχή , πανομοιότυπη με την αλληλουχία του πρωτότυπου HCV γονότυπου 1b της Ιαπωνίας ( HCV-j, HCV-J4, HCV-JTa ) ( 84 ) . Η περιοχή αυτή προτάθηκε από τους ερευνητές ως “ η περιοχή που αποφασίζει την ευαισθησία στην ιντερφερόνη ” (interferon sensitivity determining region , ISDR) .

Η ίδια ομάδα , λίγο αργότερα , εξέτασε εάν η αλληλουχία αμινοξέων (2209 – 2248) στην NS5A περιοχή χαρακτηριζόμενη προ θεραπείας θα μπορούσε να χρησιμεύσει σαν παράγοντας πρόβλεψης της απάντησης στη θεραπεία με IFN ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα HCV –1b (63) . Εξετάστηκαν 84 ασθενείς με λοίμωξη HCV – 1b και τέθηκαν υπό 6μηνη θεραπεία με IFN . Έγινε ανάγνωση της αλληλουχίας της υποτιθέμενης ISDR περιοχής και τα αποτελέσματα ήταν τα εξής :

- Κανείς από τους 30 ασθενείς ,των οποίων οι ISDR περιοχές ήταν πανομοιότυπες με αυτές του στελέχους HCV – J , δεν ανταποκρίθηκε πλήρως στη θεραπεία . Σαν πλήρη ανταπόκριση στη θεραπεία ορίστηκε η απουσία του HCV – RNA στον ορό 6 μήνες μετά την διακοπή της IFN .
- Όλοι οι ασθενείς με 4 έως 11 υποκαταστάσεις αμινοξέων (αποκαλούμενα μεταλλαγμένα στελέχη ) είχαν πλήρη ανταπόκριση στη θεραπεία

Επιπρόσθετα , στατιστική ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών , υπέδειξε ότι ο αριθμός των υποκαταστάσεων των αμινοξέων στην περιοχή ISDR ήταν η μόνη παράμετρος συσχετιζόμενη με ένα ανεξάρτητο αποτέλεσμα , όσον αφορά το αποτέλεσμα της θεραπείας με IFN στη μελέτη αυτή .

Συμπερασματικά , τα αποτελέσματα αυτά ήταν ενδεικτικά ενός σημαντικού ρόλου του –COOH τελικού ημίσεως του γονιδίου NS5A . Η λειτουργία του προϊόντος στη συνολική συμπεριφορά του ιού ως προς την ευαισθησία η ανθεκτικότητα στη θεραπεία με IFN παραμένει άγνωστη . Προφανώς αυτά τα ευρήματα χρειαζόνταν επιβεβαίωση .

Επιβεβαιωτική της παραπάνω υπόθεσης ήταν και η δημοσίευση των Gale MJ και συν ( 85 ) που ανέφεραν ότι η πρωτεΐνη NS5A αλληλεπιδρά με την επαγόμενη από την IFN – α πρωτεϊνική κινάση, εμποδίζοντας πιθανόν με το τρόπο αυτό την αντική της δράση

Η υπόθεση αυτή αποτέλεσε γεγονός έντονης επιστημονικής διαμάχης τα τελευταία 3 χρόνια. Σύντομα όμως εμφανίστηκαν εμφανώς αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα από διαφορετικές ομάδες στην Αμερική και Ευρώπη. Οι Ιαπωνικές μελέτες φαίνεται να επιβεβαιώνουν τα αρχικά αποτελέσματα των Enomoto και συν και να δημιουργείται ομάδα υποστηρικτών της ISDR υπόθεσης (86, 45). Αντίθετα πολλοί Ευρωπαίοι ερευνητές δεν βρίσκουν καμμία συσχέτιση μεταξύ των αλληλουχιών NS5A και της απάντησης στη θεραπεία με IFN στους ασθενείς τους ( 87 ,88 , 89 , 90 ). Το ερώτημα εμφανίζεται να αποκτά και γεωγραφικό ενδιαφέρον . Είναι Ιαπωνικό φαινόμενο και πώς ανταποκρίνονται οι Έλληνες ασθενείς ;

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής προήλθαν από τις εταιρίες PROMEGA , PHARMACIA , QIAGEN , FMC , SIGMA CHEMICALS, GIBCO-BRL, MERCK .

Τα ένζυμα τροποποίησης – πολυμεράσες ήταν των εταιριών PROMEGA , GIBCO-BRL ενώ για την ανάγνωση αλληλουχιών DNA οι πολυμεράσες ήταν από την PHARMACIA και την ABI. Συγκεκριμένα περιγράφονται σε κάθε κεφάλαιο.

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR και τα σημασμένα με Cy-5 που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση των PCR προϊόντων συντέθηκαν στο Εργαστήριο Μικροχημείας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας σε 394 DNA Synthesizers Applied Biosystems

Οι οροί προήλθαν από την γαστρεντερολογική κλινική του ΠΕΠΑΓΝΗ ,οι βιοψίες έγιναν από τους εξειδικευμένους γαστρεντερολόγους του ηπατολογικού εργαστηρίου της παραπάνω κλινικής και αξιολογήθηκαν από τους ειδικούς παθολογοανατόμους του αντίστοιχου εργαστηρίου του ΠΕΠΑΓΝΗ

#### 2.2 Μέθοδοι

##### 2.2.1 Απομόνωση RNA από ορό αίματος

**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ :** Ο ορός ξεπάγωνε για μία μόνο φορά για να γίνει η απομόνωση του RNA Η απομόνωση έγινε με TRIzol της εταιρίας GIBCO-BRL . Το TRIzol είναι μονοφασικό διάλυμα από φαινόλη και isothiocyanate και λειτουργεί σύμφωνα με την μέθοδο Chomczynski-Sacchi (1987) . Κατά την διάρκεια της ομογενοποίησης το TRIzol διατηρεί την ακεραιότητα του RNA ενώ διαμελίζει τα κύτταρα και διασπά τις ενώσεις του . Η προσθήκη χλωροφορμίου διαχωρίζει την υδατική από την οργανική φάση και το RNA εκχυλίζεται στην υδατική φάση , απ όπου κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη . Στην οργανική φάση εκχυλίζονται οι πρωτεΐνες και στην μεσόφαση το DNA

**ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ :** Θερμοκρασία 15 – 30<sup>0</sup> C

ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ : 0.25 ml ορού και 0.75 ml TRIzol. Επώαση για 5 min στους 15-30 °C

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΦΑΣΕΩΝ : 0.2 ml χλωροφόρμιο / 0.75 ml TRIzol . Ανακίνηση με το χέρι για 15 sec . Επώαση για 2-15 min σε θερμοκρασία 15-30 °C . Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 min στους 2-8 °C

ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ RNA : Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε καθαρό σωληνάκι . Προσθέτουμε 5-10 µg (Rnase free) glycogen ως φορέα και 0,5 ml ισοπροπανόλη . Επώαση για 10 min στους 15-30 °C . Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 min στους 2-8 °C

ΠΛΥΣΙΜΟ RNA : Απομάκρυνση υπερκείμενου . Πλύσιμο του ιζήματος με 75% αιθανόλη 1ml / 0.75ml TRIzol . Φυγοκέντρηση στις 7500 στροφές για 5 min στους 2-8 °C

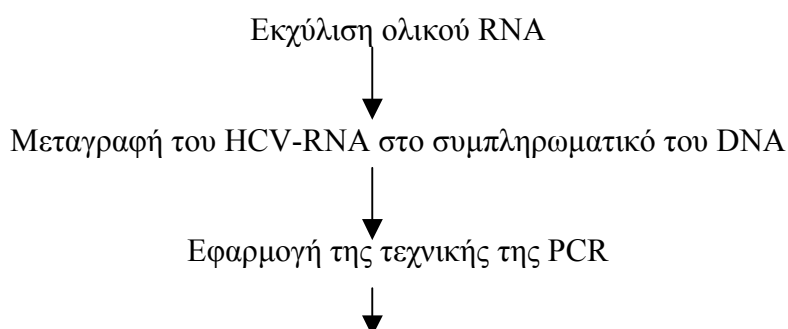
ΕΠΑΝΑΔΙΑΛΥΣΗ RNA : Στέγνωμα με αέρα . Επαναδιάλυση σε 50 µl Rnase –free νερό

ΦΥΛΑΞΗ RNA : Μετά την ομογενοποίηση και πριν την πρόσθεση χλωροφορμίου μπορεί να φυλαχτεί για 1 τουλάχιστο μήνα στους –70 °C . Μετά τη φάση της κατακρήμνισης , σε 75% αιθανόλη , στους 2-8 °C για τουλάχιστον μια βδομάδα , και στους –20 °C για ένα χρόνο

### 2.2.2. Αντίστροφη μεταγραφή RNA σε c-DNA και πολλαπλασιασμός του DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

#### Γενικά

Για την ανίχνευση HCV-RNA με τη μέθοδο RT-PCR ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία





## Ανίχνευση και προσδιορισμός του τελικού προϊόντος

Στο πρώτο βήμα της εκχύλισης αποδεσμεύουμε το RNA από τις πρωτεΐνες, τις οποίες και απομακρύνουμε με τη χρήση οργανικών διαλυτών. Ακολουθεί η καθίζηση του RNA ιζήματος σε διάλυμα αιθανόλης. Καθόλη τη διάρκεια της εκχύλισης λαμβάνονται μια σειρά μέτρων για την προστασία του RNA από την αποδιάταξη.

Ακολουθεί το στάδιο της μεταγραφής του HCV-RNA στο συμπληρωματικό του DNA. Βασίζεται στη λειτουργία του ενζύμου RNA εξαρτώμενη – DNA πολυμεράση η οποία χρησιμοποιεί ως εκμαγείο ένα μονόκλωνο RNA για να συνθέσει τη συμπληρωματική του DNA – άλυσσο. Όπως όλες οι πολυμεράσες στη φύση για την εκκίνηση της μεταγραφής χρειάζεται ένα εναρκτήριο DNA – μόριο.

Ένα ζευγάρι ολιγονουκλεοτίδια προσαρμόζονται στις DNA – αλυσούς και αποτελούν εναρκτήρια μόρια για τη δράση της πολυμεράσης. Ακολουθεί η διαδοχική επανάληψη των κύκλων της PCR για να πάρουμε τελικά σε μεγάλη ποσότητα το κομμάτι του DNA που ορίζεται ανάμεσα στους δύο εκκινητές της αντίδρασης. Για να αυξήσουμε τώρα την ευαισθησία της ανίχνευσης εφαρμόζουμε και δεύτερη PCR, αυτή τη φορά στο προϊόν της πρώτης, με τη χρησιμοποίηση ενός δεύτερου ζευγαριού ολιγονουκλεοτιδίων.

Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με τους διαδοχικούς κύκλους για να πάρουμε το τελικό προϊόν που είναι ένα κομμάτι DNA με αλληλουχία αντίστοιχη της περιοχής του γονιδιώματος του ιού που έχουμε ενισχύσει. Αυτό το προϊόν της PCR ανιχνεύεται στο τελευταίο στάδιο της μεθοδολογίας που αναπτύσσουμε.

Έχουμε ξεκινήσει από μερικά μόρια του ιού για να καταλήξουμε σε απείρως περισσότερη ποσότητα DNA που εύκολα ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Εδώ έχουμε τον διαχωρισμό των επιμέρους κλασμάτων DNA, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Χρησιμοποιείται μια χρωστική, η οποία αφενός μεν δεσμεύεται χημικά από τα πυρηνικά οξέα αφετέρου δεν έχει την ιδιότητα να φθορίζει υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Σε μια πετυχημένη εφαρμογή της μεθόδου εμφανίζεται στην ηλεκτροφόρηση ένα μόνο κλάσμα DNA με το αναμενόμενο μήκος.

Στα παραπάνω δείγματα, μετά την εκχύλιση του ολικού RNA και τη μεταγραφή του HCV-RNA στο συμπληρωματικό του DNA, εφαρμόστηκε διπλή

PCR, με σκοπό την ανίχνευση του HCV-RNA. Το DNA – προϊόν της 2<sup>ης</sup> PCR εμφανίζεται στην ηλεκτροφόρηση ως ένα κλάσμα DNA με 217 bp.

Η αντίστροφη μεταγραφή (RT) του HCV-RNA σε cDNA και ο πολλαπλασιασμός του με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) έγινε με το Access RT-PCR System της Promega. Το σύστημα είναι σχεδιασμένο για να λειτουργεί στις ίδιες συνθήκες η AMV αντίστροφη μεταγραφασή και η Tfl DNA πολυμεράση. Έτσι σε ένα στάδιο συνδυάζεται η αντίστροφη μεταγραφή και οι πρώτοι κύκλοι PCR χωρίς να χρειάζεται επιπλέον πρόσθεση buffer.

10 μl από τα 50 μl του απομονωμένου RNA από τα αρχικά 250 μl ορού προστέθηκαν σε 40 μl master mix που περιείχαν 200 μM από dNTPs, 0,5 μM από καθένα από τους εξωτερικούς primers, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 5U από AMV reverse transcriptase, 5U από Tfl DNA Polymerase και 5x AMV/Tfl Reaction buffer που περιέχει το kit. Οι αλληλουχίες που πολλαπλασιάστηκαν και οι αντίστοιχοι primers περιγράφονται ξεχωριστά σε κάθε κεφάλαιο στο ειδικό μέρος.

Για την RT-PCR χρησιμοποιήσαμε τις παρακάτω συνθήκες

1 κύκλος	48°C για 45 λεπτά	Αντιστρ.μεταγραφή
	↓	
1 κύκλος	94°C για 2 λεπτά	Απενεργοποίηση της AMV RT και RNA/cDNA/primer αποδιάταξη
	↓	
40 κύκλοι	94°C για 30 sec 55°C για 45 sec 72°C για 55 sec	αποδιάταξη annealing extension
	↓	
1 κύκλος	68°C για 5 λεπτά	final extension

Ανάλυσης του PCR προϊόντος: Τρέχουμε το 5% της τελικής αντίδρασης. Αν είναι ορατό στο UV μετά από χρώση με βρωμιούχο εθίδιο το PCR προϊόν (323 bp) του θετικού control RNA με τους Upstream και Downstream control Primers και δεν είναι ορατά τα (HCV-RNA) PCR από τα δείγματα μας , τότε προχωρούμε σε nested PCR.

### 2.2.3. Μέθοδος προσδιορισμού γονοτύπων με INNO-LiPA

#### 3a. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού γονοτύπων με INNO-LiPA HCV II είναι μια μέθοδος για in vitro γονοτύπηση σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα . Μας επιτρέπει την κατάταξη σε 6 διαφορετικούς τύπους και στους κυριότερους γνωστούς υπότυπους . Βασίζεται στις διαφορές που βρίσκονται στην 5' UTR περιοχή ,για διαφορετικούς γονότυπους . Ειδικά για κάθε γονότυπο probes με πολυ( A) άκρο είναι ακινητοποιημένα σε μεμβράνη νιτροσελουλόζης

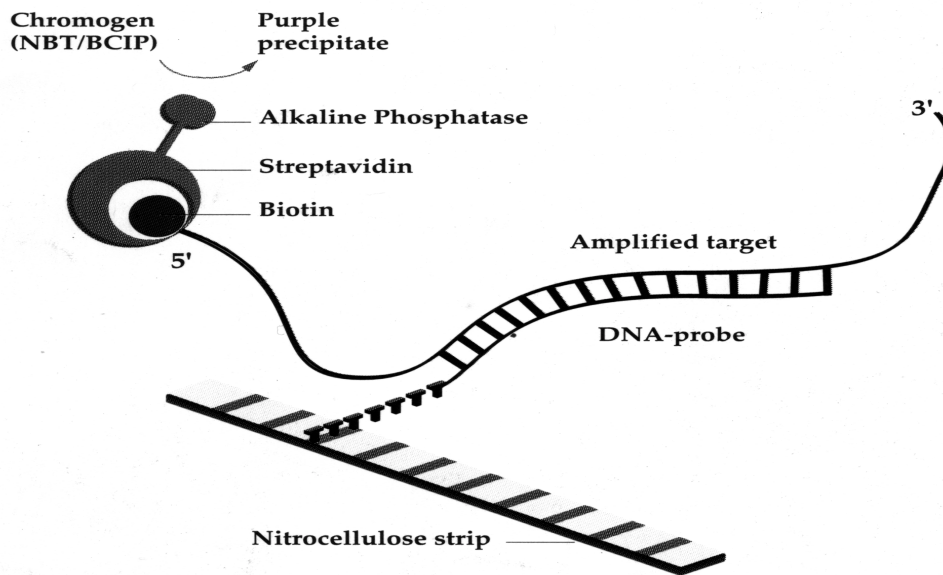
Στα probes που έχουν ακινητοποιηθεί στις ταινίες υβριδίζονται τα PCR προϊόντα που είναι σημασμένα με βιοτίνη . Η βιοτίνη έχει προστεθεί στο 5' άκρο του εκκινητή που ξεκινά την ενσωμάτωση κατά την αντίδραση της PCR . Το σημασμένο προϊόν που προκύπτει από την 5'UTR υβριδίζεται μόνο στη γραμμή που περιέχει το probe που ταιριάζει απόλυτα με την αλληλουχία , επιτρέποντας αυστηρό διαχωρισμό σε επίπεδο υποτύπου . Τέτοια υψηλή ειδικότητα μπορεί να επιτευχθεί με πολύ αυστηρές συνθήκες υβριδισμού (  $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  )

Μετά τον υβριδισμό σε κάθε βιοτυνιλωμένο υβρίδιο που έχει σχηματισθεί πηγαίνει και προσκολλάται στρεπταβιδίνη σημασμένη με αλκαλική φωσφατάση . Επώαση με το χρωμογόνο BCIP/NBT ( 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate , nitroblue tetrazolium ) ,έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ροζ-καφέ ιζήματος στην αντίστοιχη γραμμή που υπάρχει το probe

#### **3b. Περιγραφή των υλικών και αντιδραστηρίων που περιλαμβάνονται στη μέθοδο INNO-LiPA**

1. Αποδιατακτικό διάλυμα - Denaturation Solution (DS) : Αλκαλικό διάλυμα που περιέχει EDTA
2. Διάλυμα υβριδισμού – Hybridization Solution (HS) : SSC buffer που περιέχει και 0.1% SDS
3. Διάλυμα ξεπλύματος – Stringent Wash Solution (SWS) : SSC buffer που περιέχει και 0.1% SDS
4. Διάλυμα ξεπλύματος – Rinse Solution (RS) : Buffer φωσφορικών που περιέχει NaCl , Triton , και 0.5 %  $\text{NaN}_3$  . Αραιώνεται 1: 5 με απεσταγμένο νερό πριν τη χρήση
5. Διάλυμα συζεύγματος – Conjugate Diluent (CD) : Buffer φωσφορικών που περιέχει NaCl , Triton , πρωτεΐνες σαν σταθεροποιητές και 0.1 %  $\text{NaN}_3$  .
6. Συμπυκνωμένο σύμπλοκο – Concentrated Conjugate (C) : Στρεπταβιδίνη σημασμένη με αλκαλική φωσφατάση σε Tris buffer που περιέχει πρωτεΐνη σαν σταθεροποιητή και 0.1%  $\text{NaN}_3$  .Αραιώνεται με 1:100 CD πριν τη χρήση
7. Διάλυμα υποστρώματος – Substrate buffer (SB) : Tris buffer , NaCl ,  $\text{MgCl}_2$
8. Συμπυκνωμένο υπόστρωμα – Substrate Solution (SS) : BCIP/NBT ( 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate , nitroblue tetrazolium σε dimethylformamide ) . Αραιώνεται με 1 : 100 SB πριν τη χρήση
9. Ταινίες για την αποτύπωση των γονότυπων . Η κάθε ταινία περιλαμβάνει ( όπως φαίνεται στο 3ε .Παραδείγματα αποτύπωσης γονότυπων ) , μια αρχική γραμμή που προσδιορίζει την αρχή της ταινίας , μια επόμενη που είναι conjugate control για τον έλεγχο του σταδίου 3 για την ανάπτυξη του χρώματος και ένα amplification control που ελέγχει την επιτυχία ή όχι της PCR . Για να θεωρηθεί επιτυχής η δοκιμασία γονοτύπισης θα πρέπει να εμφανίζονται πάντα οι γραμμές 1,2 . Υπάρχουν άλλες 19 γραμμές παράλληλα ακινητοποιημένων DNA probe που χαρακτηρίζουν τους διαφορετικούς γονοτύπους . Ανάλογα με την ικανότητα υβριδισμού του PCR προϊόντος σε μια ή περισσότερες γραμμές προκύπτει η κατάταξη του σε ένα γονότυπο . Μεταλλαγές που μπορούν να υπάρχουν μεταξύ σχεδόν ειδών (quasispecies) , δεν επηρεάζουν την κατάταξη σε ένα γονότυπο

### **3c. Σχηματική παράσταση της μεθόδου γονοτύπισης με INNO-LiPA**



### 3d . Περιγραφή της διαδικασίας

1. Υβριδισμός → σε ανακινούμενο υδατόλουτρο με κλειστό καπάκι στους  $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Αποδιατακτικό διάλυμα ( DS)	10 μl	προστίθεται σε κάθε βαρκούλα
PCR προϊόν	10 μl	προστίθεται στη σταγόνα του DS
<u>Επώαση στους <math>20-25^{\circ}\text{C}</math> για 5 min</u>		
Διάλυμα υβριδισμού (HS) (Έτοιμο για χρήση προθερμασμένο)	2 ml	προστίθεται στη βαρκούλα , ανάμιξη
Ταινία INNO-LiPA	1 ταινία	σε κάθε βαρκούλα
<u>Επώαση στους <math>50^{\circ}\text{C}</math> για 5 min</u>		

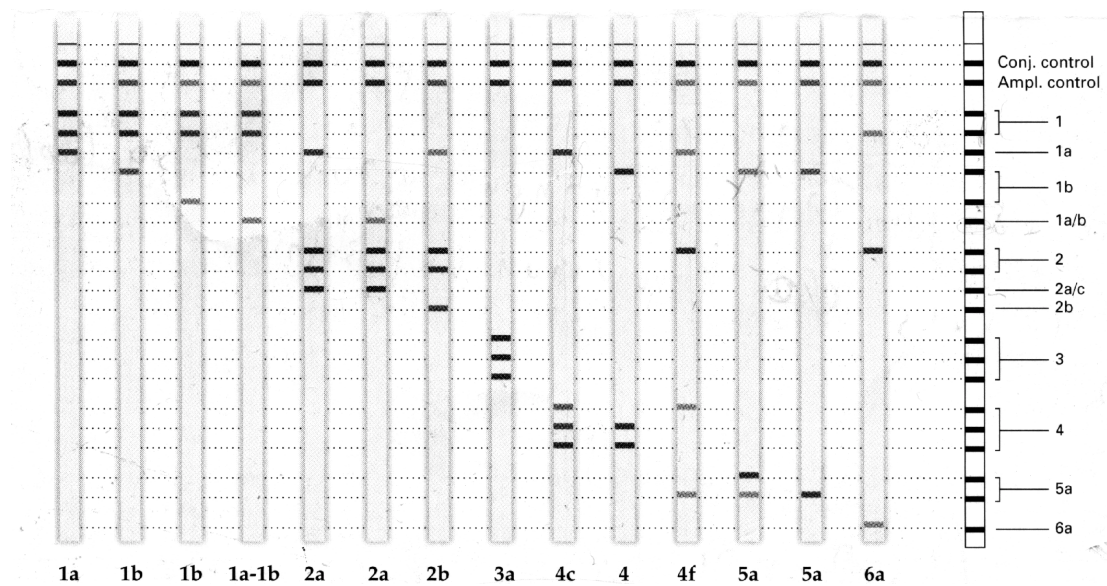
2. Ανακίνηση υδατόλουτρο → σε ανακινούμενο υδατόλουτρο με κλειστό καπάκι στους  $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Διάλυμα ξεπλύματος (SWS) (Έτοιμο για χρήση προθερμασμένο)	2x 2 ml	πλύσιμο 2 φορές 10-20 sec
	2 ml	προστίθεται σε κάθε βαρκούλα
<u>Επώαση στους <math>50^{\circ}\text{C}</math> για 30 min</u>		

3. Ανάλυση χρωματισ → ανάσπαση,  $20-25^{\circ}\text{C}$

Διάλυμα ξεπλύματος (RS) ( Διαλύεται 1:5 σε $\text{dH}_2\text{O}$ )	2x 2 ml	πλύσιμο 2 φορές 1 min
Διάλυμα συζεύγματος (CS) (Αραίωση 1:100 σε conj. Diluent)	2 ml	προστίθεται σε κάθε βαρκούλα
<u>Επώαση στους <math>20-25^{\circ}\text{C}</math> για 30 min</u>		
Διάλυμα ξεπλύματος (RS) ( Διαλύεται 1:5 σε $\text{dH}_2\text{O}$ )	2x 2 ml	πλύσιμο 2 φορές 1 min
Διάλυμα υποστρώματος (SB) (έτοιμο προθερμασμένο)	2 ml	πλύσιμο ταινίας 1X1min
Διάλυμα υποστρώματος (SS) (Αραίωση 1:100 σε SB)	2 ml	προστίθεται σε κάθε βαρκούλα
<u>Επώαση στους <math>20-25^{\circ}\text{C}</math> για 30 min</u>		

### 3ε . Παραδείγματα αποτελεσμάτων γονοτύπων με INNO-LiPA HCV ταινίες



#### 2.2.4. Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το QIAquick gel extraction kit της εταιρείας QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας . Η αρχή της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι συνδυάζει τεχνικές μικροφυγοκέντρωσης και την ιδιότητα του DNA να προσδένεται στις silica-gel μεμβράνες που έχουν οι QIAquick κολώνες , που επιτρέπουν να απομακρύνονται οι προσμίξεις όπως άλατα και μικρού μοριακού βάρους ενώσεις ,ενώ το DNA εκλύεται με Tris buffer ή νερό

Τα PCR προϊόντα αφού ταυτοποιηθούν και ποσοτικοποιηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης πρέπει να απομονωθεί η κύρια ζώνη που ανταποκρίνεται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος .Για το σκοπό αυτό το PCR προϊόν συμπυκνώθηκε στα 20 μl και έτρεξε σε 1% πήκτωμα αγαρόζης με χαμηλό σημείο τήξης . Όταν γίνεται πλέον ορατός ο διαχωρισμός των ζωνών ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία :

1. Κόβεται η κατάλληλη ζώνη από το πήκτωμα και τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου erpendorf .
2. Ζυγίζεται και προστίθενται 3 όγκοι buffer QX1 (για διαλυτοποίηση ) για κάθε 1ογκο από το πήκτωμα .
3. Επώαση στους 50 ° C για 10 min . Η αγαρόζη πρέπει να έχει πλήρως διαλυτοποιηθεί .
4. Προστίθεται 1 όγκος ισοπροπανόλης , ανάμιξη .
5. Τοποθετείται σε 2 ml σωληνάριο μια κολώνα QIAquick και φορτώνεται το δείγμα . Φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 1 min .
6. Απορρίπτεται το κλάσμα που συλλέχθηκε στο erpendorf , προστίθεται 0.5 ml QX1 buffer στην QIAquick κολώνα και φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 1 min .
7. Απορρίπτεται το κλάσμα που συλλέχθηκε στο erpendorf , προστίθεται 0.75 ml PE buffer στην QIAquick κολώνα και φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 1 min .
8. Απορρίπτεται το κλάσμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και η κολώνα φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 1 min .
9. Τοποθετείται η κολώνα σε καινούργιο καθαρό σωληνάκι τύπου 1.5 ml erpendorf και προστίθεται 50 μl dH<sub>2</sub>O . Επώαση για 1 min . Φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 1 min

### 2.2.5. Μέθοδος ανάγνωσης αλληλουχιών των PCR προϊόντων (sequencing)

#### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

10x FS buffer:	125 mM Tris-HCl pH 9.5 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 150 mM MgCl <sub>2</sub>
Termination διάλυμα	10 mM Tris-HCl pH 9,5 1 mM of dATP, dTTP and Dctp, 0,4 mM dGTP, 1.6 mM dITP, and either 5 μM ddATP or 5 μM ddCTP or 5 μM ddTTP or 2.75 μM ddGTP

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αναμιγνύουμε 0,1 έως 1 μg καθαρισμένου PCR προϊόντος με 2 μl 10x Taq FS buffer, 2 pmol Cy5- σημασμένο primer (M13 Universal ή reverse), 1 μl Taq FS ένζυμο και νερό έως 20 μl.

