



МЕДИЦИНСКИ
ФАКУЛТЕТ
МУ - СОФИЯ

Проучване на имуногенетични маркери свързани с протичането на хепатит В вирусна инфекция

Атанаска Илиева Георгиева

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Докторска програма: Имунология

Научен ръководител: Проф. д-р Елисавета Йорданова Наумова, д.м.н.

София, 2015

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	4
I. Въведение	4
II. HBV структура и геномна организация.....	6
III. Цикъл на HBV репликация.....	8
IV. Хронична HBV инфекция и методи за детекция.....	10
1. Основни серологични маркери и изследване на вирусната ДНК.....	11
1.1 Хепатит В повърхностен антиген - HBsAg	11
1.2 HBV-DNA.....	12
1.3 Молекулярна диагностика на HBV инфекции чрез Real-time PCR.....	13
1.4 HBV генотип	14
V. Имунен отговор при HBV	15
5.1 Вроден имунен отговор при HBV инфекция.....	17
5.1.1 Роля на NK клетките.....	18
5.1.2 NK клетъчни рецептори от тип I интегрални протеини с имуноглобулин-подобни домейни	21
5.2. Адаптивен имунен отговор	24
5.2.1. Вирус специфични CD4 + и CD8 + T клетъчни отговори.....	25
VI. Роля на генетичните фактори на гостоприемника при HBV инфекция.....	28
6.1 HLA структура и генетична организация	28
6.2. HLA алели и хаплотипи при HBV.....	30
6.3 Геномна организация и еволюция на KIR гените	33
6.4 KIR алели и хаплотипи.....	35
6.5 Асоциация на KIR алели, KIR/HLA – лигандни комбинации и хаплотипи при HBV	38
ОБОБЩЕНИЕ	41
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	43
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	44
I. Материали.....	44
II. Методи	45
1. Изолиране на геномна ДНК	45
2. Изолиране на вирусна ДНК	46
3. HLA-клас I и клас II генотипизиране с ниска разграничителна способност чрез PCR-SSP метод	47
4. Определяне на KIR полиморфизъм.....	51
5. Определяне на KIR HLA клас I лиганден полиморфизъм	54

5.1	Индиректно определяне на HLA клас I лигандни групи.....	55
5.2	Директно определяне на KIR HLA клас I лиганди.	55
6.	Определяне на HBV генотип	57
7.	Количествено определяне на HBV DNA, чрез Real Time PCR метод (Applied Biosystems)	63
8.	Статистически методи.....	68
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....		70
I.	Въвеждане, оптимизиране и валидиране на „in house” Real-Time PCR за количествено определяне на HBV-DNA.....	70
1.	Въвеждане на метод за количествено определяне на HBV DNA, чрез използване на real time PCR.....	73
1.1.	Аналитична специфичност	70
1.2	Линейност и аналитична чувствителност.....	71
1.3	Характеристики на PCR-ната реакция	73
1.4.	Точност	77
2.	Валидиране на метод за количествено определяне на HBV DNA, чрез използване на real time PCR.	79
II.	Изследване на HBV-ДНК и HLA клас I и клас II полиморфизъм при хронично инфектирани пациенти. Изследване на вирусния генотип при хронично инфектирани пациенти.	81
III.	Проучване на HLA клас I (-A и -B) и клас II (-DR) генетичен полиморфизъм при хронично инфектирани с HBV и спонтанно оздравели пациенти.	88
IV.	Проучване на KIR генен полиморфизъм при хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти.	96
1.	KIR гени/псевдогени.....	96
2.	KIR профили.....	102
V.	Проучване на KIR / HLA лиганден полиморфизъм при репрезентивна група здрави индивиди от българската популация, хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти.	113
1.	KIR лиганди.....	113
2.	KIR/ HLA лигандни комбинации	117
ОБОБЩЕНИЕ		126
ИЗВОДИ		128
СПРАВКА ЗА ПРИНОСИ		130
I.	Теоретични (научно-експериментални) приноси.....	130
II.	Приложни (научно-практически) приноси	130