Μοιράζουμε σε 4 σωληνάκια από 5 μl από το παραπάνω μίγμα και προσθέτουμε 2 μl από το καθένα από τα termination διαλύματα. Η διαδικασία του προγράμματος PCR είναι η παρακάτω:

- 2 min στους 95°C για αρχική αποδιάταξη
- 20 με 30 κύκλους εναλλάξ στους 95°C για 30 sec και στους 50°C για 30 sec

Προσθέτουμε 4 μl διάλυμα φορμαμίδης για να σταματήσουμε την αντίδραση. Θερμαίνουμε στους 95°C για 2 min και φορτώνουμε στο sequencing gel.

Αναλυτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο του ειδικού μέρους για την μελέτη της NS5A περιοχής του γονιδιώματος του ιού.

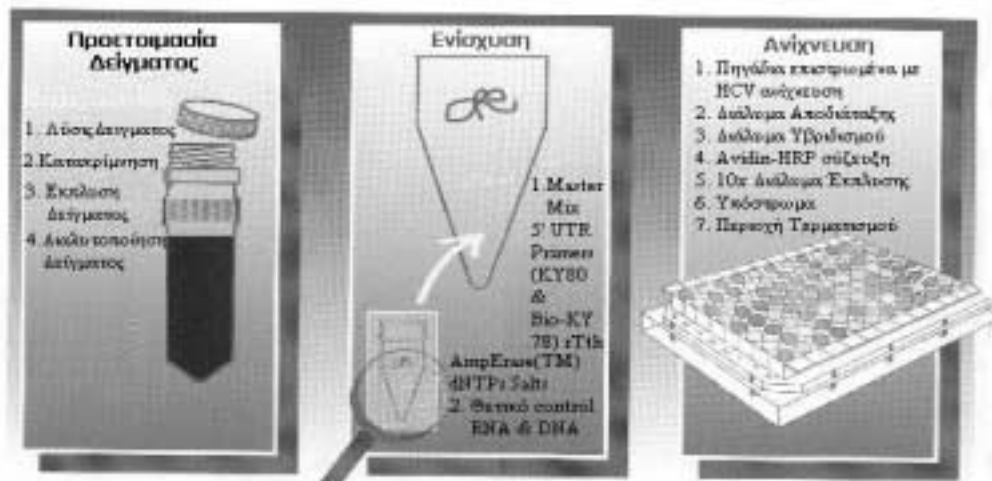


## 2.2.6. Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του HCV RNA

### Περιγραφή

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του HCV RNA έγινε με το το Amplicor HCV Monitor™ assay της εταιρείας Roche Diagnostic System. Το kit περιλαμβάνει έτοιμα διαλύματα για την προετοιμασία του δείγματος, έτοιμα αντιδραστήρια για την αντίστροφη μεταγραφή και το πολλαπλασιασμό με διαδικασία PCR και τον ποσοτικό προσδιορισμό. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει ποσοτικοποιημένο standard το οποίο συναυξάνεται με την αλληλουχία στόχο, έτσι ώστε να προσμετράται η απόδοτικότητα της αντίδρασης PCR.

Τα κυρίως στάδια της όλης διαδικασίας περιληπτικά φαίνονται στο παρακάτω σχήμα και είναι τα εξής:



#### A : Προετοιμασία δείγματος

Το RNA του HCV μαζί με το ποσοτικοποιημένο εσωτερικό standard (Q.S) απομονώνεται από 100 µl ορού που είχε φυλαχτεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$  με guanidine thiocyanate και το RNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη .Ακολούθως διαλυτοποιείται σε διάλυμα που περιέχει μαγνήσιο απαραίτητο για την PCR

#### B : Ποσοτικοποιημένο εσωτερικό standard (Q.S)

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή το Q.S είναι ένα συνθετικό μόριο RNA με θέσεις πρόσδεσης εκκινητή ειδικές για HCV και μια μοναδική αλληλουχία ανιχνευτή (probe) ειδική για το συγκεκριμένο Q.S μόριο RNA

#### C : Ενίσχυση του στόχου (Amplification target)

Είναι η 5'µη κωδικογραφούσα περιοχή του γονιδιώματος του HCV . Ενα τμήμα αλληλουχίας που ορίζεται από τους KY80 και KY78 εκκινητές μήκους 244 βάσεων ορίζεται σαν περιοχή στόχος . Ο KY150 είναι η αλληλουχία ανίχνευσης ακινητοποιημένη σε microwell plate (MWP).

#### D : Διαδικασία ενίσχυσης και ανίχνευσης ποσοτικοποίησης

Το HCV-RNA και το Q.S-RNA μεταγράφονται σε c-DNA και ενισχύονται συγχρόνως σε μια αντίδραση στο ίδιο σωληνάριο χρησιμοποιώντας το ένζυμο rTth πολυμεράση με την παρουσία ιόντων Mn . Μετά την ενίσχυση τα προϊόντα αποδιατάσσονται , μεταφέρονται σε microwell plate και αραιώνονται σταδιακά από τη γραμμή A που περιέχει το μη αραιωμένο προϊόν στις γραμμές B έως E με 1:5 , 1:25 , 1:125 , 1:625 αραιώσεις αντίστοιχα . Εκεί υβριδίζονται με την ειδική αλληλουχία ανίχνευσης του HCV . Από την γραμμή A γίνονται αραιώσεις 1:5 , 1:25 στις γραμμές G έως H όπου είναι ακινητοποιημένη η ειδική αλληλουχία ανίχνευσης του Q.S-RNA με την οποία υβριδίζεται το ενισχυμένο προϊόν . Η υψηλότερη αραιώση που θα έχει απορρόφηση στα 450 nm ( $A_{450}$ ) μεταξύ 0,5 και 2,0 στα microwells που είναι στρωμένα με την ειδική HCV αλληλουχία ανίχνευσης και η αντίστοιχη  $A_{450}$  των wells που είναι στρωμένα με την ειδική Q.S-RNA αλληλουχία ανίχνευσης , θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του αριθμού HCV-RNA copies / ml δείγματος

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να διαπιστωθεί η έκταση του προβλήματος της ηπατίτιδας C στην Κρήτη από τρεις διαφορετικές απόψεις :

- 1) Γονοτυπική επιδημιολογία του ιού και συσχέτιση του γονότυπου με κλινικά και ιστορικά στοιχεία.
- 2) Ανταπόκριση στην θεραπευτική αγωγή με διάφορα θεραπευτικά σχήματα.
- 3) Χρήση της περιοχής NS5A του γονότυπου 1b ως πιθανού προγνωστικού παράγοντα ανταπόκρισης στην θεραπεία

### 3.1 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HCV ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ

#### 3.2.1 Υλικά – ασθενείς - μέθοδοι

**Ασθενείς** Μεταξύ των ετών 1994 και 1997 επιλέχθηκαν 102 ασθενείς οι οποίοι είχαν προσβληθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C για να ενταχθούν στη παρακάτω επιδημιολογική μελέτη .Τα κριτήρια για την ένταξη κάποιου ασθενούς στη ομάδα μελέτης ήταν :

- Παρουσία αντισωμάτων HCV τα οποία ανιχνεύτηκαν με ELISA τρίτης γενεάς ( ELISA 3 , Abbott Laboratories ).
- Απουσία HbsAg ή anti-HIV .
- Αποκλεισμός αλκοολικών .
- Αποκλεισμός ασθενών με ιστορικό μεταγγίσεων , μεταμοσχεύσεων ή σοβαρών νοσοκομειακών νοσηλειών

**Ιστολογικά δεδομένα** Από όλους τους ασθενείς πάρθηκε βιοψία ήπατος , η οποία βαθμονομήθηκε και αξιολογήθηκε με βάση τα κριτήρια Ishak ( 31 ) χωρίς προηγούμενη γνώση κλινικών και ιολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

**Στατιστική ανάλυση** Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση ήταν: γονότυπος , φύλο , ηλικία , ιαμμία , σταδιοποίηση , βαθμοποίηση , sgot , sgpt , γ-gt , sap. Κατ αρχήν έγινε μονοπαραγοντική ανάλυση . Η σχέση μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών και των γονότυπων προσδιορίστηκε με τη χρησιμοποίηση της

μεθόδου Pearson's chi-square . Οι διαφορές των μέσων όρων των ποσοτικών μεταβλητών (υικό φορτίο , βιοχημικές μετρήσεις κ.λ.π) μεταξύ των διαφόρων ομάδων γονότυπων εξετάστηκαν με την μέθοδο one-way ANOVA test.

Ο βαθμός γραμμικής συσχέτισης μεταξύ συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας Spearman's rank correlation coefficient. Όπου ήταν αναγκαίες έγιναν λογαριθμικές μετατροπές των ποσοτικών μεταβλητών πριν την στατιστική ανάλυση , με στόχο την ομαλοποίηση των τιμών.

Ακολούθως έγινε πολυπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιώντας logistic regression με το SPSS Version 7.5 στατιστικό πακέτο ανάλυσης. Για τη στατιστική ανάλυση τα grading και τα staging scores ομαδοποιήθηκαν ως ακολούθως:

- Low Grading 1 – 4 ( 36% του συνόλου )
- High Grading 5 – 8 ( 64% του συνόλου )
- Low Staging 1 – 2 (44% του συνόλου )
- High Staging 3 – 6 (56% του συνόλου )

Οι γονότυποι ομαδοποιήθηκαν στους ανθεκτικούς 1 και 4 και στους ανταποκρινόμενους 2 και 3.

#### Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν

- Μέτρηση τρανσαμινασών SGOT , SGPT , γGT , SAP
- Μέτρηση του υικού φορτίου χρησιμοποιώντας το Amplicor HCV Monitor <sup>TM</sup> assay της εταιρείας Roche Diagnostic System όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.
- Δημιουργία του PCR προϊόντος στην 5'UTR περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 31-331 όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων

Ως εξωτερικοί primers χρησιμοποιήθηκαν

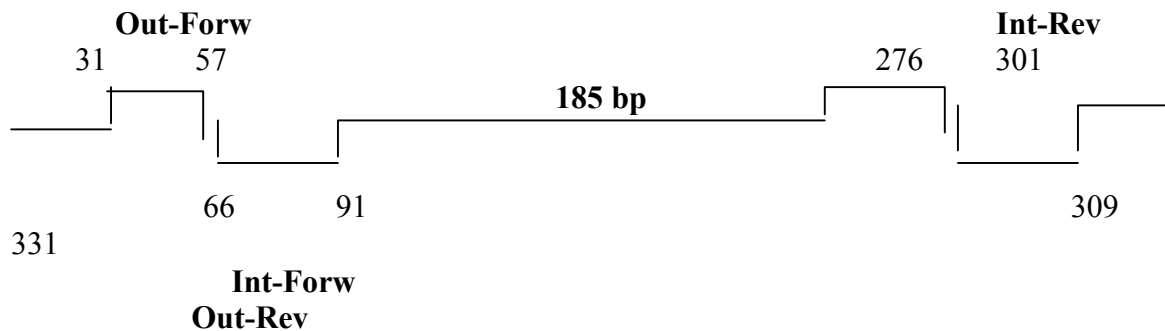
Out-for : 5' CCCTGTGAGGAACTWCTGTCTTCACGC 3' (νουκλεοτίδια 31 - 57)

Out-rev : 5' TGGTGCACGGTCTACGAGACCT 3'(νουκλεοτίδια 309 - 331)

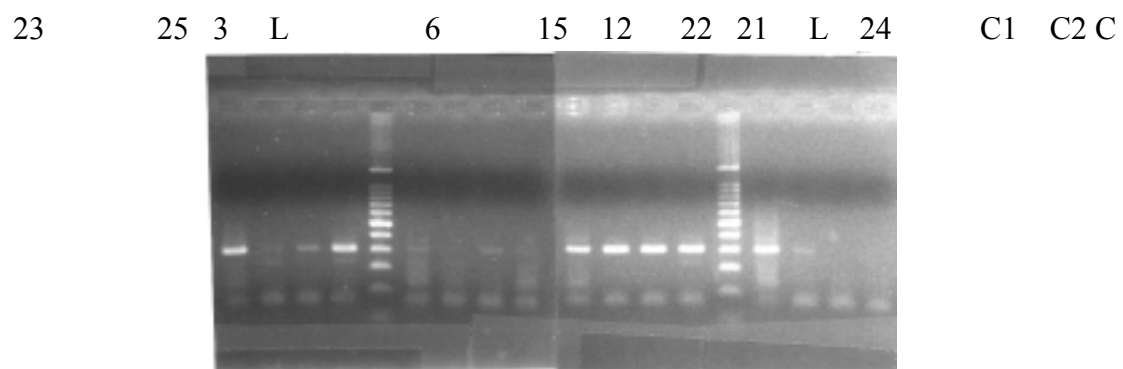
Όταν το προκύπτον PCR προϊόν δεν είναι ορατό σε πήκτωμα αγαρόζης , προχωράμε σε nest PCR χρησιμοποιώντας σαν εσωτερικούς primers τους

Int-for : 5' TCTAGCCATGGCGTTAGTRVGAGTG 3' (νουκλεοτίδια 66 - 91)

Int-rev : 5' CACTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGT 3' (νουκλεοτίδια 276 - 301)



Τα PCR προϊόντα που προκύπτουν ταυτοποιούνται με βάση το μέγεθος τους (300 ή 240 βάσεις αν το προϊόν είναι πρώτη ή δεύτερη PCR) σε 1% πήκτωμα αγαρόζης που βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο. Στη φωτογραφία που ακολουθεί φαίνονται χαρακτηριστικά της πρώτης PCR ασθενών που δημιουργήθηκαν με την παραπάνω διαδικασία και έχουν τρέξει σε 2% πήκτωμα αγαρόζης



**Φωτογραφία 1 :** PCR προϊόντα στην 5'UTR περιοχή  
Marker 100 bp , προϊόν 300 βάσεων

C1: αρνητικός μάρτυρας σε νερό

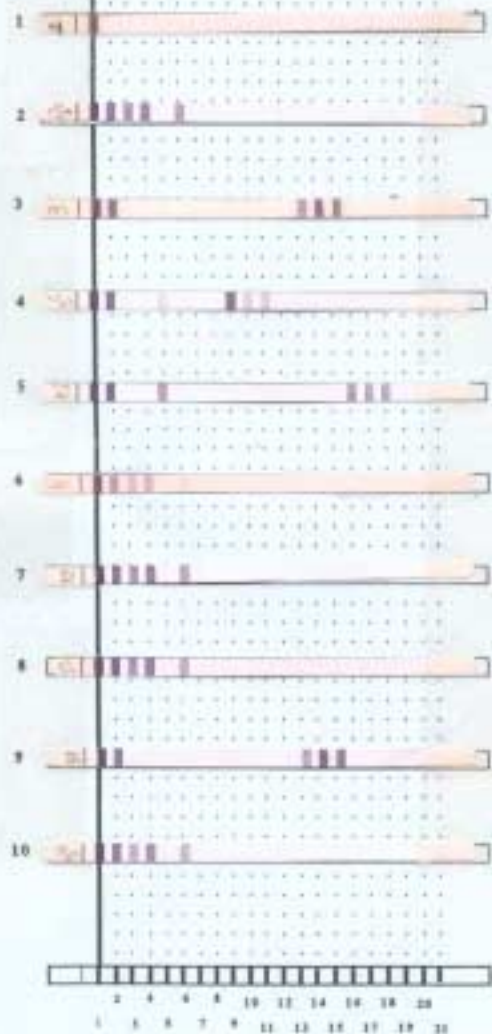
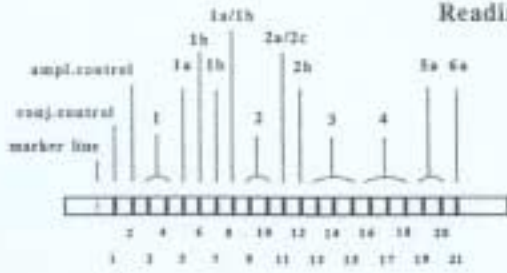
C2: αρνητικός ορός  
L: marker 100 kb DNA ladder  
23,25,3,6,15,12,22,21,24 : θετικά δείγματα

- Καθορισμός των γονότυπων χρησιμοποιώντας το INNO-Lipa HCV II της εταιρείας Innogenetics test ,όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι .Στη σελίδα που ακολουθεί φαίνονται χαρακτηριστικά παραδείγματα γονότυπων ασθενών όπως προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη.

# INNO-LiPA HCV II



## Reading Sheet



Sample id	Positive lines	HCV type	Remarks
C2			ADVERTISED CONTROL
23	1,2,3,4,6	1b	
3	1,2,13,14,15	3a	
25	1,2,5,9,10,11	2a/2c	
15	1,2,5,16,17,18	4c/ad	
6	1,2,3,4,6	1b	
12	1,2,3,4,6	1b	
22	1,2,3,4,6	1b	
21	1,2,13,14,15	3a	
24	1,2,3,4,6	1b	

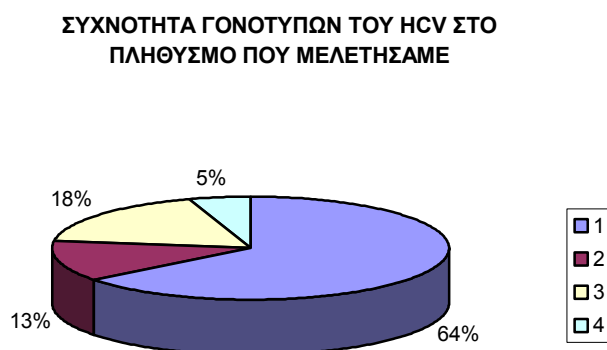
Amplification: date      method      lot no.      Performed by :

INNO-LiPA :      date      lot no.      Performed by :

### 3.2.2 Αποτελέσματα

Η πλειοψηφία των ασθενών δεν συγκαταλεγόταν σε κάποια ομάδα υψηλού κινδύνου , ούτε είχαν συμπεριφορά ή τρόπο ζωής που θα δικαιολογούσε τον τρόπο μόλυνσης από HCV (ναρκομανείς , μεταγγίσεις κ.λ.π) .Οι ασθενείς ανήκαν στην λεγόμενη σποραδική , ή λοίμωξη της κοινότητας. Η διάρκεια της ασθένειας και η ηλικία που μολύνθηκε ο ασθενής δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν.

Ο γονότυπος 1 κυριαρχεί σε 66 από τους 102 , ποσοστό 64% , ακολουθεί ο γονότυπος 3 με ποσοστό 18% , ο γονότυπος 2 εμφανίστηκε σε 13 ασθενείς , ποσοστό 13% , και τελευταίος ο γονότυπος 4, ποσοστό 5%. Δεν ανιχνεύσαμε άλλο είδος γονότυπου 5 ή 6 όπως άλλωστε αναμενόταν. Στο διάγραμμα 1 που ακολουθεί φαίνεται η κατανομή των γονοτύπων ποσοστιαία στο πληθυσμό που μελετήσαμε



Διάγραμμα 1 : Ποσοστιαία κατανομή των γονοτύπων στο πληθυσμό που μελετήσαμε

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν  $51,5 \pm 15,8$  ετών με τον νεότερο 16 ετών και τον γηραιότερο 77 ετών . Από τους 102 ασθενείς οι 49 ήταν άνδρες και οι 53 γυναίκες . Ο μέσος όρος της βαθμοποίησης ,που χαρακτηρίζει τη σοβαρότητα της φλεγμονής κατά Ishak ήταν  $4,79 \pm 1,40$  , ενώ ο μέσος όρος της σταδιοποίησης ,που χαρακτηρίζει τη σοβαρότητα της ίνωσης κατά Ishak , για όλους τους ασθενείς ήταν  $2,73 \pm 1,27$  . Ο μέσος όρος του ιικού φορτίου για τους ασθενείς που καταμετρήθηκαν ήταν  $11,6 \pm 18,8 \times 10^6$  copies RNA HCV / ml ορού.

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται στον πίνακα 2 που ακολουθεί.



Πίνακας 2: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Ηλικία (έτη)	Μέσος όρος $\pm$ SD	51,5 $\pm$ 15,8
	Ενδιάμεσος	56
	Εύρος	16 - 77
Φύλο	(Α/Γ)	49/53
Ιστολογικά ήπατος	Μέσος όρος grading $\pm$ SD	4,79 $\pm$ 1,40
	Μέσος όρος staging $\pm$ SD	2,73 $\pm$ 1,27
Γονότυποι	1	66
	2	13
	3	18
	4	5
Ιικό φορτίο	Mean( $10^6$ copies/ml $\pm$ SD)	11,6 $\pm$ 18,8
	Median	0,6
	Logarithmic mean $\pm$ SD	6,11 $\pm$ 1,14

Μελετώντας τους ασθενείς κατά ομάδες αναλόγως του γονότυπου του ιού HCV που κάθε μια ομάδα έφερε παρατηρήσαμε τις εξής διαφορές

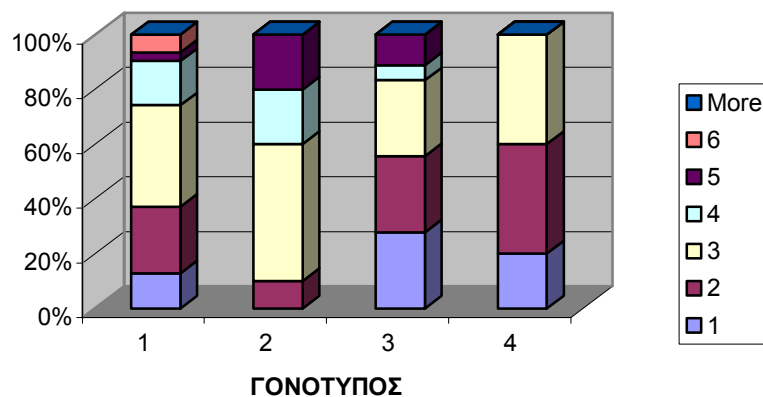
1. Οι ασθενείς με γονότυπο 1 είχαν μέση ηλικία 55,8 σημαντικά μεγαλύτερη από τους μη-1 γονότυπους ( $p=0.007$ ) ενώ η ηλικία του 2 γονότυπου ήταν η μικρότερη . Η διαφορά της μέσης ηλικίας των ασθενών με γονότυπο 1 από την μέση ηλικία των ασθενών με γονότυπο 2 ήταν 13 έτη.
2. Οι άνδρες αποτελούσαν την πλειοψηφία των γονότυπων 4 και 2 με ποσοστά 66% και 54% αντίστοιχα , ενώ οι γυναίκες ήταν περισσότερες στο γονότυπο 1.(Διάγραμμα 2)



Διάγραμμα 2 : Σχέση γονότυπου - φύλου

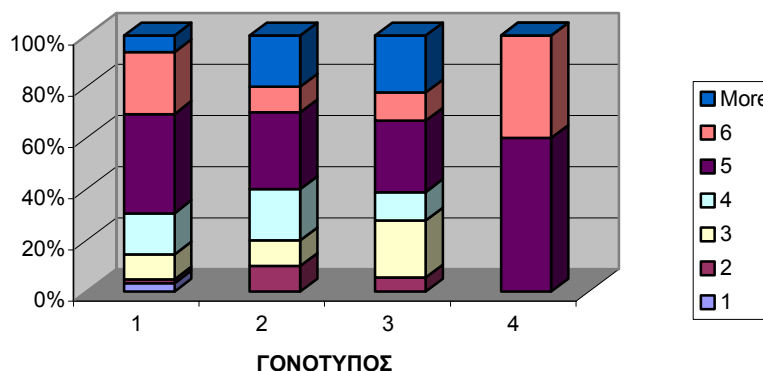
3. Η ιστολογική κατάσταση των γονοτύπων όπως κατεγράφη με την βαθμολόγηση κατά Ishak έδειξε ότι ίνωση ήταν πιο ήπια στο γονότυπο 4 ( staging score  $2.2 \pm 0.8$  ), χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά από τους άλλους γονότυπους (Διάγραμμα 3) .Την αντίθετη ακριβώς εικόνα παρουσιάζει ο γονότυπος 4 στην βαθμοποίηση ,όπου το συνολικό grading score διαμορφώνεται στο  $5.4 \pm 0.5$  χωρίς όμως πάλι να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά από τους άλλους γονότυπους (Διάγραμμα 4).

### ΣΧΕΣΗ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ



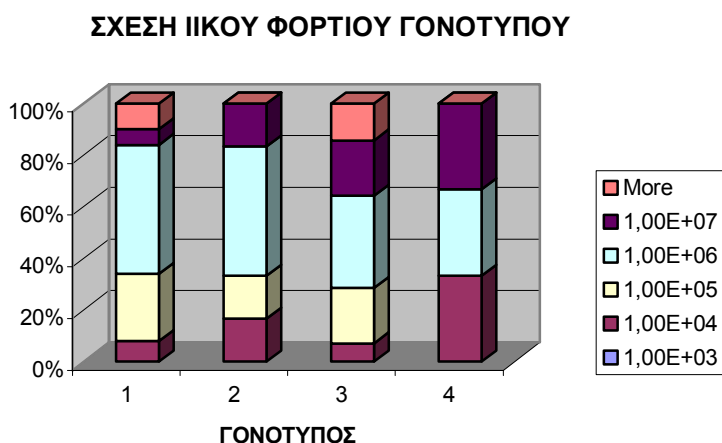
Διάγραμμα 3 : Σχέση σταδιοποίησης - γονότυπου

### ΣΧΕΣΗ ΒΑΘΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ



Διάγραμμα 4 : Σχέση βαθμοποίησης - γονότυπου

4. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των τιμών των βιοχημικών παραμέτρων μεταξύ των διαφόρων υποτύπων του HCV.
5. Αν και διαφαίνεται μια τάση ο γονότυπος 3 να παρουσιάζει υψηλό ιικό φορτίο σε σχέση με τους υπόλοιπους, εν τούτοις η μεγάλη διακύμανση των τιμών το εμποδίζει να είναι στατιστικά σημαντικό. Την αντίθετη τάση παρουσιάζει ο γονότυπος 2 και εμφανίζει γενικά χαμηλές τιμές ιικού φορτίου (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5 : Σχέση ιικού φορτίου – γονότυπου

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών κατά γονότυπο εμφανίζονται στον πίνακα 3 που ακολουθεί

Πίνακας 3: Σχέση γονοτύπων, ιολογικών, ιστολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών

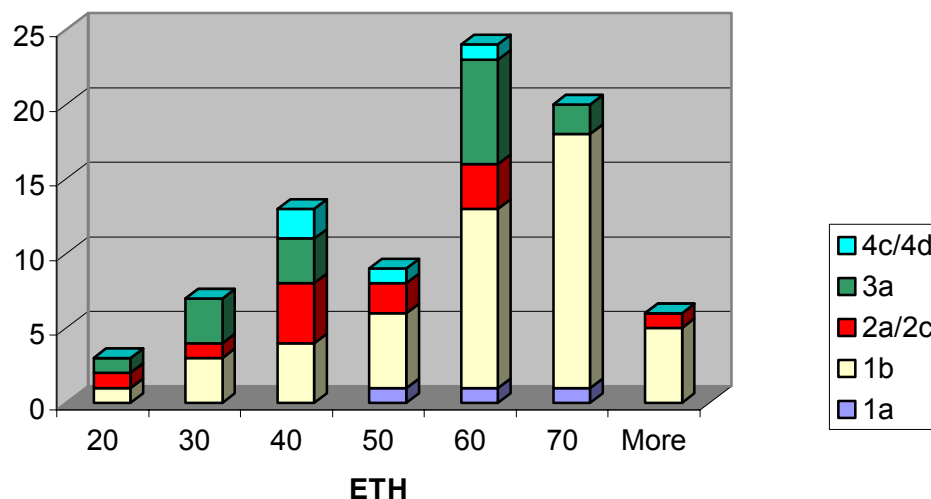
HCV γονότυποι	1	2	3	4
Ηλικία (Μ.Ο± SD)	55,8 ± 13,8	42,4 ± 16,2 *	46,1± 15,8	43,2± 9,3
Άνδρες (%)	44,9	54,5	47,1	66,7
Σταδιοποίηση	2,9 ± 1,3	3,5 ± 1,0	2,4 ± 1,3	2,2 ± 0,8
Βαθμοποίηση	4,8 ± 1,3	4,9 ± 1,8	4,9 ± 1,7	5,4 ± 0,5
SGOT	77 ± 63	79 ± 46	57 ± 42	57 ± 26
SGPT	109 ± 71	102 ± 69	93 ± 68	119 ± 46
γ-GT	51 ± 55	47 ± 30	41 ± 20	25 ± 8
SAP	103 ± 33	95 ± 46	111 ± 35	125 ± 20
Ιικό φορτιο (10 <sup>6</sup> )	5,4 ± 25	0,5 ± 0,4	8,5 ± 20	3,4 ± 5,6

copies/ml)				
------------	--	--	--	--

\*p=0,007

Στην προσπάθεια μας να μελετήσουμε περισσότερο τη σχέση της ηλικίας με τους γονοτύπους ,χωρίσαμε τους ασθενείς σε ομάδες ανά δεκαετίες και είδαμε την κατανομή των γονοτύπων ανά 10-ετία ηλικίας .Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 6. Όπως προκύπτει στις νεότερες ηλικίες , μικρότερες των 40 ετών ο γονότυπος 1 είναι συγκριτικά σπάνιος σε σχέση με τον 3 ή τον 2 . Όσο αυξάνεται η ηλικία των ασθενών η πιθανότητα εμφάνισης του 1 γονότυπου αυξάνει , για να γίνει σε ηλικίες μεγαλύτερες των 70 ετών ο πιο συχνά συναντώμενος γονότυπος (Από τους 50 ασθενείς ηλικίας άνω των 60 ετών οι 36 είχαν γονότυπο 1)

### ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΑΝΑ ΗΛΙΚΙΑ



Διάγραμμα 6 : Κατανομή γονοτύπων ανά ηλικία

### Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής ανάλυσης

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση προσπαθήσαμε να δούμε την πιθανή σχέση των μεταβλητών που περιγράφουν την ιστολογική βλάβη και των υπολοίπων μεταβλητών ,φύλο , ηλικία , ιαμμία , γονότυπο , τρανσαμινάσες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε το staging σαν εξαρτημένη μεταβλητή , ομαδοποιώντας τους

ασθενείς στις δύο κατηγορίες low (1, 2) και high (3,4,5,6) και εξετάσαμε αν η πιθανότητα κάποιος ασθενής να ανήκει σε μια από τις δ'θο κατηγορίες μας έδινε πρόβλεψη για τις υπόλοιπες μεταβλητές.

Όπως δείξαμε και με τα  $\chi^2$  test δεν φάνηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ γονότυπου και ιστολογικών δεδομένων (staging ή grading) , ούτε μεταξύ γονότυπου και φύλου , όπως ομαδοποιήθηκαν οι γονότυποι σε ανθεκτικούς 1 και 4 και ανταποκρινόμενους 2 και 3 .Όμως στις ποσοτικές μεταβλητές βρέθηκαν ζεύγη με πολύ υψηλό βαθμό συσχέτισης:

- SGOT και SGPT είχαν βαθμό συσχέτισης 0.844 (  $p=0.0001$  )
- SGOT και  $\gamma$  – GT είχαν βαθμό συσχέτισης 0.388 (  $p=0.002$  )
- Ηλικία και SAP είχαν βαθμό συσχέτισης 0.348 (  $p=0.005$  )

Το τελικό μοντέλο όμως που προκύπτει περιλαμβάνει δύο μεταβλητές πρόβλεψης , την ηλικία και το grade. Έτσι έχοντας ένα υψηλό grade ( π.χ μεταξύ 5 και 8 ) , αυξάνεται η πιθανότητα (odds) να έχουμε υψηλό staging ( π.χ μεταξύ 3 και 6 ) κατά 10.41 , ενώ αυξανόμενη η ηλικία κατά ένα έτος αυξάνεται η πιθανότητα κατά 1.04 . Άρα η ηλικία είναι ασθενέστερος παράγοντας πρόβλεψης .

Αντίθετα δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ γονότυπου ή τρανσαμινασών και πιθανότητας κάποιος ασθενής να έχει υψηλό ή χαμηλό staging ,δηλαδή δεν συσχετίζεται η ίνωση με το είδος του γονότυπου ή το ύψος των τρανσαμινασών.

### 3.2.3 Συζήτηση

Η ηπατίτιδα C , εξ αιτίας των υψηλών ποσοστών μεταπτώσεως σε χρονιότητα αποτελεί σοβαρό πρόβλημα υγείας . Η Κρήτη είναι μία από τις περιοχές της Ελλάδας που έχει παρατηρηθεί μια αύξηση του αριθμού των ασθενών με ηπατοπάθεια , όπως προκύπτει από τις ανακοινώσεις της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας με βάση την καταγραφή των νοσοκομειακών εξιτηρίων (117).

Από μελέτη( 118 ) των ποσοστών θνησιμότητας από κακοήθη νεοπλασμάτα στην Κρήτη , η συχνότητα του ηπατοκυτταρικού καρκίνου ιδιαίτερα στους άνδρες , βρέθηκε πολύ υψηλή , συγκρίσιμη με αυτή της Ιταλίας και Γαλλίας, υπογραμμίζοντας τη διαφορά που υπάρχει με την υπόλοιπη Ελλάδα. Συγκεκριμένα

στην Κρήτη ο HCC αποτελεί την πέμπτη αιτία θανάτου από νεοπλασίες στους άνδρες και την έβδομη στις γυναίκες. Σε δική μας μελέτη της φυσικής πορείας του HCC διαπιστωθεί ότι το 65% των HCC στην Κρήτη οφείλονται στον HCV και μόνο το 13% οφείλονται στον ιό HBV, ποσοστά ακριβώς αντίθετα από την κυρίως Ελλάδα(119).

Από ανάλυση των αποτελεσμάτων των ιστολογικών εξετάσεων 675 βιοψιών που έγιναν ανάμεσα στα έτη 1992-1997 στην Γαστρεντερολογική κλινική του ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν (αδημοσίευτα δεδομένα), προκύπτει ότι ο ιός HCV είναι ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας για το 55% των βιοψιών. Συγκεκριμένα :

- Χρόνια ηπατίτιδα : 250 ασθενείς / 169 HCV ( 68% )
- Κίρρωση : 118 ασθενείς / 58 HCV ( 49% )

Παλαιότερη έρευνα του εργαστηρίου μας ( 119 )έχει καταγράψει επιπολασμό του anti-HCV των αιμοδοτών της Κρήτης σε ποσοστό 0,36%, με σημαντικές διαφορές μεταξύ των νομών. Τα υψηλότερα ποσοστά (0,79%) παρατηρούνται στο νομό Ρεθύμνης. Αρκετά υψηλό είναι και το ποσοστό του επιπολασμού στους ελεγχθέντες νοσοκομειακούς ασθενείς στα τρία νοσοκομεία της Κρήτης (5,14%), και έτσι εξηγείται η αύξηση των νοσηλειών για ηπατοπάθεια των τελευταίων ετών. Στην ίδια μελέτη εντοπίστηκαν και μερικοί θύλακες υψηλού επιπολασμού όπως στους ασθενείς του Κέντρου Υγείας Σπηλίου ή της περιοχής του Αγίου Νικολάου. Η παντελής απουσία του anti-HCV στις μικρότερες ηλικίες στη περιοχή δημιουργεί υπόνοιες για πιθανή διασπορά του ιού ( ιατρογενής ; ) σε παλαιότερα έτη.

Όλα αυτά τα δεδομένα έθεσαν επιτακτικά την ανάγκη για μια διαφορετική επιδημιολογική μελέτη των ασθενών θετικών σε anti-HCV. Πρωταρχικός στόχος ήταν η καταγραφή των γονότυπων που υπάρχουν στο νησί ,η σχέση τους με την υπόλοιπη Ελλάδα και αν μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα σε σχέση με την χαμηλή ανταπόκριση των ασθενών μας στις διάφορες θεραπείες.

Οι γονότυποι του HCV ενοχοποιούνται για την φυσική πορεία της χρόνιας ηπατοπάθειας που προκαλείται από τον HCV και εμπλέκονται σοβαρά στην ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με IFN-α. Οι γονότυποι 1 και 4 συσχετίζονται με την αντίσταση στη IFN( 82 ,49 ). Για το λόγο αυτό η γνώση για τη

διασπορά τους σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές και η συσχέτιση τους με άλλα χαρακτηριστικά των ασθενών μπορεί να συμβάλει στην αποτελεσματική πρόγνωση και διαμόρφωση σωστότερων θεραπευτικών σχημάτων.

Πολλές μελέτες έχουν δημοσιευτεί με αυτά τα θέματα αλλά τα συμπεράσματα είναι αντικρουόμενα πολλές φορές. Οι γεωγραφικές διαφορές καθώς και οι διαφορετικές μέθοδοι προσδιορισμού ιολογικών μετρήσεων είναι παράγοντες που δικαιολογούν τα αποτελέσματα. Η Κρήτη είναι μια περιοχή με ομογένεια στο πληθυσμό και γι αυτό η μελέτη διασποράς των γονότυπων στο πληθυσμό όπως και η σχέση τους με ιολογικά και ιστολογικά δεδομένα παραμένει ενδιαφέρουσα.

Αν και οι γονότυποι εμφανίζουν μεγάλη διασπορά ανά τον κόσμο υπάρχουν σαφείς διαφορές στη γεωγραφική τους κατανομή. Οι γονότυποι 1a, 1b επικρατούν στην Βόρειο Νότιο Αμερική, και Ευρώπη, ενώ ο 1b επικρατεί στις περισσότερες χώρες της Ασίας. Σε χώρες γειτνιάζουσες με την Ελλάδα, Νοτιοανατολική Ευρώπη και Τουρκία επικρατεί ο 1b γονότυπος, ενώ στη Μέση Ανατολή και Βόρειο Αφρική (Αίγυπτο) εμφανίζεται πολύ συχνά ο γονότυπος 4 (34). Η Κρήτη ούσα στη μέση αυτού του χάρτη παρουσιάζει αυξημένο ποσοστό του 1b γονότυπου σε σχέση με τα δεδομένα από την υπόλοιπη Ελλάδα, ενώ παρά τη γειτνίαση με τις χώρες της Μέσης Ανατολής και Αίγυπτο διαφοροποιείται ως προς την μικρή παρουσία του 4 γονότυπου σε σχέση με τις χώρες αυτές. Το ποσοστό του γονότυπου 4 είναι παρόμοιο με αυτό της υπόλοιπης Ελλάδας.

Η συσχέτιση του 3 γονότυπου με χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών και η αύξηση του αριθμού των χρηστών είχε σαν αποτέλεσμα την διασπορά του 3 γονότυπου και την αξιοσημείωτη παρουσία του και στη δική μας μελέτη. Όπως τέλος αναμενόταν δεν ανιχνεύσαμε γονότυπους 5 ή 6. Κατά την διάρκεια της μελέτης μια συγκεκριμένη περίοδο είχαμε πολλά δείγματα αδιευκρίνιστων γονότυπων που προέκυπταν σαν μίγμα 1b και άλλων γονότυπων, που όμως μετά από πολύ προσπάθεια διευκρινίσαμε ότι ήταν εργαστηριακή επιμόλυνση, δυστυχώς πολύ σημαντική και αρκετά συχνή σε τεχνικές nested PCR.

Η επιδημιολογία των HCV γονότυπων έχει αλλάξει σημαντικά κατά τη διάρκεια των προηγούμενων δεκαετιών, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες χώρες. Ο γονότυπος 1b φαίνεται να είναι δείκτης μεγαλύτερης διάρκειας της νόσου. Η αλλαγή αυτή ίσως εκφράσει ότι ο HCV έχει υποστεί πιέσεις επιλογής μέσω διαφορετικών πηγών μετάδοσης και σε διαφορετικούς ξενιστές (34). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και στη δική μας μελέτη όπου οι μεγαλύτεροι σε ηλικία ασθενείς,

και οι ασθενείς από μετάγγιση ή σποραδική ηπατίτιδα φέρουν συχνότερα 1b γονότυπο ενώ οι νεότεροι και οι χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών φέρουν τον 3a .

Πιθανολογούμε ότι οι γονότυποι 3 και 4 έχουν εισέλθει στο τοπικό πληθυσμό των χρόνιων πασχόντων τα τελευταία 30 ίσως χρόνια. Κατ αρχήν υπάρχει η παρατήρηση ότι σε ενδημικές εστίες ασυμπτωματικής χρόνιας HCV λοίμωξης ( Σπήλι ) ανευρισκόταν σχεδόν αποκλειστικά ο γονότυπος 1b και μάλιστα σε ηλικιωμένα άτομα με αφανή τον τρόπο μετάδοσης του ιού. Το γεγονός επίσης ότι στους ασθενείς άνω των 40 ετών ο γονότυπος 1b είναι συχνότερα απαντώμενος ενισχύει την υπόθεση. Όλα αυτά σε συνδυασμό με την κοινά παραδεκτή υπόθεση για την εξαιρετικά μειωμένη ανταπόκριση του γονότυπου 1b στην κλασσική θεραπεία με IFN-a , θα μπορούσε να οφείλονται σε μεγαλύτερη διάρκεια της HCV λοίμωξης, και επομένως στην φυσική επιλογή στελεχών με αντίσταση ,που αποκτήθηκε κάτω από την αυξημένη ανοσολογική πίεση από την πλευρά του ξενιστή .

Αυτές οι παρατηρήσεις ενισχύονται από πρόσφατη ανακοίνωση ( 120 ) ότι στους Έλληνες ασθενείς από το Εθνικό Κέντρο Μεταδοτικών Νοσημάτων του Ήπατος η μέση ηλικία, η μέση διάρκεια λοίμωξης καθώς και η αναλογία κίρρωτικών ασθενών με γονότυπο 1b, είναι σημαντικά μεγαλύτερες από εκείνες των ασθενών που φέρουν 3a γονότυπο . Είναι δε γνωστό ότι στην HCV λοίμωξη απαιτείται χρονικό διάστημα 20-30 έτη περίπου για να αναπτυχθεί κίρρωση.



### 3.3 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

#### 3.3.1 Υλικά – ασθενείς – μέθοδοι

**Ασθενείς** Οι ασθενείς που έλαβαν μέρος στα θεραπευτικά σχήματα που θα περιγραφούν ήταν ασθενείς της γαστρεντερολογικής κλινικής του ΠΕΠΑΓΝΗ με διαγνωσμένη με βιοψία ηπατίτιδα C. Οι θεραπείες έγιναν μεταξύ των ετών 1994 και 1997. Τα κριτήρια για την ένταξη κάποιου ασθενούς στη ομάδα μελέτης ήταν :

- Παρουσία αντισωμάτων HCV τα οποία ανιχνεύτηκαν με ELISA τρίτης γενεάς ( ELISA 3 , Abbott Laboratories ).
- Απουσία HbsAg ή anti-HIV .
- Αποκλεισμός αλκοολικών .

Όλοι οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν για 18-24 μήνες μετά την διακοπή της θεραπείας.

**Ιστολογικά δεδομένα** Από όλους τους ασθενείς πάρθηκε βιοψία ήπατος , η οποία βαθμονομήθηκε και αξιολογήθηκε με βάση τα κριτήρια Ishak (31) χωρίς προηγούμενη γνώση κλινικών και ιολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

#### Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν

1. Μέτρηση τρανσαμινασών SGOT , SGPT , γGT , SAP
2. Καθορισμός των γονοτύπων χρησιμοποιώντας το INNO-LiPa HCV II της εταιρείας Innogenetics test ,όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι
3. Μέτρηση του ιικού φορτίου χρησιμοποιώντας το Amplicor HCV Monitor <sup>TM</sup> assay της εταιρείας Roche Diagnostic System όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Ορισμός ανταπόκρισης **Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε καλύτερα τα αποτελέσματα των θεραπευτικών σχημάτων ορίσαμε τέσσερα διαφορετικά είδη ανταπόκρισης :**

1. Βραχυχρόνια βιοχημική ανταπόκριση. Αμέσως με το τέλος της θεραπείας εξετάσαμε τις βιοχημικές παραμέτρους του ασθενούς . Αν είχε ομαλοποιήσει τις τρανσαμινάσες (SGOT, SGTP,γ-GT και SAP ) θεωρούσαμε επιτυχή βραχυχρόνια ανταπόκριση.
2. Βραχυχρόνια ιολογική ανταπόκριση. Επιτυχής θεωρήθηκε ο μηδενισμός του ιικού φορτίου με το τέλος της θεραπείας.

3. Μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση. Αν μετά από τουλάχιστον 18 μήνες οι βιοχημικές παράμετροι του ασθενούς παρέμεναν σε ύφεση , η μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση οριζόταν σαν επιτυχής.
4. Μακροχρόνια ιολογική ανταπόκριση. Επιτυχής θεωρήθηκε η μη ανίχνευση του ιού για τουλάχιστον 18 μήνες μετά το τέλος της θεραπείας.

Στατιστική ανάλυση Καταρχήν χρησιμοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση και χρήση της δοκιμασίας Pearson's chi-squared για την ανεύρεση πιθανών σχέσεων μεταξύ της ανταπόκρισης και των υπόλοιπων μεταβλητών (γονότυποι , ιικό φορτίο , βιοχημικές παράμετροι ).Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση με την μέθοδο logistic regression ,όπου η μεταβλητή βιοχημική ή ιολογική ανταπόκριση συγκρίθηκε με προγνωστικούς παράγοντες φύλο , ηλικία , γονότυποι, σταδιοποίηση ,βαθμοποίηση , τρανσαμινάσες , γ-GT , και αλκαλική φωσφατάση. Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 7.5

### 3.3.2 Αποτελέσματα

Στον πίνακα 4 που ακολουθεί περιγράφεται η σύσταση των οι 6 ομάδων που μελετήθηκαν . Στη συνέχεια η κάθε ομάδα παρουσιάζεται αναλυτικά

Πίνακας 4 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

	ΟΜΑΔΑ 1	ΟΜΑΔ Α 2	ΟΜΑΔ Α 3	ΟΜΑΔΑ 4	ΟΜΑΔΑ 5	ΟΜΑΔΑ 6
ΑΡ ΑΣ/ΩΝ	30	35	60	35	36	21
ΦΥΛΟ (Α/Γ) %	53/47	60/40	52/48	40/60	53/47	57/43
ΗΛΙΚΙΑ	52 ± 14	49,2 ± 14,7	50,4 ± 15,6	50,4 ± 14,2	51,2 ± 15,9	51,3 ± 12,4
ΓΟΝΟΤ(%)						
1	50	61	72	50	64	77
2	13	17	11	17	12	-
3	37	22	17	21	20	23
4	-	-	-	12	4	-
ΠΚΟ ΑΡΧΗΣ	5x10 <sup>5</sup> ±2, 1x10 <sup>5</sup>	3 x10 <sup>5</sup> ±3 x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup> ±3 ,5x10 <sup>5</sup>	7 x10 <sup>5</sup> ±2 x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>5</sup> ±8x 10 <sup>5</sup>	7x10 <sup>5</sup> ±3x 10 <sup>5</sup>
ΣΤΑΔ/ΣΗ						

ΒΑΘΜ/ΣΗ ΑΘΡΟΙΣΜ	3,02 ± 1,12 5,03 ± 1,21 8,05 ± 2,18	2,88 ± 1,75 4,56 ± 1,31 7,44 ± 2,80	3,27 ± 1,62 5 ± 1,25 8,27 ± 2,49	2,59 ± 1,18 5,05 ± 1,13 7,64 ± 2,06	2,79 ± 0,93 5 ± 1,1 7,79 ± 1,74	3,6 ± 1,24 5,94 ± 1,26 9,56 ± 2,23
ΑΡΧΗΣ SGOT SGPT G-GT SAP	139 ± 108 153 ± 97 88 ± 92 95 ± 44	106 ± 98 126 ± 73 47 ± 31 86 ± 39	77 ± 53 111 ± 88 49 ± 40 85 ± 36	65 ± 48 93 ± 73 52 ± 72 113 ± 44	72 ± 58 101 ± 92 34 ± 18 112 ± 47	76 ± 32 99 ± 32 44 ± 32 103 ± 46

#### Ομάδα 1: 3 MU IFN-a για 3 μήνες

Το 1994 επιλέχθηκαν 30 ασθενείς και πήραν 3 εκατομμύρια IFN-2a για χρονικό διάστημα 3 μηνών. Το βιοχημικό προφίλ των ασθενών παρουσιάζεται στο πίνακα 5. Από τους 30 ασθενείς οι 16 ήταν άνδρες ,ποσοστό 53% , και οι 14 γυναίκες ,ποσοστό 47% . Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν  $52 \pm 14$  έτη με τον νεότερο 25 ετών και τον γηραιότερο 80 ετών . Ο γονότυπος 1 κυριαρχεί σε ποσοστό 50% , ακολουθεί ο γονότυπος 3 με ποσοστό 37% , και τέλος ο γονότυπος 2 με ποσοστό 13% . Δεν ανιχνεύσαμε άλλο είδος γονότυπου 4, 5 ή 6. Ο μέσος όρος της βαθμοποίησης κατά Ishak ήταν  $5,03 \pm 1,21$ , ενώ ο μέσος όρος της σταδιοποίησης για όλους τους ασθενείς ήταν  $3,02 \pm 1,12$ . Ο μέσος όρος του ιικού φορτίου για τους ασθενείς που καταμετρήθηκαν ήταν  $5 \pm 2,1 \times 10^5$  copies RNA HCV / ml ορού

#### Πίνακας 5.

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας 1 (3MU IFN-a για 3 μήνες)

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 1

	ΒΡΑΧΥΧΡΟ ΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧΥΧΡΟ ΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟ ΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟ ΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	14/30	16/30	4/28	24/28
ΦΥΛΟ (Α/Γ) %	50 / 50	56 / 44	25 / 75	54 / 56
ΗΛΙΚΙΑ (Μ.Ο±Τ.Α)	49,8 ± 15	55 ± 13	56,7 ± 8	52,4 ± 14,7
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ (%)				
1	30	75	45	50
2	36	10	20	30
3	34	15	35	20
4	-	-	-	-
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ				
ΣΤΑΔ/ΣΗ	2,2 ± 1,1	3,0 ± 1,2	1,5 ± 0,9	2,1 ± 1,8
ΒΑΘΜ/ΣΗ	3,9 ± 1,4	4,6 ± 0,8	2,8 ± 1,5	4,9 ± 1,3
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	6,1 ± 2,5	7,6 ± 2,0	4,3 ± 2,4	7,0 ± 3,1

	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
ΗΛΙΚΙΑ	52	14
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	3,02	1,12
ΒΑΘΜΟΠΟΙΗΣΗ	5,03	1,21
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	8,05	2,18
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΑΡΧΗΣ	5x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>5</sup>
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΤΕΛΟΥΣ	3x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>
SGOT-ΑΡΧΗΣ	139	108
SGPT- ΑΡΧΗΣ	153	97
G-GT- ΑΡΧΗΣ	88	92
SAP- ΑΡΧΗΣ	95	44
SGOT- ΤΕΛΟΥΣ	50	36
SGPT- ΤΕΛΟΥΣ	69	58
G-GT- ΤΕΛΟΥΣ	50	35
SAP- ΤΕΛΟΥΣ	75	45

BIOX. APXHΣ				
SGOT	158 ± 135	122 ± 78	258 ± 187	120 ± 83 *
SGPT	170 ± 119	139 ± 75	245 ± 153	143 ± 84
G-GT	111 ± 137	72 ± 38	149 ± 212	78 ± 57
SAP	81 ± 50	104 ± 39	120 ± 62	94 ± 41
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	47	53	14	86

\*p=0,018

Από τους 30-ασθενείς που εντάχθηκαν στο θεραπευτικό σχήμα μετά το τέλος της θεραπείας παρουσίασαν βιοχημική ανταπόκριση οι 14 ενώ οι υπόλοιποι 16 δεν ομαλοποίησαν τις βιοχημικές παραμέτρους. Μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση όμως παρουσίασαν μόνο 4 ασθενείς και 24 συνολικά υποτροπίασαν. Για τους υπόλοιπους 2 δεν έχουμε στοιχεία διότι εγκατέλειψαν το σχήμα. Έτσι ενώ τα ποσοστά στη βραχυχρόνια ανταπόκριση ήταν 47% επιτυχία και 53% αποτυχία , αντιστρέφονται για μακροχρόνια ανταπόκριση σε 14% και 86% αντίστοιχα.

Το φύλο δεν συσχετίζεται κατ αρχή με την βραχυχρόνια ανταπόκριση . Μακροπρόθεσμα όμως από τους 4 που ανταποκρίθηκαν οι 3 ήταν γυναίκες και ο 1 άνδρας . Η ηλικία δεν συσχετίζεται με την μακροχρόνια ανταπόκριση. Επίσης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση τόσο στα ιστολογικά δεδομένα ,όσο και στις βιοχημικές παραμέτρους μεταξύ ανταποκρινόμενων και μη ασθενών είτε για την βραχυχρόνια είτε για την μακροχρόνια ανταπόκριση . Μόνο για τους μακροχρόνια ανταποκρινόμενους ισχύει στην μονοπαραγοντική ανάλυση ότι οι επιτυχώς ανταποκρινόμενοι παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές SGOT (p=0,018).

Οι γονότυποι 2 και 3 ανταποκρίνονται καλύτερα βραχυπρόθεσμα απ ότι ο γονότυπος 1. Το 75% αυτών που δεν βελτιώνουν τις βιοχημικές τους παραμέτρους με το τέλος της θεραπείας είναι γονότυπου 1. Όμως μακροπρόθεσμα τα ποσοστά των γονότυπων μεταξύ ανταποκριθέντων και μη, δεν διαφοροποιούνται πολύ από τα αρχικά.

#### ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 1

Η ιολογική βραχυχρόνια ανταπόκριση κυμάνθηκε στα 10% , ενώ μετά από 18 μήνες μηδενικό ιικό φορτίο παρουσίαζε μόνο το 4% των ασθενών .