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Инфекцията с хепатитен вирус В (HBV) представлява глобален социален проблем. При приблизително една трета от населението на света се установяват вирус-индуцирани антитела срещу антигените на вируса. От 350 до 400 милиона индивида са носители на повърхностния HBV антиген HBsAg (1). Двадесет и пет процента от заразените развиват хронична чернодробна болест или цироза, прогресиращи до хепатоцелуларен карцином. Процентното разпространение на HBV варира в различните региони. Регионите с ниска честота на разпространение (<2%) обхващат 12% от световното население: Западна Европа, Съединените Щати и Канада, Австралия и Нова Зеландия. В тези региони рискът за инфекция с вируса е по-малък от 20%. При половината от населението на земята включващо Япония, Средиземноморието, Централна Азия, Близкия изток, Латинска и Южна Америка се наблюдава средна честота на разпространение на вируса (2%-7%), като рискът за развитие на вирусна инфекция е от 20 до 60 %. Данните за България сочат до 5% честота на HBV сред населението, което поставя страната ни на едно от първите места в Европа по разпространение на HBV (2). Районите с висока честота на разпространение ($\geq 8\%$) включват Югоизточна Азия, Китай и Субсахарска Африка, като вероятността за инфекция в тези райони е над 60% (3).

Точните патогенетични механизми, отговорни за хронифицирането на инфекцията, все още не са установени. Голяма част от проучванията са концентрирани върху ролята на имунната система и в частност върху гените на вродения и адаптивен имуен отговор. Приема се, че самият HBV не е директно цитопатоген. Имуният отговор на гостоприемника срещу вирусните антигени може да доведе както до изчистване на вируса, така и до разрушаване на инфектираните хепатоцити по време на HBV инфекцията. При хронична инфекция чернодробното увреждане се регулира най-вече от генетични фактори, фактори от страна на вируса (напр. вирусни мутации), както и такива от външната среда. Понастоящем се приема, че генетичните фактори са определящи за хронифицирането на инфекцията с HBV, но те могат да играят роля и при лечението ѝ и отговора

на ваксинирането. Ключов момент в регулацията на оптимален имуен отговор срещу вирусната инфекция имат HLA клас I и клас II молекулите, които представят антигените на CD8+ клетки, разпознаващи инфектираните хепатоцити, експресиращи вирусните антигени на CD4+ Т клетки. Рестриктираните от HLA клас I и клас II Т клетъчни отговори срещу антигените на вируса са силни, поликлонални и мултиспецифични при пациенти с остра инфекция и водят до успешно елиминиране на вируса. Тези отговори обаче са относително слаби и с по-ограничена специфичност при болните с хронична инфекция, което е основна причина за персистирането на вируса по време на HBV инфекцията. Известно е, че различните HLA алотипи представят с различна ефективност вирусните епитопи на Т клетките. Това предполага асоциации на определени HLA алели с клирънса на вируса или персистирането на вирусната инфекция.

НК клетките убиват директно вирусно-инфектираните и трансформирани клетки, като по този начин имат директен антивирусен ефект и протектират срещу напредването на чернодробното увреждане и развитие на хепатоцелуларен карцином. Контролът за НК клетъчното активиране и убиване на прицелните клетки представлява доста комплексна система от разнообразни инхибиращи и активиращи рецепторно-лигандни взаимодействия, улавящи промените в експресията на МНС молекулите. Основните разпознавателни механизми на НК клетките при хората, медиращи инхибиране или активиране на НК клетъчната функция, са свързани с експресията на рецепторите от имуноглобулиновото суперсемейство (killer immunoglobulin-like receptors – KIRs), както и на лигандите им, които за повечето KIRs са специфични мотиви на HLA клас I молекулите.