	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	14/30	3/30	4/28	1/28
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	47%	10%	14%	4%

#### Ομάδα 2: 5 MU IFN-a για 6 μήνες

Το 1994 επιλέχθηκαν 35 ασθενείς και πήραν 5 εκατομμύρια IFN-2a για χρονικό διάστημα 6 μηνών. Το βιοχημικό προφίλ των ασθενών παρουσιάζεται στο πίνακα 6. Από τους 35 ασθενείς οι 21 ήταν άνδρες ,ποσοστό 60% , και οι 14 γυναίκες ,ποσοστό 40% . Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν  $49,2 \pm 14,7$  έτη με τον νεότερο 17 ετών και τον γηραιότερο 72 ετών . Ο γονότυπος 1 κυριαρχεί σε ποσοστό 57% , ακολουθεί ο γονότυπος 3 με ποσοστό 26% , και τέλος ο γονότυπος 2 με ποσοστό 17% . Δεν ανιχνεύσαμε άλλο είδος γονότυπου 4, 5 ή 6. Ο μέσος όρος της βαθμοποίησης κατά Ishak ήταν  $4,56 \pm 1,31$  , ενώ ο μέσος όρος της σταδιοποίησης για όλους τους ασθενείς ήταν  $2,88 \pm 1,75$ . Ο μέσος όρος του ιικού φορτίου ήταν  $3 \pm 3 \times 10^5$  copies RNA HCV / ml ορού

#### Πίνακας 6.

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας 2 (5MU IFN-a για 6 μήνες)

	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΟΣ
ΗΛΙΚΙΑ	49,2	14,7	55	54
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	2,88	1,75	5	2
ΒΑΘΜΟΠΟΙΗΣΗ	4,56	1,31	5	5
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	7,44	2,8	9	7
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΑΡΧΗΣ	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$9,8 \times 10^4$
Log ΠΟΣ/ΚΟΥ ΑΡΧΗΣ	4,951	0,77699	2,38	4,99
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΤΕΛΟΥΣ	$2 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$4 \times 10^4$

SGOT-APXHΣ	106	98	451	74
SGPT- APXHΣ	126	73	357	115
G-GT- APXHΣ	47	31	108	39
SAP- APXHΣ	86	39	189	89
SGOT- ΤΕΛΟΥΣ	48	64	382	34
SGPT- ΤΕΛΟΥΣ	39	23	86	30
G-GT- ΤΕΛΟΥΣ	33	17	65	31
SAP- ΤΕΛΟΥΣ	70	29	159	67

## ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 2

	ΒΡΑΧΥΧΡΟ ΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧΥΧΡΟ ΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟ ΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟ ΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	21/35	14/35	5/35	30/35
ΦΥΛΟ (Α/Γ) %	62 / 38	57 / 43	40 / 60	63 / 37
ΗΛΙΚΙΑ (Μ.Ο±Τ.Α)	51,3 ± 13	46,9 ± 16	54 ± 7,2	48,2 ± 16
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ				
1	38	80	50	57
2	24	10	-	19
3	38	10	50	24
4	-	-	-	-
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΑΔ/ΣΗ	2,3 ± 1,4	3,3 ± 1,9	1,0 ± 0	3,1 ± 1,7
ΒΑΘΜ/ΣΗ	4,1 ± 1,9	4,9 ± 0,6	2,5 ± 0,7	4,9 ± 1,1*
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	6,4 ± 3,1	8,2 ± 2,4	3,5 ± 0,7	8,0 ± 2,5**
ΒΙΟΧ. ΑΡΧΗΣ				
SGOT	89 ± 70	129 ± 127	68 ± 62	111 ± 101
SGPT	100 ± 52	164 ± 83+	38 ± 20	138 ±
G-GT	44 ± 28	51 ± 35	35 ± 31	69++
SAP	86 ± 47	86 ± 26	61 ± 44	49 ± 31
				90 ± 38
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	60	40	14	86

\*p=0,012 , \*\*p=0,03 , +p=0,009 , ++p=0,007

Από τους 35-ασθενείς που εντάχθηκαν στο θεραπευτικό σχήμα μετά το τέλος της θεραπείας παρουσίασαν βιοχημική ανταπόκριση οι 21 ενώ οι υπόλοιποι 14 δεν ομαλοποίησαν τις βιοχημικές παραμέτρους. Από τους 14 οι μισοί 7 δεν ομαλοποίησαν ποτέ τρανσαμινάσες, ενώ οι υπόλοιποι 7 υποτροπίασαν κατά τη

διάρκεια της θεραπείας. Μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση όμως παρουσίασαν μόνο 5 ασθενείς και 30 συνολικά υποτροπίασαν. Και οι 5 που ανταποκρίθηκαν μακροπρόθεσμα είχαν ομαλοποιήσει τρανσαμινάσες το πρώτο τετράμηνο θεραπείας. Οι 2 από αυτούς ήταν 3α γονότυπος, 1 ήταν 1b και οι 2 μη χαρακτηρισμένοι λόγω ελλείψεως δεδομένων. Έτσι ενώ τα ποσοστά στη βραχυχρόνια ανταπόκριση ήταν 60% επιτυχία και 40% αποτυχία, αντιστρέφονται για μακροχρόνια ανταπόκριση σε 14% και 86% αντίστοιχα.

Κατ' αρχή οι άνδρες ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία, ομαλοποιώντας τις βιοχημικές παραμέτρους πιο άμεσα απ' ό,τι οι γυναίκες αλλά μακροπρόθεσμα υποτροπιάζουν πιο γρήγορα απ' ό,τι οι γυναίκες. Οι ασθενείς με γονότυπους 2 και 3 ανταποκρίνονται πιο άμεσα, αλλά τελικά μετά από 18 μήνες τα ποσοστά των γονότυπων που υποτροπιάζουν δεν διαφέρουν πολύ από τα αρχικά. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας ασθενών, φύλου, γονότυπου και ιικού φορτίου πριν την θεραπεία με το αποτέλεσμα της βιοχημικής ανταπόκρισης είτε βραχυχρόνιας, είτε μακροχρόνιας. Επίσης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στα ιστολογικά δεδομένα μεταξύ βραχυχρόνιων ανταποκρινόμενων και μη ασθενών.

Αντίθετα είναι εμφανής η τάση συσχέτισης της ιστολογικής κατάστασης του ήπατος όπως την περιέγραψαν οι βιοψίες με την μακροχρόνια έκβαση της θεραπείας. Οι ασθενείς που ξεκινούν από χαμηλότερες τιμές σταδιοποίησης, βαθμοποίησης κατά Ishak φαίνεται να ανταποκρίνονται καλύτερα στην θεραπεία απ' ό,τι αυτοί που ξεκινούσαν με υψηλότερες τιμές. Έτσι οι ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές σταδιοποίησης  $1 \pm 0$ , βαθμοποίησης  $2,5 \pm 0,7$  και σύνολο  $3,5 \pm 0,7$  ενώ οι μη ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές σταδιοποίησης  $3,1 \pm 1,7$  βαθμοποίησης  $4,9 \pm 1,1$ , και σύνολο  $8 \pm 0,2,5$ . Οι τιμές για την βαθμοποίηση και το σύνολο είναι στατιστικά σημαντικές  $p=0,012$  και  $p=0,03$  αντίστοιχα.

Είναι εμφανής η τάση συσχέτισης της SGPT πριν την ένταξη σε θεραπεία με την επιτυχή έκβαση της θεραπείας, τόσο στην βραχυχρόνια, όσο και στην μακροχρόνια ανταπόκριση. Οι ασθενείς που ξεκινούν από χαμηλότερες τιμές SGPT, φαίνεται να ανταποκρίνονται καλύτερα στην θεραπεία απ' ό,τι αυτοί που ξεκινούσαν με υψηλότερες τιμές. Έτσι οι βραχυχρόνια ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές  $SGPT=100 \pm 52$  ενώ οι μη ανταποκρινόμενοι  $SGPT=164 \pm 83$  ( $p=0,009$ ). Όμοια οι μακροχρόνια ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές  $SGPT=38 \pm 20$ , ενώ οι μη



ανταποκρινόμενοι SGPT=138±69 (p=0,007). Οι υπόλοιπες τιμές βιοχημικών παραμέτρων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

#### ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 2

Η ιολογική βραχυχρόνια ανταπόκριση κυμάνθηκε στα 26% για να μηδενιστεί μετά από 18 μήνες .

	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	21/35	9/35	5/35	0/35
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	60%	26%	14%	0%

#### Ομάδα 3 : Συνδυασμένη θεραπεία 3 MU IFN-a και 1000 mg UDCA για 12 μήνες

Το 1995 επιλέχθηκαν 60 ασθενείς και πήραν συνδυασμένη θεραπεία 3 MU IFN-a και UDCA για χρονικό διάστημα 12 μηνών. Το βιοχημικό προφίλ των ασθενών παρουσιάζεται στο πίνακα 7. Από τους 60 ασθενείς οι 31 ήταν άνδρες ,ποσοστό 52% , και οι 29 γυναίκες ,ποσοστό 48% . Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 50,4±15,6 έτη με τον νεότερο 19 ετών και τον γηραιότερο 79 ετών . Ο γονότυπος 1 κυριαρχεί σε ποσοστό 68% , ακολουθεί ο γονότυπος 3 με ποσοστό 21% , και τέλος ο γονότυπος 2 με ποσοστό 11% . Δεν ανιχνεύσαμε άλλο είδος γονότυπου 4, 5 ή 6. Ο μέσος όρος της βαθμοποίησης κατά Ishak ήταν 5 ± 1,25 , ενώ ο μέσος όρος της σταδιοποίησης για όλους τους ασθενείς ήταν 3,27 ± 1,62. Ο μέσος όρος του ιικού φορτίου ήταν 2 ± 3,5X10<sup>5</sup> copies RNA HCV / ml ορού

#### Πίνακας 7.

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας 3 ( INF-2a + UDCA)

	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΟΣ
ΗΛΙΚΙΑ	50,4	15,6	60	54
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	3,27	1,62	5	3
ΒΑΘΜΟΠΟΙΗΣΗ	5	1,25	4	5
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	8,27	2,49	8	8
ΠΟΣΟΤΙΚΟ	2x10 <sup>5</sup>	3,5 x10 <sup>5</sup>	1 x10 <sup>6</sup>	8 x10 <sup>4</sup>

ΑΡΧΗΣ				
Log ΠΟΣ/ΚΟΥ ΑΡΧΗΣ	4,8	0,737	2,34	4,91
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΤΕΛΟΥΣ	4,6 x10 <sup>4</sup>	1,2 x10 <sup>5</sup>	4 x10 <sup>5</sup>	4 x10 <sup>3</sup>
SGOT-ΑΡΧΗΣ	77	53	245	62
SGPT- ΑΡΧΗΣ	111	88	446	75
G-GT- ΑΡΧΗΣ	49	40	174	37
SAP- ΑΡΧΗΣ	85	36	162	81
SGOT- ΤΕΛΟΥΣ	44	27	99	33
SGPT- ΤΕΛΟΥΣ	47	34	136	37
G-GT- ΤΕΛΟΥΣ	34	30	139	26
SAP- ΤΕΛΟΥΣ	84	40	217	74

### ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 3

	ΒΡΑΧΥΧΡΟ ΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧΥΧΡΟ ΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟ ΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟ ΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	35/60	25/60	12/56	44/56
ΦΥΛΟ (Α/Γ) %	60 / 40	40 / 60	50 / 50	50 / 50
ΗΛΙΚΙΑ (Μ.Ο±Τ.Α)	48,3 ± 16,6	52,9 ± 14	39,8 ± 13,2	56,7 ± 12,2*
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ				
1	50	82	-	82
2	25	-	75	-
3	25	18	25	18
4	-	-	-	-
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ				
ΣΤΑΔ/ΣΗ	2,8 ± 1,4	3,6 ± 1,8	3,0 ± 1,4	3,3 ± 1,7
ΒΑΘΜ/ΣΗ	4,7 ± 1,6	5,2 ± 1	5,5 ± 2,1	4,9 ± 1,2
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	7,5 ± 2,6	8,8 ± 2,4	8,5 ± 3,5	8,2 ± 3,5
ΒΙΟΧ. ΑΡΧΗΣ				
SGOT	61 ± 32	102 ± 73+	53 ± 26	87 ± 60
SGPT	87 ± 51	146 ±	81 ± 46	124 ± 93
G-GT	41 ± 32	110++	31 ± 18	58 ± 41**
SAP	86 ± 32	65 ± 43+++ 86 ± 32	92 ± 37	85 ± 33
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	58	42	21	79

\*p=0,0003 , \*\*p=0,04 , +p=0,005 , ++p=0,008 , +++p=0,026

Από τους 60-ασθενείς που εντάχθηκαν στο θεραπευτικό σχήμα μετά το τέλος της θεραπείας παρουσίασαν βιοχημική ανταπόκριση οι 35 ενώ οι υπόλοιποι 25 δεν ομαλοποίησαν τις βιοχημικές παραμέτρους. Μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση όμως παρουσίασαν μόνο 12 ασθενείς και 44 συνολικά υποτροπίασαν. Για τους υπόλοιπους 4 δεν έχουμε στοιχεία διότι εγκατέλειψαν το σχήμα. Έτσι ενώ τα ποσοστά στη βραχυχρόνια ανταπόκριση ήταν 58% επιτυχία και 42% αποτυχία , αντιστρέφονται για μακροχρόνια ανταπόκριση σε 21% και 79% αντίστοιχα.

Οι άνδρες δείχνουν να ανταποκρίνονται βραχυπρόθεσμα καλύτερα από ότι οι γυναίκες σε αυτό το θεραπευτικό σχήμα (60/40%) , αλλά μακροπρόθεσμα το φύλο δεν φαίνεται να παίζει κανένα ρόλο αφού τα ποσοστά επιτυχίας ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες είναι 50% .Η ηλικία φαίνεται να συσχετίζεται με την μακροχρόνια ανταπόκριση. Έτσι οι μακροχρόνια ανταποκρινόμενοι είναι οι νεότεροι με μέσο όρο ηλικίας  $39,8 \pm 13,2$  ,έναντι των μη ανταποκρινόμενων που έχουν μέσο όρο ηλικίας  $56,7 \pm 12,2$  ( $p=0,0003$  ) .

Ο γονότυπος 1 έχει πολύ κακή ανταπόκριση τόσο στη βραχυχρόνια , όσο και στη μακροχρόνια ανταπόκριση . Το 82% των ασθενών που δεν ανταποκρίθηκαν ήταν γονότυπος 1, ενώ κανένας 1 γονότυπος δεν διατήρησε φυσιολογικές τιμές τρανσανινασών μετά τους 18 μήνες.

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στα ιστολογικά δεδομένα μεταξύ ανταποκρινόμενων και μη ασθενών είτε για την βραχυχρόνια είτε για την μακροχρόνια ανταπόκριση .

Αντίθετα είναι εμφανής η τάση συσχέτισης των SGOT , SGPT και  $\gamma$ -GT πριν την ένταξη σε θεραπεία με την επιτυχή έκβαση της θεραπείας στην βραχυχρόνια ανταπόκριση . Οι ασθενείς που ξεκινούν από χαμηλότερες τιμές των SGOT , SGPT και  $\gamma$ -GT , φαίνεται να ανταποκρίνονται καλύτερα στην θεραπεία απ' ότι αυτοί που ξεκινούσαν με υψηλότερες τιμές . Έτσι οι βραχυχρόνια ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές  $SGOT=61 \pm 32$ ,  $SGPT=87 \pm 51$  και  $\gamma$ -GT= $41 \pm 32$  ενώ οι μη ανταποκρινόμενοι  $SGOT=102 \pm 73$ ,  $SGPT=146 \pm 110$  και  $\gamma$ -GT= $65 \pm 43$  . Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p=0,005$  ,  $p=0,008$  και  $p=0,026$  για τις SGOT , SGPT και  $\gamma$ -GT αντίστοιχα. Όσον αφορά τους μακροχρόνια ανταποκρινόμενους , μόνο η  $\gamma$ -GT παρουσιάζει στατιστικά διαφοροποίηση μεταξύ ανταποκρινόμενων και μη (  $p=0,04$  ).

### ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 3

Η ιολογική βραχυχρόνια ανταπόκριση κυμάνθηκε στα 45% , ενώ μετά από 18 μήνες η μέτρηση ιικού φορτίου έδειξε μηδέν μόνο στο 4% των ασθενών .

	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	35/60	27/60	12/56	2/56
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	58%	45%	21%	4%

### Ομάδα 4 : Συνδυασμένη θεραπεία 5 MU IFN-a και 500 mg D-Penicilamin για 6 μήνες

Το 1996 επιλέχθηκαν 35 ασθενείς και πήραν συνδυασμένη θεραπεία 5 εκατομμυρίων IFN-a και D-Penicylamin για χρονικό διάστημα 6 μηνών. Το βιοχημικό προφίλ των ασθενών παρουσιάζεται στο πίνακα 8. Από τους 35 ασθενείς οι 14 ήταν άνδρες ,ποσοστό 40% , και οι 21 γυναίκες ,ποσοστό 60% . Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν  $50,39 \pm 14,2$  έτη με τον νεότερο 17ετών και τον γηραιότερο 74 ετών . Ο γονότυπος 1 κυριαρχεί σε ποσοστό 50% , ακολουθεί ο γονότυπος 3 με ποσοστό 21% , ο γονότυπος 2 με ποσοστό 17% και τελευταίος ο γονότυπος 4 με ποσοστό 12%. Δεν ανιχνεύσαμε άλλο είδος γονότυπου 5 ή 6 γεγονός που αναμενόταν με τις έως τότε μετρήσεις μας . Ο μέσος όρος της βαθμοποίησης κατά Ishak ήταν  $5,05 \pm 1,13$  , ενώ ο μέσος όρος της σταδιοποίησης για όλους τους ασθενείς ήταν  $2,59 \pm 1,18$ . Ο μέσος όρος του ιικού φορτίου ήταν  $0,7 \pm 2 \times 10^6$  copies RNA HCV / ml ορού

Πίνακας 8.

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας 4 ( INF-2a + D PENICILAMIN )

	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΟΣ
ΗΛΙΚΙΑ	50,39	14,2	57	56
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	2,59	1,18	5	3

ΒΑΘΜΟΠΟΙΗΣΗ	5,05	1,13	5	5
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	7,64	2,06	8	8
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΑΡΧΗΣ	$7 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^5$
Log ΠΟΣ/ΚΟΥ ΑΡΧΗΣ	5,06	0,95	3,53	5,15
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΤΕΛΟΥΣ	$2 \times 10^6$	$6 \times 10^6$	$3 \times 10^7$	$7 \times 10^4$
SGOT-ΑΡΧΗΣ	65	48	229	48
SGPT- ΑΡΧΗΣ	93	73	357	69
G-GT- ΑΡΧΗΣ	52	72	366	29
SAP- ΑΡΧΗΣ	113	44	208	105
SGOT- ΤΕΛΟΥΣ	35	20	87	30
SGPT- ΤΕΛΟΥΣ	40	29	137	31
G-GT- ΤΕΛΟΥΣ	46	59	286	23
SAP- ΤΕΛΟΥΣ	115	82	353	79

#### ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 4

	ΒΡΑΧΥΧΡΟ ΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧΥΧΡΟ ΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟ ΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟ ΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	28/35	7/35	7/35	28/35
ΦΥΛΟ (Α/Γ) %	39 / 61	43 / 57	43 / 57	39 / 61
ΗΛΙΚΙΑ (Μ.Ο±Τ.Α)	51 ± 13	49 ± 20	46 ± 18	51 ± 13
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ				
1	45	75	40	56
2	20	-	20	17
3	25	-	40	17
4	10	25	-	10
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΑΔ/ΣΗ ΒΑΘΜ/ΣΗ ΑΘΡΟΙΣΜΑ	2,33 ± 0,91 4,94 ± 1,21 7,28 ± 1,99	3,75 ± 1,71 <sup>+</sup> 5,5 ± 0,58 9,25 ± 1,71	2,0 ± 1 4,6 ± 1,14 6,6 ± 2,07	2,76 ± 1,2 5,18 ± 1,13 7,94 ± 2,01
ΒΙΟΧ. ΑΡΧΗΣ				
SGOT	62 ± 49	80 ± 39	32 ± 12	74 ± 50 <sup>++++</sup>
SGPT	89 ± 78	106 ± 41	49 ± 30	103 ± 75
G-GT	38 ± 43	106 ± 126 <sup>++</sup>	48 ± 70	52 ± 73
SAP	106 ± 34	149 ± 65 <sup>+++</sup>	99 ± 25	118 ± 48
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	80	20	20	80

+p=0,026 , ++p=0,021 , +++p=0,018 , ++++p=0,038

Από τους 35-ασθενείς που εντάχθηκαν στο θεραπευτικό σχήμα μετά το τέλος της θεραπείας παρουσίασαν βιοχημική ανταπόκριση οι 28 ενώ οι υπόλοιποι 7 δεν ομαλοποίησαν τις βιοχημικές παραμέτρους. Μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση όμως παρουσίασαν μόνο 7 ασθενείς και 28 συνολικά υποτροπίασαν. Έτσι ενώ τα ποσοστά στη βραχυχρόνια ανταπόκριση ήταν 80% επιτυχία και 20% αποτυχία , αντιστρέφονται για μακροχρόνια ανταπόκριση σε 20% και 80% αντίστοιχα.

Οι γονότυποι 1 και 4 ανθίστανται στη θεραπεία τόσο βραχυπρόθεσμα , όσο και μακροπρόθεσμα. Η ηλικία δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην έκβαση της θεραπείας τόσο σε βραχυπρόθεσμο ,όσο και με την μακροπρόθεσμο χρονικό διάστημα. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στα ιστολογικά δεδομένα μεταξύ ανταποκρινόμενων και μη ασθενών είτε για την βραχυχρόνια είτε για την μακροχρόνια ανταπόκριση, εκτός της σταδιοποίησης για τους βραχυχρόνια ανταποκρινόμενους (p=0,026).

Στους μακροχρόνια ανταποκρινόμενους δεν είναι εμφανής η τάση συσχέτισης των SAP, SGPT και γ-GT πριν την ένταξη σε θεραπεία με την επιτυχή ή όχι έκβαση της θεραπείας. Μόνο η SGOT εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση . Ανταποκρινόμενοι  $32 \pm 12$  μη ανταποκρινόμενοι  $74 \pm 50$  με p=0,038.

Στους βραχυχρόνια ανταποκρινόμενους οι SGOT, SGPT δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση , αντίθετα με τις γ-GT και SAP που οι τυχόν χαμηλές τιμές τους συσχετίζονται με την επιτυχή έκβαση της βραχυχρόνιας ανταπόκρισης . Έτσι οι βραχυχρόνια ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές γ-GT=38±43 και SAP=106±34 ενώ οι μη ανταποκρινόμενοι γ-GT=106±126 και SAP=149±65 Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με p=0,021 , p=0,018 για τις γ-GT και SAP αντίστοιχα.

#### ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 4

Η ιολογική βραχυχρόνια ανταπόκριση κυμάνθηκε στα 15% , ενώ μετά από 18 μήνες η μέτρηση ιικού φορτίου έδειξε μηδέν μόνο στο 13% των ασθενών .

	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ
--	-----------------------	----------------------	-----------------------	----------------------

	ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΕΠΙΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	28/35	5/35	7/35	4/35
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	80%	15%	20%	13%

Ομάδα 5 :Συνδυασμένη θεραπεία 5 MU IFN-a και 100 mg Meculid για 6 μήνες

Το 1997 επιλέχθηκαν 36 ασθενείς και πήραν συνδυασμένη θεραπεία 5 εκατομμυρίων IFN-a και mesulid για χρονικό διάστημα 6 μηνών. Το βιοχημικό προφίλ των ασθενών παρουσιάζεται στο πίνακα 9. Από τους 36 ασθενείς οι 19 ήταν άνδρες ,ποσοστό 53% , και οι 17 γυναίκες ,ποσοστό 47% . Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν  $51,22 \pm 15,87$  έτη με τον νεότερο 22 ετών και τον γηραιότερο 75 ετών . Ο γονότυπος 1 κυριαρχεί σε ποσοστό 64% , ακολουθεί ο γονότυπος 3 με ποσοστό 20% , ο γονότυπος 2 με ποσοστό 12% και τελευταίος ο γονότυπος 4 με ποσοστό 4%. Δεν ανιχνεύσαμε άλλο είδος γονότυπου 5 ή 6 γεγονός που αναμενόταν με τις έως τότε μετρήσεις μας . Ο μέσος όρος της βαθμοποίησης κατά Ishak ήταν  $5 \pm 1,1$  , ενώ ο μέσος όρος της σταδιοποίησης για όλους τους ασθενείς ήταν  $2,79 \pm 0,93$ . Ο μέσος όρος του ιικού φορτίου ήταν  $9 \pm 8 \times 10^5$  copies RNA HCV / ml ορού

Πίνακας 9.

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας 5 ( INF-2a + meculid )

	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΟΣ
ΗΛΙΚΙΑ	51,22	15,87	53	56
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	2,79	0,93	3	3
ΒΑΘΜΟΠΟΙΗΣΗ	5	1,1	4	5
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	7,79	1,74	7	8
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΑΡΧΗΣ	9 x10 <sup>5</sup>	8 x10 <sup>5</sup>	3 x10 <sup>6</sup>	7 x10 <sup>5</sup>
Log ΠΟΣ/ΚΟΥ ΑΡΧΗΣ	5,72	0,66	2,76	5,86
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΤΕΛΟΥΣ	9 x10 <sup>5</sup>	1,4 x10 <sup>6</sup>	5 x10 <sup>6</sup>	3 x10 <sup>5</sup>
SGOT-ΑΡΧΗΣ	72	58	218	51
SGPT- ΑΡΧΗΣ	101	92	326	65
G-GT- ΑΡΧΗΣ	34	18	64	28
SAP- ΑΡΧΗΣ	112	47	194	101
SGOT- ΤΕΛΟΥΣ	51	46	187	35
SGPT- ΤΕΛΟΥΣ	57	56	224	37
G-GT- ΤΕΛΟΥΣ	26	15	67	21
SAP- ΤΕΛΟΥΣ	124	77	379	118

#### ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 5

	ΒΡΑΧΥΧΡΟΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧΥΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	27/36	9/36	10/36	26/36
ΦΥΛΟ (Α/Γ) %	52 / 48	55 / 45	60 / 40	50 / 50
ΗΛΙΚΙΑ (Μ.Ο±Τ.Α)	47,7 ± 16	61,8 ± 9,7*	42,9 ± 17,7	54,4 ± 14,2**
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ				
1	50	100	29	78
2	17	-	29	5
3	28	-	29	17
4	5	-	13	-
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ				
ΣΤΑΔ/ΣΗ	2,65 ± 0,86	3,14 ± 1,07	2,85 ± 0,69	2,76 ± 1,03
ΒΑΘΜ/ΣΗ	5,11 ± 1,05	4,71 ± 1,25	4,86 ± 1,34	5,06 ± 1,03
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	7,76 ± 1,71	7,86 ± 1,95	7,71 ± 1,89	7,82 ± 1,74
ΒΙΟΧ. ΑΡΧΗΣ				
SGOT	59 ± 47	115 ± 71+	35 ± 14	88 ± 62 <sup>++++</sup>
SGPT	82 ± 76	165 ±	45 ± 16	124 ±
G-GT	33 ± 17	113++	29 ± 15	100 <sup>++++</sup>
SAP	98 ± 37	39 ± 23	107 ± 37	36 ± 19
		156 ± 54+++		114 ± 51



ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	75	25	28	72
------------------	----	----	----	----

\*p=0,019 , \*\*p=0,049 , +p=0,014 , ++p=0,022 , +++p=0,003 , ++++p=0,019, +++++p=0,013

Από τους 36-ασθενείς που εντάχθηκαν στο θεραπευτικό σχήμα μετά το τέλος της θεραπείας παρουσίασαν βιοχημική ανταπόκριση οι 27 ενώ οι υπόλοιποι 9 δεν ομαλοποίησαν τις βιοχημικές παραμέτρους. Μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση όμως παρουσίασαν μόνο 10 ασθενείς και 26 συνολικά υποτροπίασαν. Έτσι ενώ τα ποσοστά στη βραχυχρόνια ανταπόκριση ήταν 75% επιτυχία και 25% αποτυχία , αντιστρέφονται για μακροχρόνια ανταπόκριση σε 28% και 72% αντίστοιχα.

Η ηλικία φαίνεται να συσχετίζεται τόσο με την βραχυχρόνια ,όσο και με την μακροχρόνια ανταπόκριση. Έτσι οι μακροχρόνια ανταποκρινόμενοι είναι οι νεότεροι με μέσο όρο ηλικίας  $42,9 \pm 17,7$  ,έναντι των μη ανταποκρινόμενων που έχουν μέσο όρο ηλικίας  $54,4 \pm 14,2$  (p=0,049 ) .Αντίστοιχα οι βραχυχρόνια ανταποκρινόμενοι έχουν ηλικία  $47,7 \pm 16$ ,έναντι των μη ανταποκρινόμενων με  $61,8 \pm 9,7$  (p=0,019).

Ο γονότυπος 1 αποτελεί τον ανθεκτικό τύπο γονοτύπου που γεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία. Αποτελεί το 100% των μη ανταποκρινόμενων βραχυπρόθεσμα και το 78% αυτών που έχουν υποτροπιάσει μετά από 18 μήνες.

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στα ιστολογικά δεδομένα μεταξύ ανταποκρινόμενων και μη ασθενών είτε για την βραχυχρόνια είτε για την μακροχρόνια ανταπόκριση.

Αντίθετα είναι εμφανής η τάση συσχέτισης των τιμών των SGOT και SGPT πριν την ένταξη σε θεραπεία με την επιτυχή έκβαση της θεραπείας , τόσο στην βραχυχρόνια ,όσο και στην μακροχρόνια ανταπόκριση . Οι ασθενείς που ξεκινούν από χαμηλότερες τιμές SGOT και SGPT, φαίνεται να ανταποκρίνονται καλύτερα στην θεραπεία απ' ότι αυτοί που ξεκινούσαν με υψηλότερες τιμές . Έτσι οι βραχυχρόνια ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές SGOT= $59 \pm 47$  και SGPT= $82 \pm 76$  ενώ οι μη ανταποκρινόμενοι SGOT= $115 \pm 71$  και SGPT= $165 \pm 113$  (p=0,014 και 0,022 αντίστοιχα). Όμοια οι μακροχρόνια ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές SGOT= $35 \pm 14$  και SGPT= $45 \pm 16$  ενώ οι μη ανταποκρινόμενοι SGOT= $88 \pm 62$  και SGPT= $124 \pm 100$  (p=0,013 και 0,019 αντίστοιχα). Στους βραχυχρόνια ανταποκρινόμενους παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση και η SAP,

με τιμές  $98 \pm 37$  , ενώ στους μη ανταποκρινόμενους εμφανίζονται τιμές  $156 \pm 54$  ( $p=0,003$ ). Οι υπόλοιπες τιμές βιοχημικών παραμέτρων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

#### ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 5

Η ιολογική βραχυχρόνια ανταπόκριση κυμάνθηκε στα 20% , ενώ μετά από 18 μήνες η μέτρηση ιικού φορτίου έδειξε μηδέν μόνο στο 8% των ασθενών .

	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	27/36	7/36	10/36	3/36
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	75%	20%	28%	8%

#### Ομάδα 6 :Συνδυασμένη θεραπεία 5 MU IFN-a και 1000-1200 mg Rivabirin για 6 μήνες

Το 1997 επιλέχθηκαν 21 ασθενείς και πήραν συνδυασμένη θεραπεία 5 εκατομμυρίων IFN-a και rivabirin για χρονικό διάστημα 6 μηνών. Το βιοχημικό προφίλ των ασθενών παρουσιάζεται στο πίνακα 10. Από τους 21 ασθενείς οι 12 ήταν άνδρες ,ποσοστό 57% , και οι 9 γυναίκες ,ποσοστό 43% . Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν  $51,28 \pm 12,42$  έτη με τον νεότερο 23 ετών και τον γηραιότερο 69 ετών . Ο γονότυπος 1 κυριαρχεί σε ποσοστό 77% , ακολουθεί ο γονότυπος 3 με ποσοστό 23%. Δεν ανιχνεύσαμε άλλο είδος γονότυπου 2,4, 5 ή 6. Ο μέσος όρος της βαθμοποίησης κατά Ishak ήταν  $5,94 \pm 1,26$ , ενώ ο μέσος όρος της σταδιοποίησης για όλους τους ασθενείς ήταν  $3,6 \pm 1,24$ . Ο μέσος όρος του ιικού φορτίου ήταν  $7 \pm 3 \times 10^5$  copies RNA HCV / ml ορού

Πίνακας 10.

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας 6 ( INF-2a + rivabirin )

	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΟΣ
ΗΛΙΚΙΑ	51,28	12,42	46	53
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	3,6	1,24	4	3
ΒΑΘΜΟΠΟΙΗΣΗ	5,94	1,26	4	6
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	9,56	2,23	7	10
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΑΡΧΗΣ	$7 \times 10^5$	$3 \times 10^5$		
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΤΕΛΟΥΣ	$4 \times 10^5$	$5 \times 10^5$		
SGOT-ΑΡΧΗΣ	76	32	138	70
SGPT- ΑΡΧΗΣ	99	32	125	108
G-GT- ΑΡΧΗΣ	44	32	104	29
SAP- ΑΡΧΗΣ	103	46	233	101
SGOT- ΤΕΛΟΥΣ	31	17	73	25
SGPT- ΤΕΛΟΥΣ	35	23	75	26
G-GT- ΤΕΛΟΥΣ	25	19	91	22
SAP- ΤΕΛΟΥΣ	86	28	109	79

#### ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 6

	ΒΡΑΧΥΧΡΟΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧΥΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	15/21	6/21	7/21	14/21
ΦΥΛΟ (Α/Γ) %	60 / 40	50 / 50	71 / 29	50 / 50
ΗΛΙΚΙΑ (Μ.Ο±Τ.Α)	51,4 ± 11,9	51 ± 14,7	50,4 ± 15,2	51,7 ± 11,4
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΑΔ/ΣΗ	3,46 ± 1,12	4 ± 1,58	3 ± 0,7	3,85 ± 1,34
ΒΑΘΜ/ΣΗ	5,85 ± 1,21	6,2 ± 1,48	6 ± 1,58	5,92 ± 1,19
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	9,31 ± 1,97	10,2 ± 2,93	9 ± 2,12	9,77 ± 2,31
ΒΙΟΧ. ΑΡΧΗΣ				
SGOT	73 ± 24	85 ± 50	66 ± 16	81 ± 38
SGPT	100 ± 33	99 ± 35	84 ± 27	107 ± 33
G-GT	41 ± 29	50 ± 39	34 ± 20	50 ± 36
SAP	95 ± 17	123 ± 83	88 ± 17	111 ± 54
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	71	29	33	67

Από τους 21-ασθενείς που εντάχθηκαν στο θεραπευτικό σχήμα μετά το τέλος της θεραπείας παρουσίασαν βιοχημική ανταπόκριση οι 15 ενώ οι υπόλοιποι 6 δεν ομαλοποίησαν τις βιοχημικές παραμέτρους. Μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση όμως παρουσίασαν μόνο 7 ασθενείς και 14 συνολικά υποτροπίασαν. Έτσι ενώ τα ποσοστά στη βραχυχρόνια ανταπόκριση ήταν 71% επιτυχία και 29% αποτυχία , αντιστρέφονται για μακροχρόνια ανταπόκριση σε 33% και 67% αντίστοιχα.

Το φύλο δεν συσχετίζεται κατ αρχή με την βραχυχρόνια ανταπόκριση . Από τους 7 που ανταποκρίθηκαν μακροπρόθεσμα οι 2 ήταν γυναίκες και ο 5 άνδρες . Η ηλικία δεν συσχετίζεται με την μακροχρόνια ανταπόκριση. Επίσης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση τόσο στα ιστολογικά δεδομένα ,όσο και στις βιοχημικές παραμέτρους μεταξύ ανταποκρινόμενων και μη ασθενών είτε για την βραχυχρόνια είτε για την μακροχρόνια ανταπόκριση .

#### ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΟΜΑΔΑΣ 6

Η ιολογική βραχυχρόνια ανταπόκριση κυμάνθηκε στα 48 % , ενώ μετά από 18 μήνες μηδενικό ιικό φορτίο παρουσίαζε μόνο το 19 % των ασθενών .

	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΒΡΑΧ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ	ΜΑΚΡ/ΝΙΑ ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	15/21	10/21	7/21	4/21
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ %	71%	48%	33%	19%

Μπορούμε να συνοψίσουμε μερικά συγκριτικά αποτελέσματα για ποιοι παράγοντες σχετίζονται με την ανταπόκριση στις περισσότερες ομάδες . Η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε σε 2 από τις 6 ομάδες το νεαρό της ηλικίας να αποτελεί παράγοντα θετικής ανταπόκρισης . Στις 5 από τις 6 ομάδες οι χαμηλές τιμές των τρανσαμινασών ήταν θετικός παράγοντας , ενώ στις 2 από τις 6 ήταν η γ-GT. Όλα όμως αφορούσαν κυρίως την βραχυχρόνια βιοχημική ανταπόκριση η οποία ήταν θετική και για τους 2 και 3 γονότυπους. Αντίθετα η μακροχρόνια βιοχημική και

ιολογική ανταπόκριση δεν μπορεί να συσχετισθεί με καμιά από τις χρησιμοποιούμενες μεταβλητές, όπως έδειξε και η πολυπαραγοντική ανάλυση.

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται τα χαρακτηριστικά όλων των ομάδων που μπήκαν σε θεραπεία και τα αποτελέσματα ανταποκρίσεων που είχαν

	ΟΜΑΔΑ 1	ΟΜΑΔΑ 2	ΟΜΑΔΑ 3	ΟΜΑΔΑ 4	ΟΜΑΔΑ 5	ΟΜΑΔΑ 6
ΑΡ ΑΣ/ΩΝ	30	35	60	35	36	21
ΦΥΛΟ (Α/Γ) %	53/47	60/40	52/48	40/60	53/47	57/43
ΗΛΙΚΙΑ	52 ± 14	49,2 ± 14,7	50,4 ± 15,6	50,4 ± 14,2	51,2 ± 15,9	51,3 ± 12,4
ΓΟΝΟΤΥ 1	50	61	72	50	64	77
2	13	17	11	17	12	-
3	37	22	17	21	20	23
4	-	-	-	12	4	-
ΠΚΟ ΑΡΧΗΣ	2.5x10 <sup>5</sup> ± 3,1x10 <sup>5</sup>	3 x10 <sup>5</sup> ±3 x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup> ±3,5 x10 <sup>5</sup>	7 x10 <sup>5</sup> ±2 x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>5</sup> ±8x 10 <sup>5</sup>	7x10 <sup>5</sup> ±3x 10 <sup>5</sup>
ΠΚΟ ΤΕΛΟΥΣ	3 x10 <sup>5</sup> ±4 x10 <sup>5</sup>	2 x10 <sup>5</sup> ±6 x10 <sup>5</sup>	4,6x10 <sup>4</sup> ±1 ,2 x10 <sup>5</sup>	2 x10 <sup>6</sup> ±6 x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>5</sup> ±1,4 x10 <sup>6</sup>	4 x10 <sup>5</sup> ±5 x10 <sup>5</sup>
ΣΤΑΔ/ΣΗ ΒΑΘΜ/ΣΗ ΣΥΝΟΛΟ	3,02 ± 1,12 5,03 ± 1,21 8,05 ± 2,18	2,88 ± 1,75 4,56 ± 1,31 7,44 ± 2,80	3,27 ± 1,62 5 ± 1,25 8,27 ± 2,49	2,59 ± 1,18 5,05 ± 1,13 7,64 ± 2,06	2,79 ± 0,93 5 ± 1,1 7,79 ± 1,74	3,6 ± 1,24 5,94 ± 1,26 9,56 ± 2,23
ΑΡΧΗΣ SGOT SGPT G-GT SAP	139 ± 108 153 ± 97 88 ± 92 95 ± 44	106 ± 98 126 ± 73 47 ± 31 86 ± 39	77 ± 53 111 ± 88 49 ± 40 85 ± 36	65 ± 48 93 ± 73 52 ± 72 113 ± 44	72 ± 58 101 ± 92 34 ± 18 112 ± 47	76 ± 32 99 ± 32 44 ± 32 103 ± 46
ΤΕΛΟΥΣ SGOT SGPT G-GT SAP	50 ± 36 69 ± 58 50 ± 35 75 ± 45	48 ± 64 39 ± 23 33 ± 17 70 ± 29	44 ± 27 47 ± 34 34 ± 30 84 ± 40	35 ± 20 40 ± 29 46 ± 59 115 ± 82	51 ± 46 57 ± 56 26 ± 15 124 ± 77	31 ± 17 35 ± 23 25 ± 19 86 ± 28

ΒΙΟΧ/ΚΗ ΒΡΑΧΥΧ ΕΠΙΤΥΧΙ	47%	60 %	58%	80%	75 %	71%
ΒΙΟΧ/ΚΗ ΜΑΚΡΟΧ ΕΠΙΤΥΧΙ	14%	14%	21%	20%	28%	33%
ΙΟΛΟΓΙΚ ΒΡΑΧΥΧ ΕΠΙΤΥΧΙ	10%	25%	45%	15%	20%	48%
ΙΟΛΟΓΙΚ ΜΑΚΡΟΧ ΕΠΙΤΥΧΙ	4%	0%	4%	13%	8%	19%

### 3.3.3 Συζήτηση

Τα τελευταία 10 χρόνια έχουν γίνει σοβαρές πρόοδοι στην κατανόηση της ηπατίτιδας C. Τώρα κατανοούμε καλύτερα την φυσική ιστορία της νόσου και την κινητική του ιού. Με αυτές τις πληροφορίες και τα δεδομένα από σοβαρές κλινικές μελέτες έχουμε μια συσσωρευμένη γνώση για την αποδοτικότερη αντιμετώπιση των ασθενών με ηπατίτιδα C.

Παρόλα αυτά υπάρχουν διάφορα σημεία που θα πρέπει να τα έχουμε υπόψιν μας όταν αξιολογούμε τα διάφορα θεραπευτικά σχήματα. Γενικά όταν κανείς προσπαθεί να μελετήσει στην βιβλιογραφία τη σχέση των διαφόρων θεραπευτικών σχημάτων συναντά αρκετές δυσκολίες ομαδοποίησης και συγκριτικής αξιολόγησης των αποτελεσμάτων. Αυτό προκύπτει γιατί χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά είδη INF- $\alpha$  ,διαφορετικές δοσολογίες , αλλά και διαφορετικά χρονικά διαστήματα θεραπείας . Σημαντικό ρόλο παίζει και η αναλογική εκπροσώπηση στα διάφορα δείγματα των ασθενών

- Αναλογία ικών γονοτύπων
- Αναλογία πληθυσμών με μικρά ή μεγάλα ιικά φορτία
- Αναλογία ανδρών-γυναικών
- Αναλογία κίρρωτικών ασθενών

Στις παλαιότερες κλινικές δοκιμές δεν γινόταν συστηματικός έλεγχος της ιαιμίας στην αρχή και στο τέλος της αγωγής με PCR ,ενώ ο έλεγχος της ανταπόκρισης στη θεραπεία γινόταν με μοναδικό κριτήριο την ομαλοποίηση της ALT στον ορό . Ακόμα και σήμερα ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη τεχνική PCR

μπορεί να υπάρχει μεγάλη σχετικά απόκλιση της οριζόμενης ιολογικής ανταπόκρισης . Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα kit που μπορούν να ανιχνεύσουν ακόμη και ελάχιστα μόρια ιού ανά μονάδα όγκου ορού και άλλα που παρουσιάζουν υψηλό cut-off point για την PCR

Ένα άλλο σημείο το οποίο πρέπει να αξιολογήσουμε επίσης είναι ότι η συντριπτική πλειονότητα των εργασιών όταν αναφέρεται σε μακροχρόνια ανταπόκριση εννοεί εκτίμηση μετά από 6 μόνο μήνες . Ελάχιστες εργασίες παρουσιάζουν αποτελέσματα πέρα των 6 μηνών . Επί πλέον ελάχιστες είναι οι εργασίες που αναφέρουν μακροχρόνια ιστολογικά αποτελέσματα , ενώ ουδεμία εργασία έχει μέχρι σήμερα εκτιμήσει την πιθανή επίδραση τόσο στην μελλοντική ανάπτυξη κίρρωσεως , όσο και κυρίως στη θνητότητα.

#### A. ΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ IFN-a

Η ανταπόκριση σε μονοθεραπεία IFN με την παλιά δόση 3MIU TIW δεν είναι αποδοτική στην πλειοψηφία των ασθενών. Στις αρχές της δεκαετίας του 90 μονοθεραπεία με IFN-2b 3MIU TIW για 24 βδομάδες είχε σαν αποτέλεσμα την μακρόχρονη (6μηνη) ανταπόκριση του 6% των ασθενών. Στα μέσα της δεκαετίας του 90 μονοθεραπεία με IFN-2b 3MIU TIW για 48 βδομάδες αύξησε την μακρόχρονη (6μηνη) ανταπόκριση στα 16% των ασθενών.

Πρόσφατα έχουν αναλυθεί τα αποτελέσματα μετα-αναλύσεων από 35 συνολικά κλινικές δοκιμές με 4093 ασθενείς από τους οποίους οι 2247 πήραν 6μηνη θεραπεία με 3 MUI IFN-a για 6 μήνες και οι υπόλοιποι ήταν μη θεραπευόμενοι μάρτυρες ασθενείς με ηπατίτιδα C( 101,107,108,109 ). Τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών παρουσιάζονται στο πίνακα που ακολουθεί

Ανταπόκριση	Βραχυχρόνια	Μακροχρόνια
Βιοχημική	35-50%	27-30%
Ιολογική	27-30%	8-12%

**Πίνακας :** Βιοχημική και ιολογική ανταπόκριση ασθενών με ηπατίτιδα C που έλαβαν θεραπεία με 3 MUI IFN-a για 6 μήνες (4093 ασθενείς , 35 κλινικές δοκιμές 1989-1996)

Η χορήγηση IFN σε μεγαλύτερες δόσεις σαν μονοθεραπεία στη χρόνια HCV λοίμωξη συνδυάζεται με 6μηνη ιολογική, βιοχημική και ιστολογική ύφεση μόνο στο 20-30% των ασθενών (100,101,46) . Παράγοντες που έχουν συσχετισθεί με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας είναι το φύλο, τα επίπεδα του ιού στο αίμα και ο γονότυπος. Ασθενείς με γονότυπο 2,3 έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανταπόκρισης από ότι ασθενείς με γονότυπο 1 (100,101,46) .

Σε δύο εργασίες αναφέρονται μακροχρόνια αποτελέσματα πέραν του 6μηνου. Ασθενείς με φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες και απουσία του ιού στο αίμα για διάστημα > 6 μηνών μετά τη θεραπεία με IFN παρουσιάζουν γενικώς μακροπρόθεσμη ανταπόκριση (μέσος χρόνος παρακολούθησης 7,6 χρόνια) και έχουν μη ανιχνεύσιμο ιό στο ήπαρ και σημαντική ιστολογική βελτίωση (102).

Πρόσφατα οι Olle Reichard et al (103) διερεύνησαν την μακροχρόνια ανταπόκριση ασθενών που ανταποκρίθηκαν αρχικά σε θεραπευτικά σχήματα μονοθεραπείας με IFN. Εξέτασαν 26 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν σε διάφορα θεραπευτικά σχήματα IFN-2b και IFN-a 3MU 3 φορές εβδομαδιαίως για 36 έως 60 εβδομάδες. Σε χρονικό διάστημα 3,5-8,8 έτη μετά το τέλος της θεραπείας το 85% (22/26) είχαν φυσιολογικά επίπεδα ALT 92% (24/26) είχαν αρνητικό HCV-RNA. Η βιοψία στο αντίστοιχο διάστημα έδειξε βελτίωση της ηπατικής νόσου.

Επιπροσθέτως, μελέτες κόστους / αποτελέσματος έδειξαν ότι η θεραπεία με ιντερφερόνη είναι αποτελεσματική σε άτομα ηλικίας < 60 ετών (104) . Τούτο δεν σημαίνει ότι η αποτελεσματικότητα είναι μικρότερη σε άτομα > 60 ετών, αλλά η θνητότητα στην ομάδα αυτή από άλλες αιτίες αυξάνει με την πάροδο του χρόνου με αποτέλεσμα να μην αναδύεται η μακροπρόθεσμη ευεργετική δράση της ιντερφερόνης όσον αφορά την ανάπτυξη κίρρωσης και των επιπλοκών της.

Τα δικά μας αποτελέσματα όσον αφορά μονοθεραπείες με IFN-a επιβεβαιώνουν τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα . Για την 3μηνη θεραπεία με 3 MIU IFN-a οι μισοί σχεδόν ασθενείς (47%) παρουσιάζουν άμεση βιοχημική ύφεση με το τέλος της θεραπείας , για να καταλήξει μόνο ένα 14% να διατηρεί φυσιολογικές βιοχημικές παραμέτρους μετά από 18 μήνες . Τα ιολογικά όμως αποτελέσματα είναι πολύ λιγότερο ενθαρρυντικά . Μόνο ένα 10% παρουσιάζει αρνητικοποίηση του ιικού φορτίου με το τέλος της θεραπείας , ενώ μετά από 18 μήνες το ποσοστό μειώνεται στο 4%.



Η αύξηση της ποσότητας της IFN-a σε 5 MIU και της διάρκειας της θεραπείας σε 6 μήνες είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση κατ αρχήν των βραχυχρόνιων ανταποκρίσεων , βιοχημικών και ιολογικών σε ποσοστά 60% και 25% αντίστοιχα. Όμως μακροπρόθεσμα (μετά από 18 μήνες ) τα ποσοστά ανταπόκρισης είχαν επανέλθει στα αντίστοιχα των μειωμένων δόσεων . Για μακροχρόνια βιοχημική επιτυχία τα ποσοστά έπεσαν στα 14% , ενώ κανείς δεν είχε αρνητικό ιικό φορτίο μετά από 18 μήνες .

Παράγοντες που μπορούν να συσχετιστούν με την επιτυχή μακροχρόνια βιοχημική ανταπόκριση , στην μονοπαραγοντική ανάλυση που έγινε , είναι η χαμηλή τιμή της SGPT και η καλή ιστολογική κατάσταση του ήπατος . Η ομάδα των ανταποκρινόμενων παρουσιάζει μικρή τιμή SGPT και χαμηλό βαθμό βαθμοποίησης κατά Ishak πριν την έναρξη της θεραπείας (  $p=0,007$  και  $p=0,012$  αντίστοιχα ). Μακροχρόνια οι γυναίκες ανταποκρίνονται καλύτερα , ενώ βραχυχρόνια το 80% των ασθενών που δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία είναι 1b γονότυπος. Όμως η πολυπαραγοντική ανάλυση αναδεικνύει μόνο την ύπαρξη των γονοτύπων 2 και 3 ως ευνοϊκών δεικτών πρόγνωσης.

Όλα αυτά τα ευρήματα συμβαδίζουν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά την βραχυχρόνια ανταπόκριση και με δεδομένο ότι πάνω από το 50% των ασθενών μας είναι 1b γονότυπος. Η μακροχρόνια ανταπόκριση είναι μειωμένη (14% βιοχημική και 4% ιολογική ), έναντι των αναφερόμενων στην βιβλιογραφία ( 27-30% για βιοχημική και 8-12% για ιολογική), όμως αναφερόμαστε σε 18 μήνες μετά ,έναντι του κλασσικού 6μήνου .

## B. ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Σύντομα διαφάνηκαν τα όρια της αποτελεσματικότητας της μονοθεραπείας με IFN. Αφενός τα ποσοστά ανταπόκρισης δεν ήταν θεαματικά , αφετέρου το ποσοστό των ασθενών που υποτροπιάζε ήταν σημαντικό . Στο τέλος της δεκαετίας του 90 οι McHutchison και Roynard πρόσθεσαν Ριμπαβιρίνη στο σύνηθες θεραπευτικό σχήμα της IFN-2b 3MIU TIW. Η μακρόχρονη ανταπόκριση αυξήθηκε στο 41% (106).Για ασθενείς που είχαν υποτροπιάσει μετά την μονοθεραπεία με IFN, η μόνιμη ανταπόκριση μπορεί να φθάσει το 50%, μετά την χορήγηση για 24 βδομάδες IFN-2b και Ριβαμπιρίνης

Η συνδυασμένη θεραπεία γενικώς πλεονεκτεί έναντι της μονοθεραπείας γιατί διασφαλίζει

1. Συνεργική δράση
2. Πολλαπλούς στόχους δράσης
3. Μείωση των ανθεκτικών στελεχών.

Ενδεχόμενα μειονεκτήματα αποτελούν η αύξηση της τοξικότητας και το κόστος της θεραπείας. Εκτός της ριβαμπιρίνης πολλές μελέτες έχουν δημοσιευτεί με συνδυασμό IFN και διαφόρων άλλων φαρμάκων όπως αμανταδίνη, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη κ.λ.π με όχι και τόσο ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

### ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ IFN ΚΑΙ ΡΙΒΑΜΠΙΡΙΝΗΣ

Στο τέλος του 1998 δημοσιεύθηκαν 2 μεγάλες πολυκεντρικές διπλές τυφλές μελέτες σε έγκριτα περιοδικά, η μία από την Αμερική και η άλλη από την Ευρώπη στις οποίες αξιολογήθηκε ο συνδυασμός IFN και ριβαμπιρίνης έναντι της μονοθεραπείας με ιντερφερόνη (105,106) . Οι μελέτες αυτές παρουσιάζονται παρακάτω

#### **A. Μελέτη ( Roynard T et al ) (106)**

Η Ευρωπαϊκή μελέτη περιελάμβανε 832 ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη που τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες: IFN 3 MU X 3/wk + ριβαμπιρίνη (1000-1200 mg/d) για 48 εβδομάδες, IFN 3 MU X 3/wk + ριβαμπιρίνη (1000-1200 mg/d) για 24 εβδομάδες και IFN 3 MU X 3/wk + placebo για 48 εβδομάδες (106).

Παραμένουσα ιολογική ανταπόκριση 6 μήνες μετά τη διακοπή της θεραπείας παρατηρήθηκε στο 43% των ασθενών που έλαβαν το συνδυασμό για 48 εβδομάδες, 35% στην ομάδα που έλαβε το συνδυασμό για 24 εβδομάδες και στο 19% των ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία με ιντερφερόνη για 48 εβδομάδες .

Η ιστολογική αξιολόγηση περιελάμβανε την εκτίμηση της φλεγμονής (Knodell) και της ίνωσης (Metavir). Βελτίωση των δεικτών φλεγμονής παρουσίασε το 63% των ασθενών που έλαβε το συνδυασμό για 48 εβδομάδες έναντι του 52% που έλαβε το συνδυασμό για 24 εβδομάδες και του 39% που έλαβε μονοθεραπεία με ιντερφερόνη για 48 εβδομάδες. Βελτίωση των δεικτών ίνωσης παρατηρήθηκε σε ποσοστό 19%, 22%, και 18% αντιστοίχως.

Η συνολική απάντηση, αξιολογώντας το συνδυασμό της μόνιμης ιολογικής ανταπόκρισης και της ιστολογικής βελτίωσης ήταν 41% για τη συνδυασμένη θεραπεία των 48 εβδομάδων, 30% για τη συνδυασμένη θεραπεία των

24 εβδομάδων και μόλις 17% για τη μονοθεραπεία με ιντερφερόνη των 48 εβδομάδων.

Προγνωστικοί παράγοντες συσχετιζόμενοι με την ιολογική ανταπόκριση ήταν ο γονότυπος, τα επίπεδα του HCV RNA στον ορό (<2 million copies/ml), η ηλικία (<40 ετών), το φύλο (γυναίκες) και ο βαθμός ίνωσης. Επί τη βάση των προγνωστικών παραγόντων καθορίστηκε και ο «καλύτερος» ή ο «χειρότερος» υποψήφιος από πλευράς ανταπόκρισης στη θεραπεία. Διακοπή του φαρμάκου έγινε σε 19% των ασθενών που έλαβαν το συνδυασμό για 48 εβδομάδες, 8% των ασθενών που έλαβαν το συνδυασμό για 24 εβδομάδες και 13% των ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία με ιντερφερόνη για 48 εβδομάδες. Η πιο συχνή αιτία διακοπής ήταν η κατάθλιψη. Μείωση της δόσης της ριμπαβιρίνης κρίθηκε αναγκαία σε 10% των ασθενών που έλαβαν το συνδυασμό για 48 εβδομάδες, σε 7% των ασθενών που έλαβαν το συνδυασμό για 24 εβδομάδες και σε 9% των ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία για 48 εβδομάδες.