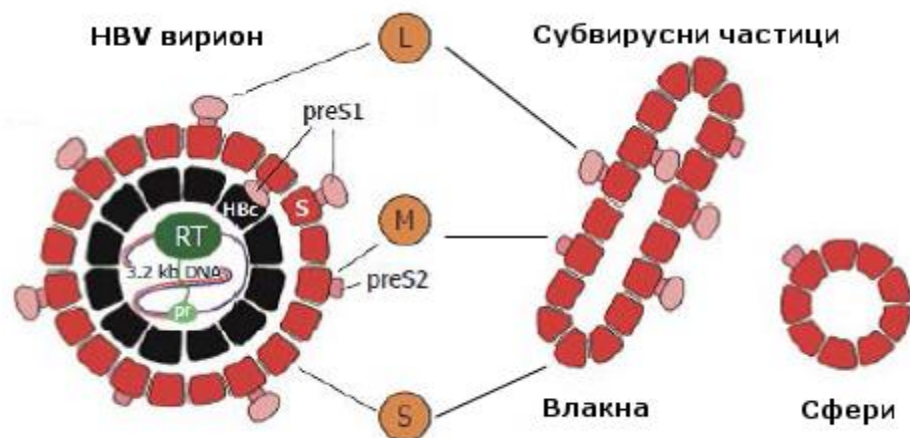
Полиморфизмът на гените на вродения и придобит имуен отговор, контролиращи и регулиращи имунната реактивност, е предпоставка която обяснява в голяма степен вариабилността в протичането и изхода от вирусната инфекция. Понастоящем съществуват доказателства за асоциации на тези гени с оздравяването и/или хронифицирането на инфекцията с HBV.

Всичко това ни даде основание да се насочим към проучване на имуногенетични маркери, които биха могли да играят роля за оздравяването, хронифицирането и начина на протичане на инфекцията в българската популация на пациенти с HBV инфекция.

II. HBV структура и геномна организация

Инфекциозните вирусни частици или така наречените Dane частици (Dane 1970) имат сферична структура с двойна обвивка и големина 42-44 nm и съдържат едно копие от ДНК вирусен геном, ковалентно свързан с терминалния протеин на вируса.

Отличителен белег на HBV инфекцията е присъствието на два допълнителни вида частици - сфери и влакна, които се състоят от хепатит В вирусни протеини и извлечени липиди от гостоприемника (4). Тъй като те не съдържат вирусни нуклеинови киселини, субвирусните частици не са инфекциозни (Фиг.1). Вирусната мембрана е изградена от три повърхностни протеини наречени - pre S1 (голям), pre S2 (среден) и S (малък), които съставят HBsAg. Както при почти всички обвити вируси, HBV частицата съдържа и протеини с произход от гостоприемника (4,5). Геномът на HBV се състои от частично двойноверижна, кръгова ДНК от приблизително 3200 нуклеотида, различаваща се незначително от генотип до генотип и заедно с ядрения протеин образува нуклеокапсиди (6.). В частицата Dane негативната верига на вирусната ДНК присъства в пълна дължина, носейки пълната генетична информация. От друга страна, положителна верига обхваща приблизително 2/3 от генома, като неговият 3' край е с променлива дължина (7, 8). Вирусната полимераза е ковалентно свързана към негативната верига чрез фосфотирозинна връзка. В 5' края на положителната верига кратък РНК олигомер с произход от прегеномна РНК (pgRNA) остава ковалентно свързан след вирусния ДНК синтез. Негативната верига също има малък излишък от 8-9 нуклеотида в дължина, както на 5' така и на 3' края, наречени R остатъци. Тези структурни излишъци са основни за вирусната репликация (9,10., 6, 11) .

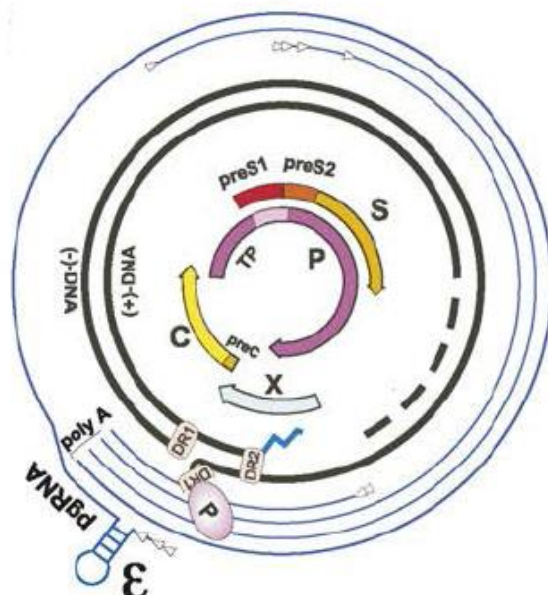


Фиг. 1. Схематично представяне на HBV вириона и неинфекциозни празни субвирусни частици (нишки и сфери). В нуклеокапсида HbcAg (показани в черно) е изобразен частично двойноверижан вирусен геном gcDNA, ковалентно свързан с терминален протеин на обратната транскриптаза. Наличието и разпределението на трите повърхностни протеини: L (preS1 или големи), M (preS2 или средни) и S (малки) са показани както на HBV, така и на субвирусните частици (адаптирано от Glebe 2007)