#### **B. Μελέτη ( McHutchison JG et al) (105)**

Η Αμερικανική μελέτη περιελάμβανε 912 ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη που τυχαιοποιήθηκαν σε 4 ομάδες: IFN 3 MU X 3/wk + ριμπαβιρίνη (1000-1200 mg/d) για 48 εβδομάδες, IFN 3 MU X 3/wk + ριμπαβιρίνη (1000-1200 mg/d) για 24 εβδομάδες και IFN 3 MU X 3/wk + placebo για 48 εβδομάδες και IFN 3 MU X 3/wk + placebo για 24 εβδομάδες.

Παραμένουσα ιολογική ανταπόκριση 6 μήνες μετά τη διακοπή της θεραπείας παρατηρήθηκε στο 38% των ασθενών που έλαβαν το συνδυασμό για 48 εβδομάδες, 31% στην ομάδα που έλαβε το συνδυασμό για 24 εβδομάδες, 13% των ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία με ιντερφερόνη για 48 εβδομάδες και στο 6% των ασθενών που έλαβαν IFN για 24 εβδομάδες (105).

Η ιστολογική αξιολόγηση περιελάμβανε την εκτίμηση της φλεγμονής και της ίνωσης (τροποποιημένο σύστημα Knodell). Βελτίωση των δεικτών φλεγμονής/ίνωσης παρουσίασε το 61% των ασθενών που έλαβε το συνδυασμό για 48 εβδομάδες και το 57% που έλαβε το συνδυασμό για 24 εβδομάδες έναντι του 41% των ασθενών που έλαβε μονοθεραπεία με ιντερφερόνη για 48 εβδομάδες και του 44% των ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία για 24 εβδομάδες. Η θεραπεία δεν επέφερε αλλαγή στο βαθμό της ίνωσης.

Η συνολική απάντηση, αξιολογώντας το συνδυασμό της μόνιμης ιολογικής ανταπόκρισης και της ιστολογικής βελτίωσης ήταν 41% για τη συνδυασμένη θεραπεία των 48 εβδομάδων, 30% για τη συνδυασμένη θεραπεία των 24 εβδομάδων και μόλις 17% για τη μονοθεραπεία με ιντερφερόνη των 48 εβδομάδων.

Προγνωστικοί παράγοντες συσχετιζόμενοι με την ιολογική ανταπόκριση ήταν ο γονότυπος, τα επίπεδα του HCV RNA στον ορό (< 2 million copies/ml), το φύλο (γυναίκες) και ο βαθμός ίνωσης. Ειδικά για τον γονότυπο 1 (χωρίς διαφορά μεταξύ των υποτύπων 1α και 1β) η συνδυασμένη θεραπεία για 48 εβδομάδες υπερτερεί κατά 4 φορές της μονοθεραπείας με IFN (28% έναντι 7%) και η συνδυασμένη θεραπεία των 48 εβδομάδων υπερτερεί της συνδυασμένης θεραπείας των 24 εβδομάδων (28% έναντι 16%). Σε ασθενείς με γονότυπο 2 ή 3 η συνδυασμένη θεραπεία υπερτερεί της μονοθεραπείας αλλά δεν υφίσταται διαφορά ως προς το χρόνο (48 έναντι 24 εβδομάδων). Ασθενείς με σημαντική ίνωση ή ηυξημένα επίπεδα ιού στον ορό έχουν 2-5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα μόνιμης ιολογικής ανταπόκρισης στη συνδυασμένη θεραπεία των 48 εβδομάδων (105).

Η εξαφάνιση του HCV- RNA την 4<sup>η</sup> εβδομάδα της μονοθεραπείας με IFN αποτελεί προγνωστικό δείκτη μόνιμης ιολογικής ανταπόκρισης. Τούτο όμως δεν συμβαίνει στους ασθενείς που έλαβαν συνδυασμένη θεραπεία για 48 εβδομάδες όπου το 57% των μονίμως ανταποκριθέντων ιολογικά είχαν ανιχνεύσιμο ιό στον ορό την 12<sup>η</sup> ή την 24<sup>η</sup> εβδομάδα θεραπείας.

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε άλλες πρόσφατες μελέτες μερικές από τις οποίες παρουσιάζονται παρακάτω

#### **Di Marco : Συνδυασμένη IFN-α + Ριμπαβιρίνη για 6 ή 12 μήνες (110).**

Εξέτασαν 50 ασθενείς που είχαν υποτροπιάσει από διάφορα θεραπευτικά σχήματα με IFN-α (μονοθεραπείες) και πήραν 6MU TIW α<sub>2b</sub> IFN και ριμπαβιρίνη (1000-1200 mg καθημερινά) για 6 ή 12 μήνες. 6 μήνες μετά οι ασθενείς που πήραν για 12 μήνες τη θεραπεία παρουσίασαν βιοχημική και ιολογική ανταπόκριση 72% σε αντίθεση με τους αυτούς που πήραν τη θεραπεία για 6 μήνες και παρουσίασαν ανταπόκριση 36%. Παράγοντες που συσχετίστηκαν με την καλύτερη ανταπόκριση ήταν : 12 μήνες θεραπεία, νεαρή ηλικία, και χαμηλό ιικό φορτίο πριν τη θεραπεία (72% έναντι 36%  $p=0,01$ ).

**Barbaro** : Σύγκριση 48 εβδομάδες IFN μονοθεραπεία με 24 εβδομάδες IFN+ριμπαβιρίνη (111).

Η συνδυασμένη θεραπεία IFN+ριμπαβιρίνη υπερτερεί της μονοθεραπείας IFN (43% έναντι 17%  $p<0,001$ ).

**Bellobuono** : Μη ανταποκριθέντες σε μονοθεραπεία έλαβαν διπλάσια IFN ή συνδυασμό

IFN+ ριμπαβιρίνη (112).

48 ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν ιολογικά έως την 4<sup>η</sup> εβδομάδα σε θεραπευτικά σχήματα IFN πήραν διπλάσια δόση IFN ή συνδυασμένη θεραπεία IFN+ριμπαβιρίνη. Η συνδυασμένη θεραπεία είχε καλύτερα αποτελέσματα 42% (10/24) έναντι 4% (1/24)  $p=0,006$ . Στη συζήτηση οι συγγραφείς προτείνουν μονοθεραπεία 48 εβδομάδων με IFN για τους γονοτύπους 2 και 3 και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν ιολογικά έως την 4<sup>η</sup> εβδομάδα ένταξη σε πρόγραμμα ριβαμπιρίνης.

**Andreone** : Μη ανταποκριθέντες σε μονοθεραπεία με μονοθεραπεία 6 μηνών IFN ή συνδυασμό IFN+ ριμπαβιρίνη (113)

50 ασθενείς μη ανταποκριθέντες σε μονοθεραπείες πήραν συνδυασμό IFN+ριμπαβιρίνης ή μονοθεραπεία 6 μηνών. Στο τέλος της θεραπείας ALT φυσιολογικές είχαν 9/26 για την συνδυασμένη και 2/24 για IFN 35% έναντι 8%  $p=0,03$ . Όμως οι φυσιολογικές τρανσαμινάσες δεν μπορούν να συσχετιστούν με την εξάλειψη του RNA του HCV. Στο τέλος της θεραπείας μόνο οι ασθενείς που είχαν πάρει συνδυασμό IFN+ριμπαβιρίνης είχαν μειώσει το ιικό φορτίο που όμως επανήλθαν στα πριν θεραπείας επίπεδα 6 μήνες μετά τη λήξη της θεραπείας.

**Castro** : Παράγοντες συσχετιζόμενοι με την ανταπόκριση στην θεραπεία σε IFN ή συνδυασμό IFN+ ριβαμπιρίνη (114)

184 ασθενείς : 62 12μηνιαία IFN μονοθεραπεία

122 συνδυασμένη IFN+ριβαμπιρίνη 12μηνιαία.

Ανεξάρτητοι παράγοντες συσχετιζόμενοι με την ανταπόκριση στην θεραπεία ήταν:

- ➔ Γονότυπος HCV ( $p=0,06$ )
- A) IFN ομάδα ➔ Ιικό φορτίο  $\leq 5,1$  logs/ml ( $p=0,005$ )

- Αρνητικό HCV RNA στο 1 μήνα θεραπείας ( $p=0,0001$ )
- Γυναίκες ( $p=0,04$ )
- Γονότυπος ( $p=0,03$ )
- B) Συνδυασμένη Ομάδα → Ιικό φορτίο  $\leq 5,5$  logs/ml ( $p=0,01$ )
- Φυσιολογικές ALT ( $p=0,001$ )
- Ελάττωση ιικού φορτίου  $\geq 1,2$  logs/ml μετά 2 μήνες ( $p<0,001$ )
- Αρνητικό HCV RNA 5 μήνες ( $p<0,0001$ )

Οι ισχυρότεροι παράγοντες πρόγνωσης αρνητικοποίηση HCV RNA 1 μήνα μετά την έναρξη θεραπείας για IFN ή 5 μήνες για συνδυασμό.

Τα δικά μας συμπεράσματα είναι πιο απογοητευτικά από αυτά που εμφανίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία σε σχέση με τα ποσοστά ανταπόκρισης . Έτσι ενώ η 6-μηνη ιολογική ανταπόκριση εμφανίζεται στη βιβλιογραφία να έχει ποσοστά επιτυχίας 30-35% , εμείς μετρήσαμε μηδενικό ιικό φορτίο στους 18 μήνες μόνο στο 19% των ασθενών μας. Επίσης δεν μπορέσαμε να προσδιορίσουμε ανεξάρτητους παράγοντες που να συσχετίζονται με τη θετική ανταπόκριση στη θεραπεία. Και πάλι τονίζεται ότι τα δικά μας αποτελέσματα αφορούν σε παρακολούθηση άνω των 18 μηνών , έναντι 6 μηνών των περισσότερων από τις παραπάνω μελέτες.

Επιπλέον ένας παράγοντας που μπορεί να δικαιολογήσει αυτά τα αποτελέσματα είναι το μεγάλο ποσοστό παρουσίας του γονότυπου 1 , σε ποσοστό 77% στην δική μας μελέτη , που αλλοιώνει τα αποτελέσματα και διαφοροποιεί την ομάδα της ριβαμπρίνης από της υπόλοιπες ομάδες .

#### ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ IFN ΚΑΙ UDCA

Είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι το UDCA (ουρσοδεσοξυλικό οξύ) βελτιώνει την ηπατική βιοχημεία στη χρόνια ηπατίτιδα C

χωρίς να επιδρά στα επίπεδα του HCV RNA (74). Ο συνδυασμός όμως IFN και UDCA επισπεύδει την βιοχημική απάντηση και καθυστερεί τη βιοχημική υποτροπή (75).

Αυτό επιβεβαιώνεται και στους δικούς μας ασθενείς όπου σε σύνολο 50 ασθενών το 58% παρουσίασε άμεση βιοχημική ανταπόκριση και ένα ποσοστό 21% συνεχίζει να διατηρεί σε φυσιολογικά επίπεδα τις τρανσαμινάσες τους μετά 18 μήνες από την λήξη της θεραπείας.

Το νεαρό της ηλικίας, οι γονότυποι 2, 3 και οι χαμηλές τιμές τρανσαμινασών πριν την έναρξη της θεραπείας, είναι παράγοντες που ευνοούν την βιοχημική ανταπόκριση στο συνδυασμό IFN και UDCA, όπως προέκυψε από την μονοπαραγοντική ανάλυση στην ερευνά μας. Η πολυπαραγοντική όμως ανάλυση έδειξε ότι μόνο οι γονότυποι 2 και 3 ευνοούν την θετική ανταπόκριση στη θεραπεία. Ο συνδυασμός IFN και UDCA φάνηκε να μηδενίζει το ιικό φορτίο στο 45% των ασθενών με το τέλος της θεραπείας, αλλά μετά από 6 μήνες μόνο το 4% παρουσίασε ιολογική ανταπόκριση.

#### ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ IFN ΚΑΙ MECULID

Η νιμεσουλίδη (meculid) είναι εκλεκτικός αναστολέας της COX 2 και χρησιμοποιείται ευρύτατα ως μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες στις ρευματοπάθειες. Προηγούμενες μελέτες χρησιμοποίησαν μή στεροειδή αντιφλεγμονώδη σε συνδυασμό με IFN.

Τα αποτελέσματα από την 6-μηνιαία θεραπεία 36 ασθενών με συνδυασμό IFN και MECULID, ήταν αρκετά ενθαρρυντικά. Άμεσα το 75% των ασθενών ομαλοποίησε τις τρανσαμινάσες τους, ποσοστό συγκρίσιμο με το αντίστοιχο της συνδυασμένης ριβαμπρίνης, και το 28% στον έλεγχο που τους έγινε μετά από 18 μήνες διατηρούσε φυσιολογικές τιμές των βιοχημικών τους παραμέτρων. Επίσης ένα 20% παρουσίασε άμεση ιολογική ανταπόκριση με το τέλος της θεραπείας, ενώ μετά από 18 μήνες το 8% εξακολούθησε να έχει μη ανιχνεύσιμο HCV-RNA στον ορό.

Παράγοντες που φάνηκαν από την μονοπαραγοντική ανάλυση στη μελέτη μας να συσχετίζονται με την καλή ανταπόκριση στην συγκεκριμένη θεραπεία είναι το νεαρό της ηλικίας, ο μη-1 γονότυπος, και οι χαμηλές πριν την έναρξη στη θεραπεία τρανσαμινάσες κυρίως SGOT, SGPT, ενώ ο 1 γονότυπος ήταν ο μόνος δυσμενής προγνωστικός παράγοντας που ανέδειξε η πολυπαραγοντική ανάλυση.

## ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ IFN ΚΑΙ D-Penicilemin

Η D-Πενικιλλαμίνη είναι ένα φάρμακο με δράση στην ανάπτυξη της ίνωσης και κατασταλτική επίδραση στα μακροφάγα . Ως εκ τούτου την χρησιμοποιούμε ως πιθανό συνδυασμό με την IFN για καλύτερα αποτελέσματα εν σχέση προς την μονοθεραπεία .

Τα αποτελέσματα από την 6-μηνιαία θεραπεία 35 ασθενών με συνδυασμό IFN και D-Penicilamin, ήταν αρκετά ενθαρρυντικά και αξιοπρόσεκτα . Άμεσα το 80% των ασθενών ομαλοποίησε τις τρανσαμινάσες τους, ποσοστό μεγαλύτερο με το αντίστοιχο της συνδυασμένης ριβαμπιρίνης, και το 20% στον έλεγχο που τους έγινε μετά από 18 μήνες διατηρούσε φυσιολογικές τιμές των βιοχημικών τους παραμέτρων. Άρα ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό υποτροπιάζει μετά από 18 μήνες. Επίσης ένα 15% παρουσίασε άμεση ιολογική ανταπόκριση με το τέλος της θεραπείας ,ενώ μετά από 18 μήνες το 13% εξακολούθησε να έχει μη ανιχνεύσιμο HCV-RNA στον ορό .Το ενδιαφέρον που προκύπτει δηλαδή είναι ότι η D-Penicilemin φαίνεται να εξασφαλίζει μικρή μεν καταρχήν ιολογική ανταπόκριση , η οποία όμως διαρκεί και μετά από 18 μήνες. Τα αποτελέσματα ήταν αμέσως συγκρίσιμα με τον συνδυασμό IFN και ριβαμπιρίνης . Το κόστος της θεραπείας ήταν μόνο ένα κλάσμα σε σχέση προς το συνδυασμό IFN και ριβαμπιρίνης. Όμως το μειονέκτημα του συνδυασμού είναι η συχνή εμφάνιση παρενεργειών , κυρίως δερματικών εκδηλώσεων με την D-Πενικιλλαμίνη .

Παράγοντες που φάνηκαν από την μονοπαραγοντική ανάλυση στη μελέτη μας να συσχετίζονται με την καλή ανταπόκριση στην συγκεκριμένη θεραπεία είναι μόνο ,ο μη-1 γονότυπος , και οι χαμηλές πριν την ένταξη στη θεραπεία τρανσαμινάσες κυρίως γ-GT και SAP. Όμως και εδώ η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι μόνο οι γονότυποι 2 και 3 συνδυάζονται με καλύτερη πρόγνωση.



## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

Οι μηχανισμοί αντίστασης του ιού της ηπατίτιδας C στην IFN-a καθώς και στους διάφορους συνδυασμούς της με διάφορα φάρμακα ,είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι. Το γεγονός οφείλεται στην πολύμορφη δράση αυτών των φαρμάκων , τα οποία εξασκούν πολλαπλές πιέσεις επιλογής σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος του ιού χωρίς όμως να γνωρίζουμε ούτε τους μηχανισμούς δράσης των ακριβώς ,ούτε το ρόλο που διαδραματίζει ο ξενιστής .

Ωστόσο δεν μπορούμε να παραβλέψουμε το γεγονός ότι μετά την επιβεβαίωση της διάγνωσης της χρόνιας ηπατίτιδας C ,και την ακριβή εκτίμηση της ηπατικής βλάβης, τίθεται θέμα θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών. Γνώμη μας είναι ότι πρέπει να εκτιμώνται σοβαρά οι παράγοντες που συντελούν στην καλή ανταπόκριση στην θεραπεία , μη-1 γονότυπος -αν και είναι η μειοψηφία τουλάχιστον των Κρητών ασθενών-, η απουσία κίρρωσης , η μικρού βαθμού ίνωση του ήπατος και βέβαια συνυπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις και αντενδείξεις χορήγησης IFN-a.

Παρόλα αυτά όμως έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς με γονότυπο 1b αλλά χαμηλό ιικό φορτίο εμφανίζουν καλή απάντηση στη θεραπεία. Είναι πιθανόν λοιπόν μεγαλύτερη αξία για την επιλογή των ασθενών που θα ωφεληθούν από την θεραπεία να παίζει η αξιολόγηση πολλών μαζί προγνωστικών δεικτών όπως η ηλικία +απουσία κίρρωσης +χαμηλά επίπεδα ιαιμίας + γονότυπος μη-1.

Ένα άλλο σημείο στο οποίο πρέπει να σταθούμε κριτικά είναι η παρακολούθηση της θεραπείας .Έχει διαπιστωθεί (115) και το είδαμε και εμείς στις μελέτες μας ότι η γρήγορη αρνητικοποίηση του HCV-RNA στη 4<sup>η</sup> βδομάδα θεραπείας είναι ο καλύτερος προγνωστικός δείκτης μακρόχρονης ανταπόκρισης Αναφέρεται ότι μη ανιχνεύσιμο HCV-RNA στη 4<sup>η</sup> βδομάδα θεραπείας είχαν 73%, 26%, και 0% των ασθενών με μακρόχρονη , παροδική και καμία απάντηση αντίστοιχα ( 116).

Έτσι ο έλεγχος του HCV-RNA κατά τα αρχικά στάδια της θεραπείας μπορεί να αποτελέσει σημαντικό δείκτη συνέχισης ή διακοπής της θεραπείας ,ή αναζήτησεως νέων θεραπευτικών σχημάτων. Δίνει δηλαδή τη δυνατότητα επέμβασης στη θεραπεία .

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζουν οι ασθενείς που σύμφωνα με τις ιολογικές μετρήσεις τους στο τέλος της θεραπείας εμφανίζονται ιολογικά ανταποκρινόμενοι ,( μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο ), αλλά αργότερα υποτροπιάζουν. Συνήθως αυτό συμβαίνει 4 με 6 εβδομάδες μετά τη διακοπή της θεραπείας . Το βιολογικό υπόβαθρο αυτής της ιολογικής ανταπόκρισης δεν είναι διευκρινισμένο .Έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες για να δικαιολογήσουν αυτό το φαινόμενο (123)

1. Μπορεί να προκαλείται από ιούς που ναι μεν αναστέλλεται η αντιγραφή τους , αλλά εξακολουθούν να υφίστανται σε λανθάνουσα μορφή κατά την διάρκεια της θεραπείας και επανεργοποιούνται μόλις τελειώσει αυτή.
2. Η θεραπεία να μη σταματά πλήρως την αντιγραφή του ιού που επιλεκτικά σε κάποια κύτταρα (κυρίως ηπατικά ) να συνεχίζεται , έστω και με αργούς ρυθμούς
3. Συνδυασμοί των παραπάνω μοντέλων .

Δεν είναι ακόμη γνωστό εάν ο ιός HCV μπορεί να παραμείνει σαν λανθάνων ιός και ποια κύτταρα μπορεί να είναι είναι οι πιθανοί τόποι που ο HCV μπορεί να λανθάνει. Πιθανοί τέτοιοι τόποι περιλαμβάνουν τα λεμφοκύτταρα (123), αλλά τα δεδομένα που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η ιολογική επανάκαμψη προκαλείται από τους ιούς HCV που είχαν κρυφτεί στα λεμφοκύτταρα είναι αντιφατικά .

Από όλα αυτά όμως προκύπτει η ανάγκη αξιόπιστων και πολύ ευαίσθητων ποιοτικών και ποσοτικών μεθόδων ανίχνευσης του ιού που σήμερα κατά την γνώμη μας εξακολουθεί να είναι ζητούμενο.

Αν θέλαμε να συνοψίσουμε τα βιοχημικά αποτελέσματα ανταπόκρισης με IFN-a μπορούμε να ισχυριστούμε με σιγουριά ότι δεν ξεπερνούν το 20% και όχι για διάστημα πέραν του 1 έτους μετά τη λήξη της θεραπείας . Οι συνδυασμοί IFN-a και ριβαμπρινής αύξησαν τα ποσοστά μακροχρόνιας βιοχημικής ανταπόκρισης αλλά και πάλι δεν ξεπερνούν το 35% σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα . Τα ιολογικά αποτελέσματα είναι γενικώς απογοητευτικά κυμαινόμενα από 0-18% με καλύτερες ομάδες εκείνες της ριβαμπρινής (18%) και της D-Πενικιλλαμίνης (14%). Τι γίνεται με τους υπόλοιπους ασθενείς που αποτελούν την μέγιστη πλειοψηφία του συνόλου των ασθενών που εντάσσονται στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα και δεν ανταποκρίνονται ή υποτροπιάζουν σε σύντομο χρονικό διάστημα;

Η μία λύση είναι τα νέα είδη ιντερφερονών που δοκιμάζονται , πεγκυλιωμένες ιντερφερόνες, consensus ιντερφερόνη, θεραπείες επαγωγής ή εφόδου (induction) με IFN-α. Παρόλα αυτά το μόνο που έχουμε επιτύχει είναι να βελτιωθούν ίσως ελαφρώς τα ποσοστά ανταπόκρισης , χωρίς όμως να λυθεί ριζικά το πρόβλημα .

Η άλλη λύση προκύπτει από τις εξελίξεις στην μοριακή βιολογία .Η καλύτερη γνώση του ιού και η ανάπτυξη της μοριακής βιοτεχνολογίας , οδήγησε στην παρέμβαση σε επίπεδο RNA , εμποδίζοντας την έκφραση των πρωτεϊνών του ιού και αναστέλλοντας τον ιικό πολλαπλασιασμό. Οι προτεινόμενες νέες θεραπευτικές επεμβάσεις περιλαμβάνουν τη χορήγηση αναστολέων διαφόρων ενζύμων του ιού , όπως της πρωτεάσης , της ελικάσης και της πολυμεράσης με στόχο να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού. Αναστολείς της πρωτεάσης έχουν αρχίσει να δοκιμάζονται σε προκλινικές δοκιμές και ίσως φανούν ιδιαίτερα αποτελεσματικές. Το πρόσφατο παράδειγμα του HIV οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι αναστολείς της πρωτεάσης του ιού δεν αποτελούν την ιδανική λύση σαν μονοθεραπεία , αλλά βελτιώνουν την ανταπόκριση όταν χορηγούνται σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα .

Πιο πολύπλοκες θεραπευτικές λύσεις περιλαμβάνουν τη χορήγηση ολιγονουκλεοτιδίων (antisense oligonucleotides) και ριβοενζύμων (ribozymes) .Η χορήγηση ολιγονουκλεοτιδίων έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό υβριδίων RNA-DNA(antisense DNA) ή RNA-RNA (antisense RNA) , με συνεπακόλουθο την αναχαίτιση ενός ειδικού RNA και την διακοπή του πολλαπλασιασμού ή της μεταγραφής του ιού.

Γενικά οι εξελίξεις στην κατεύθυνση των εφαρμογών της μοριακής βιολογίας είναι σημαντική και οι λύσεις μάλλον θα διαφανούν από αυτή την κατεύθυνση. Η έρευνα στο τομέα των ιογενών ηπατίτιδων υπόσχεται πολλά.

### 3.4 Η NS5Α ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΑΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ 1b ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ IFN-a

#### 3.4.1 Υλικά – ασθενείς - μέθοδοι

**Ασθενείς** Μεταξύ των ετών 1994 και 1997 επιλέχθηκαν 28 ασθενείς (10 άνδρες και 18 γυναίκες) οι οποίοι είχαν προσβληθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C και τον γονότυπο 1b . Οι ασθενείς αυτοί ολοκλήρωσαν ένα θεραπευτικό σχήμα που περιελάμβανε θεραπεία με ανασυνδιασμένη IFN-a 5 MU , τρεις φορές την εβδομάδα για τουλάχιστο 6 μήνες. Η διάγνωση βασίστηκε στην κλινική εικόνα στο επίπεδο των τρανσαμινασών , στην ιστολογική εξέταση (έγινε βιοψία ήπατος ) και στην ανίχνευση του RNA του HCV και στην ποσοτική εκτίμηση του ιικού φορτίου. Αποκλείστηκαν από την ένταξη στο θεραπευτικό σχήμα ασθενείς που ήταν θετικοί και στο HBV ή HIV ή έφεραν και άλλους ανιχνεύσιμους γονότυπους εκτός από 1b , είχαν ιστορικό αλκοολισμού ,ή χρειαζόταν αιμοκάθαρση ,ή βρισκόταν σε προχωρημένο στάδιο κίρρωσης. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των 28 ασθενών που ολοκλήρωσαν το θεραπευτικό σχήμα φαίνονται στο πίνακα 11

**Ορισμός της ανταπόκρισης στη θεραπεία** Σαν βιοχημικά ανταποκρινόμενους ασθενείς θεωρήσαμε τους ασθενείς εκείνους που 6 τουλάχιστον μήνες μετά την λήξη του θεραπευτικού σχήματος διατηρούν τα επίπεδα των τρανσαμινασών τους σε φυσιολογικά επίπεδα .

Σαν ιολογικά ανταποκρινόμενους ασθενείς θεωρήσαμε τους ασθενείς εκείνους που 6 τουλάχιστον μήνες μετά την λήξη του θεραπευτικού τα επίπεδα του ιικού φορτίου του HCV ήταν μη ανιχνεύσιμα με RT-nested PCR

Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν

1. Μέτρηση τρανσαμινασών SGOT , SGPT , γGT , SAP πριν την θεραπεία και μετά το τέλος της θεραπείας
2. Καθορισμός του γονοτύπου 1b χρησιμοποιώντας το INNO-Lipa HCV II της εταιρείας Innogenetics test ,όπως περιγράφεται στο κεφαλαίο υλικά και μέθοδοι

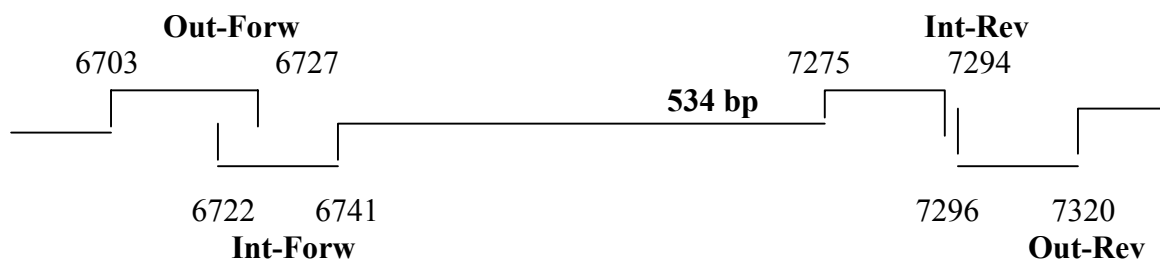
3. Μέτρηση του ιικού φορτίου πριν και μετά την θεραπεία χρησιμοποιώντας το Amplicor HCV Monitor <sup>TM</sup> assay της εταιρείας Roche Diagnostic System όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.
4. Δημιουργία του PCR προϊόντος στην NS5A περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6703-7320 όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων  
Για εξωτερικούς primers χρησιμοποιήθηκαν  
Out-for : 5' TGGATGGAGTGCGGTTGCACAGGTA 3' (νουκλεοτίδια 6703 - 6727)

Out-rev : 5' TCTTTCTCCGTGGAGGTGGTATTGG 3' (νουκλεοτίδια 7296 - 7320)

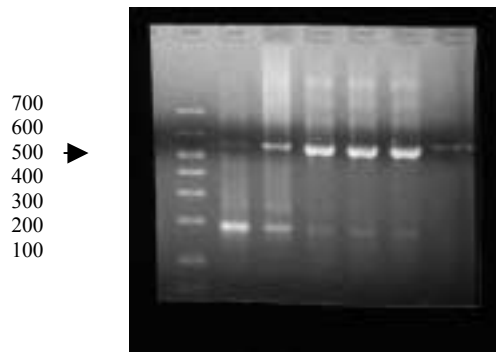
Συνήθως το προκύπτον PCR προϊόν δεν είναι ορατό σε πήκτωμα αγαρόζης, γι' αυτό προχωράμε σε nest PCR χρησιμοποιώντας σαν εσωτερικούς primers τους

Int-for : 5' CAGGTACGCTCCGGCGTGCA 3' (νουκλεοτίδια 6722 - 6741)

Int-rev : 5' GGGGCCTTGGTAGGTGGCAA 3' (νουκλεοτίδια 7275 - 7294)



Τα PCR προϊόντα που προκύπτουν ταυτοποιούνται με βάση το μέγεθος τους ( 534 βάσεις) σε 1% πήκτωμα αγαρόζης που βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο (Φωτογραφία 2).



**Φωτογ.1** PCR προϊόντα στην NS5A περιοχή  
Marker 100 bp προϊόν 534 βάσεων

5) Δημιουργία του PCR προϊόντος για απ'ευθείας ανάγνωση της αλληλουχίας ( direct sequencing ). Ένα μικρόλιτρο (1  $\mu$ l) από την πρώτη PCR μεταφέρεται για δεύτερη nest PCR . Ένας M13 forward primer ( 5' TGAAAACGACGGCCAGT 3' ) και ένας M13 reverse primer (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3') προστίθενται στο 5' ακρο των 5' και 3' nested primers αντίστοιχα , για να προχωρήσουμε στην απευθείας ανάγνωση των αλληλουχιών που προκύπτουν με αυτόματο DNA sequencer. Έτσι οι εσωτερικοί primers διαμορφώνονται.

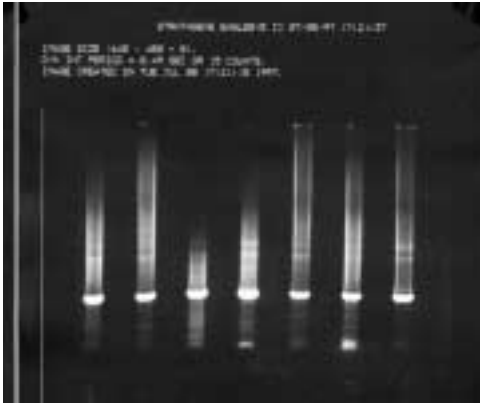
5' TGAAAACGACGGCCAGTCAGGTACGCTCCGGCGTGCA 3'

με την αλληλουχία M13 forward του υπογραμμισμένη

5' CAGGAAACAGCTATGACCGGGGCCTTGGTAGGTGGCAA 3'

με την αλληλουχία M13 reverse του υπογραμμισμένη .

- 6) Καθαρισμός των PCR προϊόντων με το QIAquick gel extraction kit της εταιρείας QIAGEN όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων.



**Φωτ 3.** Πήκτωμα 1% αγαρόζης με PCR προϊόντα της NS-5A περιοχής πριν τον καθαρισμό με QIAquick κολώνες



**Φωτ 4.** Πήκτωμα 1% αγαρόζης με τα παραπάνω PCR προϊόντα της NS-5A περιοχής μετά τον καθαρισμό με QIAquick κολώνες

- 7) Προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων με απ'ευθείας ανάγνωση όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων. Διαβάστηκαν και οι δύο αλυσίδες κάθε PCR προϊόντος με ένα αυτόματο DNA sequencer μοντέλο ALF Express Pharmacia Biotech στο Εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ. Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνεται η ανάγνωση της αλληλουχίας του δείγματος E760 με τον M13 Forward primer σημασμένο με Cy-5 όπως εμφανίζεται στο αυτόματο DNA sequencer
- 8) Η ανάλυση των πολλαπλών αναγνώσεων που προκύπτουν, η τελική αλληλουχία και η σύγκριση με την γνωστή αλληλουχία της NS5A περιοχής του HCV-J έγιναν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Gene Skipper που έχει δημιουργήσει το EMBL. Στην σελίδα που ακολουθεί φαίνεται πώς προκύπτει η νουκλεοτιδική αλληλουχία του δείγματος E760 από την ανάγνωση και των δύο αλυσίδων (forward-reverse) , και η σύγκριση του με το HCV-J για τον εντοπισμό των τυχών μεταλλαγών. Οι

προκύπτουσες μεταλλαγές στη περιοχή NS5A ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες σύμφωνα με την ταξινόμηση του Enomoto (63) :

Αρχέγονος τύπος ( Wild type):Καμία αμινοξική αλλαγή .

Ενδιάμεσος τύπος (Intermediate type):1 έως 3 αμινοξικές αλλαγές .

Μεταλλαγμένος τύπος (Mutant type): 4 έως 11 αμινοξικές αλλαγές.

#### 3.4.2 Αποτελέσματα



**ΠΙΝΑΚΑΣ 11.** Χαρακτηριστικά των 28 ασθενών προσβεβλημένων με HCV-1b σύμφωνα με την ανταπόκριση τους στην IFN-a

Χαρακτηριστικό	<u>Όλοι</u> N=28	<u>Βιοχημικά</u> <u>Ανταποκριθέντες</u> N=7	<u>Μη- ανταπ/τες</u> <u>Βιοχημικά</u> N=21
Ηλικία (χρόνια)	60,04 ± 2	59,57 ± 1,62	60,25 ± 2,82
Φύλο (Α/Γ)	10 / 18	1 / 6	9 / 12
Ιικό φορτίο HCV-RNA	7,53X10 <sup>5</sup> ± 1,4X10 <sup>5</sup>	1,18X10 <sup>6</sup> ± 4X10 <sup>5</sup>	6,22X10 <sup>5</sup> ± 1,3X10 <sup>5</sup>
Βιοχημικά δεδομένα			
SGOT	80,91 ± 13,4	54,71 ± 10,33	92,38 ± 18,20 *
SGPT	120,91 ± 24,9	73,86 ± 15,73	141,50 ± 34,23 *
γGT	53,48 ± 10,01	40,29 ± 11,12	59,25 ± 13,51
SAP	104,91 ± 5,4	117,86 ± 6,95	99,25 ± 6,78
Ιστολογικά δεδομένα			
Σταδιοποίηση	2,88 ± 0,27	2,33 ± 0,42	3,05 ± 0,33
Βαθμοποίηση	4,80 ± 0,24	4,83 ± 0,60	4,79 ± 0,27
Συνολικό	7,68 ± 0,46	7,16 ± 1,01	7,84 ± 0,53
Αριθμός αμινοξικών αλλαγών στην ISDR	1,5 ± 0,22	2,57 ± 1,4	1,14 ± 0,19 **
Αριθμός νουκ/ών αλλαγών στην ISDR	9,21 ± 0,39	10,14 ± 0,86	8,9 ± 0,42

\*p=0,01

\*\*p=0,003

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 11, μελετήθηκαν 28 συνολικά ασθενείς 10 άνδρες και 18 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 60, 04±2 χρονών. Πριν εισαχθούν στην οποιαδήποτε θεραπεία εμφάνιζαν ιικό φορτίο 7.53x10<sup>5</sup> ±1.4x10<sup>5</sup> copies HCV /ml ορού και τρανσαμινάσες SGOT =80,91, SGPT=120,91, γGT =53,48, SAP=104,91 , ενώ η ιστολογική κατάσταση του ήπατος όπως την περιέγραψαν οι βιοψίες παρουσίασε σταδιοποίηση 2,88 ± 0,27 και βαθμοποίηση 4,8 ± 0,24

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας ασθενών , φύλου , ιικού φορτίου και βαθμοποίησης της βιοψίας πριν την θεραπεία με την τελική ανταπόκριση στην θεραπεία . Είναι εμφανής η τάση συσχέτισης των SGOT,SGPT και γGT με την έκβαση της θεραπείας . Οι ασθενείς που ξεκινούν από χαμηλότερες τιμές τρανσαμινασών φαίνεται να ανταποκρίνονται καλύτερα στην θεραπεία απ' ότι αυτοί που ξεκινούσαν με υψηλότερες τιμές . Έτσι οι ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές

SGOT=54,71±10,33 , SGPT=73,86±15,73 , και γGT= 40,29±11,12 ενώ οι μη ανταποκρινόμενοι εμφανίζουν τιμές SGOT=92,38±18,20 ,SGPT=141,50±34,23 , και γGT=59,25±13,51 .Αυτές οι διαπιστώσεις δεν φαίνεται να ισχύουν για την SAP που για τους ανταποκρινόμενους εμφανίζει τιμή 117,86±6,95 ενώ για τους μη ανταποκρινόμενους είναι 99,25±6,78 .Οι τιμές για την SGOT και SGPT είναι στατιστικά σημαντικές p=0,01.

Υπάρχει σαφής στατιστική συσχέτιση p=0,003 για την σχέση μεταξύ αριθμού αμινοξικών αλλαγών στην NS5A περιοχή και στην ανταπόκριση στην INF .Έτσι ενώ για τους 28 ασθενείς εμφανίζονται 1,5±0,22 αμινοξικές μεταλλαγές , στους 7 ασθενείς που τελικά ανταποκρίνονται εμφανίζονται 2,57±1,4 ενώ σε αυτούς που δεν ανταποκρίνονται εμφανίζονται 1,14±0,19

**ΠΙΝΑΚΑΣ 12 . Χαρακτηριστικά των 28 ασθενών προσβεβλημένων με HCV-1b σύμφωνα με τον παρατηρούμενο τύπο στην NS5A περιοχή**

Χαρακτηριστικά	Αρχέγονος τύπος N=5	Ενδιάμεσος N=21	Μεταλλαγμένος N=2
Ηλικία (χρόνια)	64,6 ± 3,6	58,75 ± 2,6	59 ± 2
Φύλο (Α/Γ)	2/3	8/13	0/2
Ιικό φορτίο HCV-RNA	4,6X10 <sup>5</sup> ± 1,8X10 <sup>5</sup>	8X10 <sup>5</sup> ± 1,9X10 <sup>5</sup>	1,07X10 <sup>6</sup> ±3X10 <sup>4</sup>
<b>Βιοχημικά δεδομένα</b>			
SGOT	124,4 ± 43,4	70,06 ±12,87	59,00 ±124,4
SGPT	180 ± 71,8	108,56 ± 27,55	72,00 ± 180
γGT	74,4 ± 26,3	47,12 ± 11,51	52,00 ± 74,4
SAP	97,8 ± 13,0	106,69 ± 6,78	108,5 ± 97,8
<b>Ιστολογικά δεδομένα</b>			
Σταδιοποίηση	3,00 ± 0,41	2,95 ± 0,34	2,00 ± 1,00
Βαθμοποίηση	4,75 ± 0,75	4,89 ± 0,27	4,00 ± 1,00
Σύνολο	7,75 ± 0,75	7,84 ± 0,56	6,00 ± 2,00
Αριθμός νουκ/κών αλλαγών στην ISDR	8,2 ± 0, 73	9,1 ± 0,4	13,00 ± 1, 00 *
Πλήρως ανταποκριθέντες βιοχημικά	0/5 (0)	5/21 (23.8)	2/2 (100)
No (%)			

P=0,012

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΠΙΝΑΚΑ 12: Συσχέτιση των χαρακτηριστικών κάθε τύπου (αρχέγονο, ενδιάμεσο, μεταλλαγμένο) όπως κατατάσσονται με βάση τον αριθμό μεταλλαγών που εμφανίζουν.

Στον πίνακα 12 γίνεται ανάλυση των χαρακτηριστικών των ασθενών ανάλογα με το τύπο κατάταξης (αρχέγονο, ενδιάμεσο, μεταλλαγμένο). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας ασθενών , φύλου και ιικού φορτίου σε σχέση με το τύπο . Είναι εμφανής η τάση συσχέτισης των SGOT,SGPT και γGT με την κατάταξη σε τύπους. Παρ' όλα αυτά δεν είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές. Υπάρχει η τάση ο μεταλλαγμένος να εμφανίζει χαμηλότερες τιμές τρανσαμινασών απ' ότι ο ενδιάμεσος , που με τη σειρά του έχει χαμηλότερες τιμές απ' ότι ο αρχέγονος

Υπάρχει όμως σχέση τύπου και βιοχημικής ανταπόκρισης στη θεραπεία. Κανείς από τους 5 ασθενείς με αρχέγονο τύπο δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία , και οι δυο που ήταν μεταλλαγμένος τύπος ανταποκρίθηκαν πλήρως ,ενώ 5 από τους 21 ενδιάμεσου τύπου ανταποκρίθηκαν ποσοστό 24%.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ FIG 1: Συσχέτιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών όπως προκύπτουν από την ανάγνωση και σύγκριση με την πρότυπη HCV-J.

Στην fig 1 φαίνονται οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων της NS5A περιοχής (μεταξύ 6954-7073) των δειγμάτων που προέκυψαν από τους 28 ασθενείς με 1b γονότυπο. Στην κορυφή φαίνεται η πρωτότυπη αλληλουχία του HCV-J για την αντίστοιχη περιοχή και για τα αντίστοιχα αμινοξέα ( 2209-2248 ) . Οι διακεκομμένες γραμμές σε κάθε δείγμα υποδηλώνουν ταυτότητα με το πρωτότυπο ,ενώ οι μεταλλαγές αναγράφονται . Οι μη συνώνυμες μεταλλαγές που επιφέρουν αλλαγές σε επίπεδο αμινοξέων είναι υπογραμμισμένες.

Κανένα δείγμα δεν είναι απολύτως όμοιο με το HCV-J στέλεχος σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και όλα τα στελέχη έχουν μία τουλάχιστον νουκλεοτιδική διαφορά μεταξύ τους Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ νουκλεοτιδικών μεταλλαγών και ανταπόκρισης στην IFN .Ο αριθμός των νουκλεοτιδικών μεταλλαγών κυμάνθηκε από 5 έως 14 με  $10,14 \pm 0,86$  στους ανταποκρινόμενους στην IFN ,  $8,90 \pm 0,42$  στους μη ανταποκρινόμενους και  $9,21 \pm 0,39$  μέσο όρο σε όλους τους 28 ασθενείς .

Οι περισσότερες από τις παρατηρούμενες μεταλλαγές ήταν συνώνυμες, με αλλαγή στην τρίτη θέση της τριπλέτας του κωδικονίου . Οι πιο συχνά παρατηρούμενες συνώνυμες μεταλλαγές ήταν στις θέσεις 6959 (U→C ;25 από τις 28 ) , 6974 (U→C ;27 από τις 28 ) , 6995 (G→A ; 23 από τις 28 ) , 7058 (U→C ; 27 από τις 28 ) , 7070 (A→G ; 23 από τις 28 ) .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ FIG 2: Συσχέτιση των αμινοξικών αλληλουχιών των δειγμάτων και σύγκριση με την πρότυπη HCV-J.

Στην fig 2 φαίνονται οι αλληλουχίες των αμινοξέων της NS5A περιοχής (μεταξύ 2209-2248) των δειγμάτων που προέκυψαν από τους 28 ασθενείς με 1b γονότυπο. Στην κορυφή φαίνεται η πρωτότυπη αλληλουχία του HCV-J για την αντίστοιχη περιοχή και για τα αντίστοιχα αμινοξέα . Οι διακεκομμένες γραμμές σε κάθε δείγμα υποδηλώνουν ταυτότητα με το πρωτότυπο ,ενώ οι μεταλλαγές αναγράφονται .

Πέντε δείγματα είναι απολύτως όμοια με το HCV-J στέλεχος σε επίπεδο αμινοξέων δηλαδή οι μεταλλαγές σε επίπεδο νουκλεοτιδίων οδηγούν σε συνώνυμες μεταλλαγές. Μόνο 2/28 ασθενείς είχαν 4 ή περισσότερες αμινοξικές μεταλλαγές (μεταλλαγμένα στελέχη), ενώ 21/28 ανήκουν στο ενδιάμεσο τύπο . Η πιο συχνά

απαντώμενη μη-συνώνυμη μεταλλαγή ήταν στη θέση 6982 (A→G , 20 από τις 28 ) , και αφορούσε την αλλαγή του αμινοξέος 2218 από His σε Arg

Σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για τη

	6960		6970		6980		6990															
HCV - J	c	t	t	a	g	a	a	c	a	c	c	a	t	g	a	c	t	c	c	c	c	c
	P	S	L	K	A	U	C	U	U	H	H				D		S				P	
P1	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	c	-	-	-	-	c	-	c	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-
P5	-	c	-	c	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P6	-	-	c	-	-	-	a	-	c	-	c	<u>g</u>	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P7	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	<u>a</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P8	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-
P10	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P11	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-
P12	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P13	-	c	-	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P14	-	c	-	c	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P15	-	-	c	c	-	-	-	c	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-
P16	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	<u>g</u>	-	<u>t</u>	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	-
P17	-	-	c	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-
P18	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P19	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-
P20	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	<u>g</u>	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-

P21	- - c	<u>c</u> - c	- - a	- - -	- - -	- - -	- - c	- - -	- - -	- <u>g</u> -	- -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P22	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - c	- - -	- - -	- - -	- -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P23	- - -	- - c	- - -	- - a	- - -	- - -	- - c	- - -	- - -	- <u>g</u> -	- -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P24	- - -	- - c	- - -	- - -	- - -	- - -	- - c	- - -	- - -	- <u>g</u> -	- -	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-
P25	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - t	- - c	- - -	- - -	- <u>g</u> a	- -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P26	- - -	- - c	- - -	- - -	- - -	- - -	- - c	- - -	<u>g</u> -	- <u>g</u> -	- -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P27	- - -	- - c	- - -	- - -	- - a	- - -	- - c	- - c	- - -	- <u>g</u> -	- -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P28	- - -	- - c	- - -	- - -	- - -	- - -	- - c	- - -	- - -	- <u>g</u> -	- -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 1. Η πρωτότυπη αλληλουχία του HCV-j για την περιοχή 6954-7073 νουκλεοτιδίων και 2209-2248 για αντίστοιχα αμινοξέα αναφέρεται στη υποδηλώνουν ταυτότητα με το πρωτότυπο ενώ οι μεταλλαγές αναγράφονται. Οι μή συνώνημες μεταλλαγές που επιφέρουν αλλαγές σε επίπεδο

	P	S	L	K	A	U	C	U	U	H	H	D	S	P	D
P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>R</u>	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>R</u>	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
P5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
P6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
P7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-
P8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-

P9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P14	-	-	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P15	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-
P16	-	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	-
P17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P21	-	P	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P26	-	-	-	-	-	-	-	-	A	R	-	-	-	-	-	-
P27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
P28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-

Fig. 2. Συγκριση της αλληλουχίας αμινοξέων στην NS5A περιοχή για τα μελετούμενα δείγματα .Η προτύπιση αλληλουχία για το HCV-J αναφέρεται στην κορυφή( NS5A 220-280). Οι διακεκομμένες γραμμές σε κάθε δείγμα υποδηλώνουν ταυτότητα με το πρωτότυπο ενώ οι μεταλλαγές αναγράφονται







### 3.4.3 Συζήτηση

Η υπόθεση ότι η NS5A περιοχή του γονότυπου 1b μπορεί να χρησιμεύσει σαν προγνωστικός παράγοντας στην ανταπόκριση ή όχι θεραπείας με ιντερφερόνη , απασχόλησε έντονα τα τελευταία χρόνια την διεθνή επιστημονική κοινότητα. Στο πίνακα 13 που ακολουθεί φαίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από ανάλογες δημοσιεύσεις Ιαπώνων και Ευρωπαίων ερευνητών τα τελευταία 4 χρόνια και στη τελευταία γραμμή τα δικά μας ,όπως μετρήθηκαν στους Κρήτες ασθενείς.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13 : Ποσοστά παρατεταμένης ανταπόκρισης στη θεραπεία με IFN μεταξύ ασθενών με HCV – 1b σύμφωνα με το τύπο στην ISDR περιοχή

Όνομα πρώτου συγγραφέα	Αριθμός ασθενών	Αρχέγονος τύπος	Ενδιάμεσος τύπος	Μεταλλαγμένος τύπος
Enomoto	84	0 / 30 (0%)	5 / 38 (13%)	16 / 16 (100%)
Chayama	103	8 / 46 (12%)	9 / 38 (24%)	14 / 19 (74%)
Kurosaki	22	0 / 10 (0%)	0 / 6 (0%)	4 / 6 (67%)
Murakama	151	3 / 62 (5%)	8 / 64 (12%)	23 / 25 (92%)
Niiyama	49	1 / 24 (4%)	3 / 15 (20%)	7 / 10 (70%)
Ιαπωνικές μελέτες	409	12 / 172 (7%)	25 / 161 (15%)	64 / 76 (84%)
Zeuzem	22	0 / 11 (0%)	1 / 10 (10%)	0 / 1 (0%)
Halimi	29	0 / 10 (0%)	4 / 17 (24%)	0 / 2 (0%)
Squadrito	42	0 / 13 (0%)	6 / 24 (25%)	1 / 5 (20%)
Ευρωπαϊκές μελέτες	93	0 / 34 (0%)	11 / 51 (22%)	1 / 8 (12%)
Stratidaki	28	0 / 5 (0%)	5 / 21 (24%)	2 / 2 (100%)

Οι Chayama et al. από το Toranomon Νοσοκομείο του Τόκιο αναφέρουν αποτελέσματα 103 Ιαπώνων ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C που είχαν δεχθεί θεραπεία με ιντερφερόνη (86) . Αναφέρουν ότι το 74% των ασθενών μεταλλαγμένου τύπου εμφανίζει παρατεταμένη ανταπόκριση μετά από θεραπεία με INF-a , έναντι του 12% των ασθενών wild-type .Ασθενείς με ενδιάμεσο τύπο εμφάνιζαν ενδιάμεση ανταπόκριση 24% .Όμοια και οι Kurosaki et al. από το Medical and Dental University του Τόκιο εξετάζοντας 22 ασθενείς που είχαν δεχθεί θεραπεία με ιντερφερόνη βήτα ανέφεραν ότι το 67% των ασθενών μεταλλαγμένου τύπου εμφανίζει παρατεταμένη ανταπόκριση μετά την θεραπεία ,νώ κανένας με wild-type ISDR δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία . Συνολικά στις Ιαπωνικές μελέτες σε σύνολο 409 ασθενών οι 64 ανταποκρίθηκαν από τους 76 συνολικά

μεταλλαγμένου τύπου , ποσοστό 84%, ενώ μόνο 7 από τους 172 ασθενείς αρχέγονου τύπου ανταποκρίθηκαν τελικά ποσοστό 7%.

Αντίθετα πολλοί Ευρωπαίοι ερευνητές δεν βρίσκουν καμία συσχέτιση μεταξύ των αλληλουχιών NS5A και της απάντησης στη θεραπεία με IFN στους ασθενείς τους (87 ,88 , 89 , 90) . Σε σύνολο 93 Ευρωπαίων ασθενών από τους 8 με μεταλλαγμένο τύπο ανταποκρίθηκε μόνο 1 , ποσοστό 12% , ενώ από τους 34 ασθενείς με αρχέγονο τύπο δεν ανταποκρίθηκε κανείς.

Το ερώτημα εμφανίζεται να αποκτά και γεωγραφικό ενδιαφέρον. Στην πραγματικότητα υπάρχουν πολλές διαφορές στα αποτελέσματα των θεραπευτικών σχημάτων με ιντερφερόνη μεταξύ των Ιαπώνων και των Αμερικανών και Δυτικοευρωπαίων ερευνητών . Για παράδειγμα στα Ιαπωνικά θεραπευτικά σχήματα οι ασθενείς που εμφανίζουν παρατεταμένη ανταπόκριση μετά από θεραπεία κυμαίνονται στο 40% έως 50% . Ασθενείς με ανθεκτικό 1b γονότυπο έχουν μικρότερη συχνότητα περίπου στο 25% . Αυτά τα ποσοστά ανταποκρίσεων είναι πολύ υψηλά σε σύγκριση με τα εμφανιζόμενα στις Ευρωπαϊκές και Αμερικανικές μελέτες , όπου τα συνήθη ποσοστά παρατεταμένης ανταπόκρισης μετά από 6μηνη θεραπεία με ιντερφερόνη είναι μεταξύ 10% έως 25% και για ασθενείς με γονότυπο 1b μικρότερο από 10% . Μπορούν οι διαφορές στην ISDR περιοχή να εξηγήσουν αυτά τα αποτελέσματα ;

Για να συγκρίνουμε τις μελέτες κατευθείαν συγκεντρώσαμε τα αποτελέσματα από τα πρόσφατα δημοσιευμένα άρθρα για την ISDR περιοχή στον πίνακα 1 . Τα αποτελέσματα της συγκεντρωτικής έρευνας εντοπίζονται σε τρία ενδιαφέροντα σημεία :

- 1) Ο αρχέγονος (wild) τύπος εμφανίζει μικρή συχνότητα ανταπόκρισης στην ιντερφερόνη ,τόσο στις Ιαπωνικές μελέτες ,όσο και στις Ευρωπαϊκές .Ανταπόκριση εμφανίζουν συνολικά 12 από τους 206 μελετηθέντες ασθενείς ποσοστό 6%
- 2) Ο μεταλλαγμένος τύπος είναι πιο σπάνιος στους Ευρωπαίους από ότι στους Ιάπωνες ασθενείς . 8 από τους 93 Ευρωπαίους ποσοστό 9% ήταν μεταλλαγμένος τύπος , έναντι 76 των 409 μελετούμενων Ιαπώνων , ποσοστό 19%
- 3) Όταν οι ασθενείς με ενδιάμεσο και μεταλλαγμένο τύπο συνδυαστούν ,τότε η ανταπόκριση στην ιντερφερόνη είναι υψηλότερη από αυτή των ασθενών με wild τύπο

Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες παρουσιάζουν τρία κυρίως σημεία τα οποία επιδέχονται συζήτηση τουλάχιστον από πλευράς μεθοδολογίας .

1) Η θεωρούμενη ISDR περιοχή οριζόταν αυθαίρετα, στη βάση των δεδομένων αλληλούχησης χωρίς λειτουργική ανάλυση, που σημαίνει ότι τα όρια της NS5A περιοχής που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, με τον δυναμικό ρόλο της περιοχής στην αντίσταση του HCV στην INF παραμένουν άγνωστα, μαζί με τον μηχανισμό που εμπλέκεται

2) Οι περισσότερες μελέτες βασιζόταν σε κατευθείαν – άμεση ανάλυση και χαρακτηρισμό των αλληλουχιών νουκλεοτιδίων ,αμινοξέων (direct sequencing ). Δεδομένου όμως της παρουσίας των quasispecies στο γονιδίωμα του HCV , αυτή η μέθοδος φανερώνει την επικρατούσα αλληλουχία . Όμως διαφορετικές NS5A αλληλουχίες μπορεί να έχουν και διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις

3) Η επιλογή των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται σαν primers για την αντίστροφη μεταγραφή και τον πολλαπλασιασμό της NS5A περιοχής με πολυμεράση (PCR ) είναι κρίσιμη . Ανάλογα με τους χρησιμοποιούμενους primers κάποια quasispecies πολλαπλασιάζονται και ανιχνεύονται επιλεκτικά σε σχέση προς άλλα .