Геномът на HBV има четири отворени рамки за четене (ORFs) (12) (Фиг. 2). Всички ORFs са в една и съща ориентация и частично се припокриват и се кодират от отрицателна верига. Върху генома се идентифицират шест стартови кодони, четири промотори и два елемента, подпомагащи транскрипцията. Четирите основни ORFs са следните:

- 1) preS/S - кодиращи трите вирусни повърхностни протеини;
- 2) precore/core - кодираща core протеина, който е основен за образуването на нуклеокапсида - HBeAg и неструктурния precore протеин, известен също като секреторен HBe антиген;
- 3) Pol ORF – кодираща вирусната полимераза, която притежава обратна транскриптазна ДНК полимеразна и RNase H активност и терминален протеин;

4) X ORF - кодираща малкия регулаторен X протеин, участващ във вирусната репликация и активиращ множество клетъчни и вирусни гени. (13,14).



Фиг. 2. Организация на хепатит В вирус.

Външните тънки линии представляват вирусни транскрипти, които се иницират в различни места под контрола на отделни промотори. Прегеномната РНК е изобразена на фигурата по-горе като примка. Плътните линии представляват ДНК генома, който присъства в инфекциозни вириони. Отрицателната ДНК верига в 5' края е ковалентно свързана с полимеразния терминален протеин. Положителната ДНК верига в 5' края се състои от РНК олигонуклеотиди, получен от 5' края на pgRNA. Вътрешните стрелки показват отворените рамки за четене (Nassal 2008)

III. Цикъл на HBV репликация

През последните 30 години създаването на различни HBV - трансфектирани човешки чернодробни клетъчни линии и употребата на HBV подобни вируси, като патешки хепатитен В вирус (ДНВВ) и вируса на хепатит при североамерикански мартот (WHV), допринесоха за изясняване на много етапи от репликационния цикъл на семейство *Нepadnaviridae* (15, 16,17).

HBV е в състояние да се прикрепя към хепатоцитите, чрез клетъчно неспецифичен тип свързване към клетъчно-асоциран хепаран сулфат протеогликан (18). Тази първа стъпка на обратимо свързване е последвана от необратимо свързване на вируса към специфичен хепатоцитен рецептор (4,5). Чрез мутационни анализи се установиха инфекциозни детерминанти в рамките на повърхностния протеин на HBV. Те включват 75 аминокиселини от pre S1 домейна на L-протеина и антигенната примка на S домейна (19, 20, 21).

На по-късен етап вирусът се свързва необратимо с хепатоцитно-специфичен preS1 рецептор и навлиза чрез ендоцитоза или фузия. При финалния етап се освобождава двойноверижна ДНК (rcDNA), която се транспортира до клетъчното ядро на гостоприемника (22). Веднъж навлязла в ядрото, rcDNA се подготвя за изграждане на двойноверижна ДНК нишка с цел производство на ковалентно затворена кръгова ДНК (cccDNA). В хепатоцитното ядро cccDNA остава стабилна в продължение на десетилетия структурно устроена като хроматин (минихромозом) (23). Използвайки механизмите за клетъчна транскрипция, cccDNA произвежда всички вирусни РНК, необходими за вирусна репликация и синтез на протеини. От имунологична гледна точка, cccDNA е изключително важна, тъй като се запазва в повечето хепатоцити и не е възможно да бъде униожена от имунната система. По тази причина, дори ако имунният отговор е в състояние да контролира HBV инфекцията, това не предполага цялостно премахване на HBV, защото cccDNA присъства като скрита HBV инфекция в хепатоцитите (24). Обратната транскрипция на прегеномната HBV-РНК се извършва от HBV-ДНК полимеразата. Тази нова HBV ДНК може да бъде наново внесена в ядрото, за да образува допълнителни cccDNA молекули или да бъде обвита с HBV транслирани протеини за секреция (5).