Ένα άλλο σημείο το οποίο επιδέχεται συζήτηση είναι τα θεραπευτικά σχήματα της ιντερφερόνης. Οι Ευρωπαίοι ασθενείς έλαβαν σχετικά χαμηλές δόσεις IFN , 3-6 μεγαμονάδες ανασυνδυασμένης γενετικά IFN άλφα , 3 φορές την εβδομάδα υποδορίως επί 24 ή 48 εβδομάδες . Οι Ιάπωνες ασθενείς έλαβαν σαφώς υψηλότερες δόσεις , χορηγούμενες με διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα π.χ. 6-10 μεγαμονάδες IFN – α τρεις φορές την εβδομάδα ενδομυϊκά επί 24 εβδομάδες ( Enomoto) ,6 μεγαμονάδες ανασυνδυασμένης γενετικά IFN βήτα ημερησίως ενδοφλέβια επί 6 εβδομάδες ( Kurosaki ) (91) ή 6 μεγαμονάδες λεμφοβλαστοειδούς IFN ημερησίως ενδομυϊκά επί 8 εβδομάδες , ακολουθούμενης από την ίδια δόση τρεις φορές την εβδομάδα επί 16 εβδομάδες (Chayama ) (86)

Πως συγκρίνονται τα δικά μας αποτελέσματα με των Ιαπώνων και των Ευρωπαίων αντίστοιχα

Συμφωνούμε με τα Ευρωπαϊκά δεδομένα

- 1) Συγκρίνοντας τις μεταλλαγές που εντοπίσαμε σε επίπεδο νουκλεοτιδίων με αυτές που αναφέρθηκαν από τους Ιάπωνες και τους Ευρωπαίους, υπάρχει μια ταυτότητα των αποτελεσμάτων μας με τα Ευρωπαϊκά δεδομένα (Khorsi et al 1997) (87). Κανένα δικό μας στέλεχος αρχέγονου τύπου δεν είναι όμοιο με το HCV-J σε επίπεδο νουκλεοτιδίων , ενώ φαίνεται να αναδεικνύεται ένα Ευρωπαϊκό αρχέγονο στέλεχος . Αντίθετα 5 από τα 28 δικά μας στελέχη ήταν όμοια με το αρχέγονο Ιαπωνικό στέλεχος σε επίπεδο αμινοξέων.

- 2) Η πλειονότητα των Ευρωπαϊκών στελεχών είναι ενδιάμεσου τύπου 55% και μόνο 9% ανήκει στο μεταλλαγμένο τύπο ,σε αντίθεση με τις Ιαπωνικές μελέτες όπου το 19% είναι μεταλλαγμένος τύπος . Τα δικά μας αποτελέσματα συμφωνούν με τα Ευρωπαϊκά όπου ο μεταλλαγμένος τύπος εμφανίζεται σε ποσοστό 7% ενώ ο ενδιάμεσος είναι η πλειοψηφία σε ποσοστό 75%.

Σε επίπεδο ανταπόκρισης σε σχέση με το τύπο συμφωνούμε με τις Ιαπωνικές μελέτες .

- 1) Κανείς από τους ασθενείς με αρχέγονο τύπο δεν ανταποκρίθηκε ούτε βιοχημικά , ούτε ιολογικά στην θεραπεία, ενώ και οι δυο ασθενείς με μεταλλαγμένο τύπο 2 χρόνια μετά την λήξη της θεραπείας εμφανίζουν βιοχημική ανταπόκριση.
- 2) Για τους ασθενείς με ενδιάμεσο τύπο τα ποσοστά ανταπόκρισης συγκλίνουν με αυτά των Ιαπώνων εμφανίζοντας βιοχημική ανταπόκριση 23%.
- 3) Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των αμινοξικών μεταλλαγών μεταξύ των βιοχημικά ανταποκριθέντων ( μέσος όρος αμινοξικών αλλαγών  $1,5 \pm 0,22$  ) και μη ανταποκριθέντων βιοχημικά ( μέσος όρος αμινοξικών αλλαγών  $2,57 \pm 1,4$  )  $p < 0,003$

Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι η ανάλυση των μεταλλαγών στην NS-5A περιοχή έδειξε ότι οι Κρήτες ασθενείς εμφανίζουν συχνότητα και ομοιότητα μεταλλαγών όμοια με τις εμφανιζόμενες στις Ευρωπαϊκές μελέτες. Έτσι φαίνεται να προκύπτει ένα Ευρωπαϊκό αρχέγονο στέλεχος διαφορετικό από το HCV-J σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Επίσης σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή εμπειρία τα μεταλλαγμένα στελέχη είναι αρκετά σπάνια.

Ωστόσο η βιοχημική αλλά όχι και η ιολογική ανταπόκριση στην IFN-a είναι όμοια με την αντίστοιχη των Ιαπώνων όπως εμφανίζεται στις Ιαπωνικές μελέτες , με τους αρχέγονους τύπους να μην παρουσιάζουν βιοχημική ανταπόκριση , τους μεταλλαγμένους να έχουν αρκετά καλή όταν εμφανίζονται και τους ενδιάμεσους να παρουσιάζουν κατά 23% ανταπόκριση.





## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Prince AM , Brotman B , Grady GF , Kuhns WJ , Hazzi C , Levine RW , et al  
Long-incubation post-tranfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis –B virus  
Lancet 1974; 2: 241-246
- 2) Feinstone SM , Kapikian AZ , Purcell RH , Alter HJ , Holland PV .  
Transfusion – associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B.  
N. Engl. J. Med. 1975; 292: 767-770
- 3) Q.-L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, M. Houghton  
Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome  
Science 1989; 244: 359-361
- 4) G. Kuo, Q.-L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, et. al.  
An Assay for Circulating Antibodies to a Major Etiologic Virus of Human Non-A, Non-B Hepatitis  
Science 1989; 244: 362-364
- 5) Tabor E , Gerety RJ .  
Inactivation of an agent of human non-A , non-B hepatitis by formalin .  
J Infect Dis 1980; 142: 767-
- 6) Bradley DW , Mccaustland KA , Cook EH , Schable CA , Ebert JW , Maynard JE  
Post-trnsfusion non-A , non-B hepatitis in chimpanzees . Physicochemical evidence that the tubule-  
forming agent is a small , enveloped virus .  
Gastroenterology 1985; 88: 773-
- 7) Chambers TJ , Halm CS , Galler R , Rice CM .  
Flavivirus genome organization , expression and replication .  
Ann Rev Microbiol 1990; 44 : 679-688
- 8) Miller RH , Purcell RH .  
Hepatitis C virus shares aminoacid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses aswell  
asmembers of two plant virus supergroups .  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2050-2061
- 9) Q.-I. Choo, K.H. Richman, J.H. Han, K.Berger, C.Lee, C.Dong, C.Gallegos, et al.  
Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 2451-2455
- 10) A. , Takamizawa, C. Mori, I. Fuke , S. Manabe , S. Murakami , J. Fujita , E. Onishi , T. Andoh , I.  
Yoshida, H. Okayama  
Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers  
Journal of Virology 1991; 65: 1105-1113
- 11) Han JH , Shyamala V , Richman KH , Brauer MJ , Irvine B , Urdea MS, et al .

Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA . Identification of conserved sequences in the 5' un-translated region and poly (A) tails at the 3' end .  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 1711-1715

12) Akatsuka T, Donets M, Scaglione L, Ching WM, Shih JWK, et al.  
B-cell epitopes on the hepatitis C virus nucleocapsid protein determined by human monospecific antibodies.  
Hepatology 1993; 15: 503-510

13) Ferroni P, Mascolo G, Zaninetti M, Colzani D, et al.  
Identification of four epitopes in hepatitis C virus core protein.  
J Clin Microbiol 1991; 31: 1586-1591

14) Spaete RR, Alexander DA, Rugroden ME, Choo QL, Berger K, et al.  
Characterization of the hepatitis C virus E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells.  
Virology 1992; 188: 819-830.

15) Behrens S-V, Tomei L, De Francesco R, et al.  
Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus.  
EMBO 1996; 15: 12-22.

16) Καραγιάννης Π  
Γονιδιακή οργάνωση , πρωτείνες και αντιγονικοί επίτοποι του ιού της ηπατίτιδας C.  
Σ.Χατζηγιάνης . Ηπατίτιδα C , εκδόσεις Π.Πασχαλίδης , Αθήνα ;1995: 29-37.

17) Καραγιάννης Π  
Ο ιός της ηπατίτιδος C: Οι λειτουργίες των μή κωδικογραφουσων περιοχών και των πρωτεϊνών του.  
Σ.Χατζηγιάνης . Ηπατίτιδα C , εκδόσεις Π.Πασχαλίδης , Αθήνα ;1996: 34-44

18) EASL international consensus conference on hepatitis C . Paris 26-28 February 1999 . Consensus statement  
J Hepatol 1999;30: 956-961

19) Dhumeaux D , Doffoel M , Galmiche J-P  
A French consensus conference on hepatitis C : screening and treatment  
J Hepatol 1997; 27: 941-944

20) Dienstag JL  
Sexual and perinatal transmission of hepatitis C  
Hepatology 1997; 26(3 Suppl. 1): 66S-70S.

21) Chang MH.  
Chronic hepatitis virus infection in children.  
J. Gastroenterol. Hepatol 1998; 13(5): 541-8

22) Ohto H, Terazawa S, Sasaki N et al.  
Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants.  
N. Engl. J. Med. 1994; 330: 744-750

- 23) Kage M, Ogasawara S, Kosai K, Shimamatsu K, Kojiro M, et al.  
Hepatitis C virus RNA present in saliva but absent in breast-milk of the hepatitis C carrier mother.  
J. Gastroenterol. Hepatol 1997; 12(7): 518-21.
- 24) Murphy A, Dooley S, Hillary IB, Murphy GM.  
HCV infection in porphyria cytanea tarda  
Lancet 1993; 341: 1534-1535
- 25) Watson J., Brind AM, Chapman CE et al.  
Hepatitis C virus: Epidemiology and genotypes in the North East of England.  
Gut 1996; 38: 269-276
- 26) French Study Group for the standarization of Hepatitis C virus PCR  
Improvement of hepatitis C virus RNA polymerase chain reaction through a multicentre quality control study  
J . Virol . Methods 1994; 49: 79-88
- 27) Zaaier HL, Cuypers HT, Reesink HW, et al.  
Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus  
Lancet 1993; 341:722-724
- 28) Albadalejo J , Alonso R , Antinozzi R , Bogard M ,et al  
Multicenter evaluation of the COBAS AMPLICOR HCV assay , an integrated PCR system for rapid detection of hepatitis C virus RNA in the diagnostic laboratory  
J . Clin . Microbiol 1998; 36: 862-865
- 29) Lunel F , Cresta P, Vitour D , Payan C et al  
Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA , NASBA , and monitor assays  
Hepatology 1999; 29: 528-535
- 30) Hawkins A, Davidson F, Simmonds P.  
Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1,2,and 3 by Quantiplex HCV RNA assay versions 1and 2, Roche Monitor assay and an in-house limiting dilution method.  
J . Clin . Microbiol 1997; 35: 187-192
- 31) Ishak K.,Baptista A.,Bianchi H.et al  
Histological grading and staging of chronic hepatitis.  
J.Hepatol. 1995; 22: 696-699
- 32) Gretch D , Dela Rosa C , Carithers R et al  
Assessment of hepatitis C viraemia using molecular amplification technologies : correlations and clinical implications  
Ann . Intern . Med. 1995; 123 : 321-329
- 33) Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus . In <The Molecular Medicine of Viral Hepatitis> 1997 , pp183 – 233 . John Wiley and Sons Ltd , New York .

- 34) Simmonds P .  
Variability of hepatitis C virus  
Hepatology 21, 570-583(1995)
- 35) Simmonds P . , Alberti A . , Alter HJ . , Bonino F . , Bradley DW , et al  
A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes .  
Hepatology 19 : 1321 – 1324 (1994)
- 36) P Simmonds., E.C. Holmes, T.-A. Cha , S.-W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. Beall et.al.  
Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region  
Journal of General Virology 74, 2391-2399(1993)
- 37) Okamoto H, Y. Sugiyama, S. Okada, K. Kurai, Y. Akahane, Y. Sugai, T. Tanaka, K. Sato, F. Tsuda, Y. Miyakawa, M. Mayumih. Okamoto  
Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources  
Journal of General Virology 73, 673-679(1992)
- 38) L.Stuyer, R. Rossau, A Wyseur, M . Duhamel, B. Van Derborght, H.V. Heuverswyn, G. Maertens  
Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay  
Journal of General Virology 74,1093-1102(1993)
- 39) J.H. Lee, W.K. Roth, S. Zeuzem  
Evaluation and comparison of different hepatitis C virus genotyping and serotyping assays  
Journal of Hepatology 26, 1001-1009(1997)
- 40) Germanidis G, Pawlotsky JM.  
Προσδιορισμός γονοτύπων και παρομοίων γονιδιωμάτων του ιού της ηπατίτιδας C (HCV). Βασικές έννοιες, μέθοδοι και κλινική σημασία  
Σ.Χατζηγιάννης . Ηπατίτιδα C , εκδόσεις Π.Πασχαλίδης , Αθήνα ;1999: 20-33
- 41) Pawlotsky JM, Germanidis G, Frainais PO, Bouvier M,et al.  
Evolution of the hepatitis C virus second envelope hypervariable region in chronically infected patients receiving interferon – a therapy.  
J. Virol. 1999; 73: 6490-6499
- 42) H. Okamoto, M. Kojima, S. Okada, H. Yoshizawa, H. Iizuka, T. Tanaka, et. al.  
Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2 year infection in a chimpanzee : variability and stability  
Virology 1992; 190: 894- 899
- 43) Ray SC, Wang YM, Laeyendecker O, Ticehurst JR , Villano SA et al  
Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia : hypervariable region 1 as a decoy  
J. Virol, 1999; 73: 2938-2946
- 44) Lerat H, Runin S, Habersetzer F, Berby F  
In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells : influence of viral load , viral genotype , and cell phenotype .

Blood 1998; 91: 3841-3849

45) Pawlotsky J.M, Germanidis G

Review: The non-structural 5A protein of hepatitis C virus

Journal of Viral Hepatitis 1999; 6: 343-356

46) Poynard T ., V. Leroy , M. Cohard , T. Thevenot , P.Mathurin , P. Opolon , J.P. Zarski

Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C : effects of dose and duration .

Hepatology 24 : 778 –789 (1996)

47 ) Magrin S , Craxi A , Fabiano C et al

HCV viraemia is more important than genotype as a predictor of response to interferon in Sicily

J Hepatology 25 , 583-590 (1996)

48) Pawlotsky JM , Thorval FR ,Bastie A et al

Factors affecting treatment responses to interferon-a in chronic hepatitis C

J ID 174 :1-7 (1996)

49) A.Tsubota, K. Chayama, K. Ikeda, A.Yasuji, I.Koida, S.Saitho, M.Hashimoto, S. Iwasaki, M. Kobayashi, K. Hiromitsu

Factors predictive of response to interferon-a therapy in hepatitis C virus infection

Hepatology 19, 1088-1094(1994)

50) Van Thiel DH , Friendlander L ,Faggiuoli S et al .

Response to interferon a therapy is influenced by the iron content of the liver

J Hepatology 20 : 410-415 (1994)

51) Davis GL ,Lau JYN .

Choice of appropriate end points of response to interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection .

J Hepatol 22: S110-S114 (1995)

52) Kobayashi Y ,Watanabe S, Konishi M et al .

Quantitation and typing of serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-b .

Hepatology 18 :1319-1325 (1993)

53) Yuki N ,Hayashi N ,Kasahara A ,Hagiwara H , et al .

Pretreatment viral load and response to prolonged interferon-a course for chronic hepatitis C .

J Hepatol 22: 457-463(1995)

54) Yoshioka K , Kakumu S , Wakita T , et al .

Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-a therapy : Relationship to genotypes of hepatitis C virus .

Hepatology 16 : 293-299 (1992)

55) Finter NB. Advances in interferon. Practitioner, 226: 1729-1732, 1981

56) Friedman RM : In interferons: a primer . New York Academic Press , 1981

- 57) Lengyel P:  
Biochemistry of interferons and their actions .  
Ann Rev Biochem , 51 : 251-282 ,1982 .
- 58) Creasy AA , Bartholomew JC , Merigan TC  
Role of G<sub>0</sub> – G<sub>1</sub> arrest in the inhibition of tumor cells growth by interferon .  
Proc . Natl. Acad Sci USA , 77: 1471 – 1475 , 1980
- 59) Vilcek J, Gresser I, Merigan TC  
Regulatory functions of interferons .  
Ann NY Acad Sci ,350:1-129,1980
- 60) Schultz RM , Papamathakis JD , Chirigos MA .  
Interferon: An inducer of macrophage activation by polyanions .  
Science ,197 : 674-676 , 1977
- 61) Kirkpatrick DV. Interferon: Current trials Hospital Physician, 20: 16-27, 1984
- 62) Domingo E.  
Biological significance of viral quasispecies  
Viral Hep Rev 2:247 – 261 . (1996)
- 63) N. Enomoto, I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, Y. Ogura, N. Izumi, F. Mamuro, C.Sato  
Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to Interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection  
The New England Journal of Medicine 334, 77-81(1996)
- 64) Davis GL .  
Prediction of response to interferon treatment of chronic hepatitis C .  
J Hepatol 21 :1-3 (1994)
- 65) Matsumoto A , Tanaka E , Suzuki T et al .  
Viral and host factors that contribute to efficacy of interferon-2a therapy in patients with chronic hepatitis C  
Dig Dis Sc 39 :1273-1280 (1994)
- 66) Silini E , Bono F, Cividini A et al .  
Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities .  
Hepatology 21: 285-290 (1995)
- 67) Brillanti S ,Masci C ,Ricci P et al .  
Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C .  
Hepatology 15: 998-1001 (1992)
- 68) Quiroga JA, Bosch O, Gonzalez R et al.  
Immunoglobulin M antibody to hepatitis C virus during interferon therapy for chronic hepatitis C

Gastroenterology 103: 1285-1289 (1992)

69) Tassopoulos NC, Hatzakis AE, Papatheodoridis GV, et al.  
Early prediction of successful alpha-interferon therapy of chronic hepatitis C by core IgM antibodies to hepatitis C virus.

J Hepatol 20:305-311 (1994)

70) Tabone M, Galatola G, Secreto P, et al.

Serum levels of anti-hepatitis C virus IgM antibodies may predict the response to interferon- $\alpha$  therapy in chronic hepatitis C.

J V Hep 1: 155-157 (1994)

71) Lee JH, Wagner M, Roth W, Teuber G, Sarrazin C, Zeuzem S.

Effect of ribavirin on virus load and quasispecies distribution in patients infected with hepatitis C virus.

J Hepatol 1998; 29: 29-35.

72) Sidwell R, Huffman, Khare L, Allen LB, Witlowski JT, Robins RK.

Broad – spectrum activity of virazole : 1-beta-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide .

Science , 117 : 705-706 ,1972

73) Patterson JL, Fernandez-Larson R.

Molecular action of ribavirin

Rev Infect Dis , 12:1132-1146 , 1990

74) Puoti C, Magrini A, Filippi T, et al.

Effects of ursodeoxycholic acid on serum liver enzymes in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease.

Eur.J.Gastroenterol Hepatol 1995; 7: 151-154

75) Clerici C, Distrutti E, Gentili G, et al.

Interferon plus ursodeoxycholic acid versus interferon in the treatment of chronic C viral hepatitis

Minerva Med 1997; 88: 219-225

76) Kiso S, Kawata S, Tamura S, et al.

Efficacy of combination therapy of interferon- $\alpha$  with ursodeoxycholic acid in chronic hepatitis C: a randomized controlled clinical trial.

J Gastroenterol 1997; 32: 56-62

77) Investigator's brochure, Schering-Plough Research Institute

Information for the investigational product SCH 54031 (PEG12000-Interferon alpha –2b ,recombinant): A pegylated alpha interferon for the treatment of chronic viral hepatitis and various oncologic conditions., March 1997.

78) Blatt LM, Klein SB, Taylor MW.

The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon- $\alpha$  species , consensus interferon.

J. Interferon Cytokine Res 1996; 16: 489-99

79) Heathcote E, Keeffe EB, Lee SS, Feinman SV et al

Re-treatment of chronic hepatitis C with consensus interferon.  
Hepatology 1998; 27: 1136-43

80) Heathcote EJ, Mullen KD, James SP, Albert D, CIGN Study Group.  
Patients with breakthroughs during interferon treatment can successfully be retreated with consensus interferon.  
Hepatology 1998; 28(Suppl.): 508A

81) Pursell RH  
The Hepatitis C virus :Overview.  
Hepatology 26 (suppl 1) :11S - 14S .(1997)

82) K. Hino S. Sainokami, K. Shimoda, S. Iino, Y. Wang, H. Okamoto, Y. Miyakawa, M. Mayumi  
Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C  
Journal of Medical Virology 42, 299-305(1994)

83) N. Enomoto, I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, , N. Izumi, F. Marumo, C.Sato  
Comparison of full-length sequences of interferon sensitive and resistant hepatitis C virus 1b  
Journal of Clinical Investigation 96, 224-230(1995)

84) Kato, Hijkata, Y. Ootsuyama, M Nakagawa ,et.al.  
Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 ,9524-9528(1990)

85) Gale MJ , Korth MJ , Tang NM , Tan S ,Hopkins DA  
Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein  
Virology 230 ,217-227 (1997)

86) Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M  
Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection .  
Hepatology 25 , 745-749(1997)

87) H. Khorsi , S. Castelain , A. Wyseur , J. Izopet, V. Canva, A. Rombout et al.  
Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209-2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in French patients  
Journal of Hepatology 27 , 72-77(1997)

88) Hofgartner WT, Polyak SJ , Sullivan DG , Catithers RL Gretch DR  
Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in North American patients infected with HCV genotype 1a or 1b  
J Med Virol 53, 118-126 (1997)

89) Sarrazin C, Berg T , Lee JH



Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy  
J Hepatol 30 , 1004-1013 (1999)

90) Squadrito G , Leone F , Sartori M  
Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alpha  
Gastroenterology 113 , 567-572 (1997)

91) Kurosaki M, Enomoto N, Murakami T, Sakuma I, Asahina I, Yamamoto C, Takaaki I, et al.  
**Analysis of genotypes and amino acid residues 2209-2248 of NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon beta therapy**

Hepatology (1997); 25:750-753

100) Hoofnagle JH, D'Amico AM.  
The treatment of chronic viral hepatitis  
N.Engl.J.Med. (1997) 336:347-56

101) Carithers RL, Emerson SS.  
Therapy of hepatitis C: meta-analysis of interferon alpha-2b trials.  
Hepatology (1997); 25(Suppl 1): 83S-88S

102) Marcellin P, Boyer N, Gervais A, et al.  
Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon alpha therapy.  
Ann.Intern.Med. (1997) 127:875-81.

103) Olle Reichard, Glaumann H, Fryden A, Norkrans G, Wejstal R, Weiland O.  
Long-term follow-up of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to alpha-interferon.  
J Hepatol 1999; 30: 783-787.

104) Kim WR, Poterucha JJ, Hermans JE, et al.  
Cost effectiveness of 6 and 12 months of interferon alpha therapy for chronic hepatitis C.  
Ann.Intern.Med. (1997) 127:866-74.

105) McHutchison J, Gordon S, Schiff E, Schiffman M, Lee W, Rustgi V, et al  
Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C.  
N Engl J Med 1998; 339:1485-92.

106) Poynard T, Marcellin P, Lee S, Niederau C, Minuk G, Ideo G et al  
Randomised trial of interferon alfa-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alfa-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus.  
Lancet 1998; 352: 1426-32.

- 107) Lee WM.  
Therapy of hepatitis C : interferon alfa-2a trials.  
Hepatology (1997); 26(Suppl 1): 89S-95S.
- 108) Farrell GC.  
Therapy of hepatitis C : interferon alfa-2a trials.  
Hepatology (1997); 26(Suppl 1): 96S-100S.
- 109) Keeffe EB, Hollinger FB and the Consensus Interferon Study Group.  
Therapy of hepatitis C: consensus interferon trials.  
Hepatology (1997); 26(Suppl 1): 101S-107S.
- 110) DiMarco V, Almasio P, Vaccaro A, Ferraro D, Parisi P, Cataldo M, et al.  
Combined treatment of relapse of chronic hepatitis C with high dose alfa-2b interferon plus ribavirin for 6 to 12 months.  
J Hepatol 2000; 33: 456-62.
- 111) Barbaro G, Di Lorenzo G, Soldini M, Giancaspro G, Pellicelli A, Grisorio B, et al.  
Evaluation of long-term efficacy of interferon alfa-2b and ribavirin in combination in naïve patients with chronic hepatitis C: an Italian multicenter experience.  
J Hepatol 2000; 33: 448-55.
- 112) Bellobuono A, Mondazzi L, Tempini S, Chiodi F, Magliano E, Furione L, et al.  
Early addition of ribavirin to interferon in chronic hepatitis C not responsive to interferon monotherapy.  
J Hepatol 2000; 33: 463-8.
- 113) Andreone P, Gramenzi A, Cursaro C, Sbolli G, Fiorino S, et al  
Interferon-a plus ribavirin in chronic hepatitis C resistant to previous Interferon-a course: results of a randomized multicenter trial.  
J Hepatol 1999; 30: 788-793.
- 114) Castro F, Esteban J, Sauleda S, Viladomiu L, et al.  
Utility of early testing for HCV viremia as predictive factor of sustained response during interferon or interferon plus ribavirin treatment.  
J Hepatol 2000; 32: 843-49.
- 115) Karino Y, Toyota S, Sugawara M et al.  
Early loss of serum hepatitis C virus RNA can predict a sustained response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C.  
Am.J.Gastroenterol. 1997, 92:61-65.
- 116) Orito E, Mizokami M, Suzuki K et al.  
Loss of serum HCV RNA at week 4 of interferon-a therapy is associated with more favorable long-term response in patients with chronic hepatitis C .  
J.Med.Virol.1995,46:109-115.
- 117) Εθνική Στατιστική Υπηρεσία Ελλάδας.  
Στατιστική και κοινωνική πρόνοια και υγιεινή 1986 1988 1991

- 118) Ι. Βλαχονικολής, Β. Γεωργούλιας.  
Θνησιμότητα από κακοήθη νεοπλασμάτα στην Κρήτη 1992  
Ιατρική 1996 ; 69: 291-302.
- 119) Lionis C., Koulentaki M, Biziagos E and Kouroumalis E  
Current prevalence of hepatitis A, B and C markers in a well defined area of rural Crete-Greece.  
J. Viral Hepatitis (1997); 4:25-32
- 120) Σινάνη Χ., Σάββας Σ., Χατζηγιάννης Α., Σπανού Φ., et al  
Γονότυποι του ΗCV στην Ελλάδα . Μεταβαλλόμενη επιδημιολογία και κλινικές συσχετίσεις  
Ηπατίτιδα C Αθήνα (1998); 171-180
- 121) Sawyer L, Leung K., Friesenhahn M., Duey D., McMorrow M., Eguchi B.  
Clinical laboratory evaluation of a new sensitive and specific assay for qualitative detection of hepatitis  
C virus RNA in clinical specimens.  
J Hepatol 2000; 32(Suppl 2): 116A
- 122) Schiff ER, deMedina M, Kahn RS.  
New perspectives in the diagnosis of hepatitis C.  
Semin Liv Dis 1999; 19(Suppl 1): 3-15
- 123) Thomas HC, Torok ME, Forton DM, Taylor-Robinson SD.  
Possible mechanisms of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C  
J Hepatol 1999; 31(Suppl 1): 152-159