Въпреки, че образуването на cccDNA минихромозом е важно за създаването на продуктивна инфекция, това се постига само в малка част от човешки хепатоцити. Устойчиви HBV геноми могат да бъдат запазени в заразените хепатоцити, когато нуклеокапсиди, произведени в цитоплазмата чрез обратна транскрипция и съдържащи устойчиви мутанти, се транспортират в ядрото и се добавят към cccDNA пула. В резултат на антивирусен натиск, тези варианти съжителстват с див тип cccDNA молекули и функционират като шаблони за производството на резистентни мутанти, които се разпространяват до други хепатоцити и в крайна сметка може дори

да заменят дивия тип сссDNA молекули в черния дроб (25,26). При хронична инфекция, премахването на заразените клетки индуцира хепатоцитна пролиферация, което от своя страна благоприятства елиминирането на сссDNA (27, 28) , но много ниски нива на сссDNA може да се задържат за неопределено време, обяснявайки доживотния имунен отговор към HBV, въпреки клиничното изчистване на инфекцията (29).

Точните молекулярни механизми на HBV транскрипцията все още са слабо проучени. Транскрипцията на pgRNA е критична стъпка за геномната амплификация и определя степента на HBV репликация. Определянето на факторите, които влияят на стабилността и транскрипционната активност на сссDNA по време на инфекция и при антивирусна терапия, може да подпомогне създаването на нови терапевтични стратегии, насочени към намаляване и унищожаване на пула от сссDNA.

IV. Хронична HBV инфекция и методи за детекция

За хронична HBV инфекция се приема присъствие на HBsAg в кръвта за по-дълъг период от шест месеца. Трябва да се направят допълнителни тестове за HBV репликация, HBeAg и серумна HBV ДНК, за да се определи дали при пациента е необходимо да се започне антивирусна терапия. Всички пациенти с хронична HBV инфекция редовно се проследяват за прогресия на чернодробното заболяване, тъй като HBV-ДНК и ALT варират по-време на инфекцията. Пациенти, които не са били кандидати за лечение биха могли да станат такива по време на мониторирането. Като неактивни носители се определят пациентите, негативни за HBeAg с нормални нива на ALT и ниски или неоткриваеми нива на HBV-ДНК (< 2000 IU / ml). Те обикновено са с добра прогноза и не е нужно антивирусно лечение. Въпреки това, са необходими серийни тестове, за да се разграничат от HBeAg негативните пациенти, които имат променливи ALT и/или наличие на HBV-ДНК (30). Пациентите, които са наистина неактивни носители следва да продължат да се наблюдават, но на по-редки интервали от време. HBeAg негативни пациенти с

повишени серумните концентрации на ALT трябва да бъдат тествани за серумна HBV-ДНК, за да се определи, дали чернодробното заболяване е свързано постоянна HBV репликация (30).

1. Основни серологични маркери и изследване на вирусната ДНК

При инфекция с вируса се определят трите вирусни антигена - HBsAg, HBeAg и HBcAg. Ядрения антиген (HBcAg) се експресира интрацелуларно в инфектираните хепатоцити и не се установява в серума, но анти-HBc може да се открие в хода на HBV инфекция в серума. Терминът сероконверсия се използва, когато се изработят антителата срещу съответните антигени. При сероконверсия антигенът става неоткриваем в серума. Наличието на HBsAg показва наличие на вируса в кръвта, докато наличието на анти-HBs показва имунитет към хепатит В. HBeAg се секретира по време на остра инфекция. Въпреки това, той може да се задържи при хронична инфекция и присъствието му показва високи нива на вирусна инфекциозност. HBcAg показва присъствие и репликация на хепатит В вируса. Наличието на анти-HBc не предполага имунитет към хепатит В и е по-малко полезен маркер. Интервалът между инфекцията и имунното разпознаване е силно променлив. Имунното разпознаване води до загуба на HBeAg и образуване на анти-HBe (31).

1.1 Хепатит В повърхностен антиген – HbsAg

Хепатит В повърхостния антиген (HBsAg) е серологичен отличителен белег на HBV инфекция. През последните десетилетия се създадоха серологични тестове за HBsAg, HBcAg, HBeAg и антитела. Серологични тестове се използват за разграничаване на остра от хронична HBV инфекции и за проследяване на ваксиналния имунитет. Нивото на HBsAg е отражение на транскрипционната активност на вирусната матрица - ковалентно затворена кръгова HBV ДНК (cccDNA). Той може да се открие, чрез радиоимуноанализи (RIA) или имуноензимни анализи (EIA). HBsAg се появява в серум от 1 до 10 седмици след излагане на HBV, преди появата на

иктер и увеличение на серумните аланинаминотрансферази. При пациенти, които се възстановяват от остър хепатит В, HBsAg не се открива след шестия месец от началото на инфекцията. Наличието на HBsAg за повече от шест месеца се смята за хронична инфекция. Приблизително 5% от имунокомпетентните възрастни пациенти развиват хронична инфекция (32). При повечето пациенти, анти-HBs се запазват с десетилетия, като осигуряват дългосрочен имунитет. Едновременно установяване на HBsAg и анти-HBs се съобщава при HBsAg положителни лица (33,34) В повечето случаи, антителата не са в състояние да неутрализират циркулиращите вириони. Следователно тези лица трябва да се разглеждат като носители на хепатит В вируса. През последните години в медицинската практика се прилага количествено определяне на нивата на HBsAg (qHBsAg). Методите за qHBsAg са напълно автоматизирани и имат висока производителност (35).

1.2 HBV-DNA

С напредъка в областта на молекулярната биология, през последното десетилетие се разработиха клинично-лабораторни методи за качествено и количествено определяне на HBV ДНК. Количествено определяне на HBV-ДНК е важен маркер при избора на терапевтично средство, проследяване на лечението, резистентността към антивирусни препарати и определяне периода и края на лечението. В основата на по-голяма част от анализите се използва разработената от Mullis и сътр. полимеразно верижна реакция (PCR) (36). Тази амплификационна техника изцяло е трансформирана за приложения в областта на биологичните изследвания и клиничната диагностика. След откриване на PCR, термоустойчивата Taq полимеразата и обратно транскриптазните ензими, амплификационна техника е модифицирана за автоматизирана детекция на ДНК и РНК, чрез флуоресцентна амплификация в реално време (Real Time PCR), при които се осъществява едновременна детекция и количествено определяне (37). Теоретично, PCR реакциите представляват експоненциална амплификация на едно копие целева ДНК, което определя високата чувствителност на метода.

Изследването на cccDNA, чрез PCR при диагностика на HBV е най-точния метод за оценяване на заразените хепатоцити, но също така изисква инвазивни процедури и не се прилага в рутинната диагностика. Количественото определяне на серумното ниво на HBV-ДНК осигурява алтернативно определяне на cccDNA. Определянето на вирусния товар трябва се осъществи, чрез много чувствителен PCR използвайки праймери, специфични за силно консервативни области на HBV генома, обикновено S-гена. Повечето анализи имат чувствителност 10-200 IU/ml и диапазон до 10^9 IU/ml. В голям брой лаборатории, както и при нас се използват създадени в лабораторията "in house" PCR, които показват забележителна чувствителност и възпроизводимост (38). Една от целите на настоящата работа е прилагането на Real-Time PCR за количествено определяне на HBV-DNA за диагностициране и мониторинг на пациенти с хроничен хепатит В.

1.3 Молекулярна диагностика на HBV инфекции чрез Real-time PCR

Въвеждането на молекулярни техники за HBV-ДНК намира приложение при диагностициране на инфекция, както и при наблюдение по време на лечението. HBV-ДНК се открива в серум преди биохимични данни за хепатит и при остро и хронично заболяване. Полимеразна верижна реакция (PCR) е разработена от Mullis и др. през 1987г. (39) и е аплификационна техника с широко приложение в областта на биологичните изследвания и клинична диагностика(40). През 1999 г. са описани първите доклади за приложението на Real-time PCR за количествено определене на HBV ДНК (41). Те описват метода като по-чувствителен, точен и възпроизводим отколкото съществуващите методи. Границата на откриване на тази метода е 10 копия в реакция с линеен обхват 10^1 - 10^8 копия/реакция. Коефициентът на вариация подчертава забележителната възпроизводимост на метода. Това определя Real-Time PCR като метод подходящ за стандартен лабораторен метод за количествено определяне на HBV ДНК.

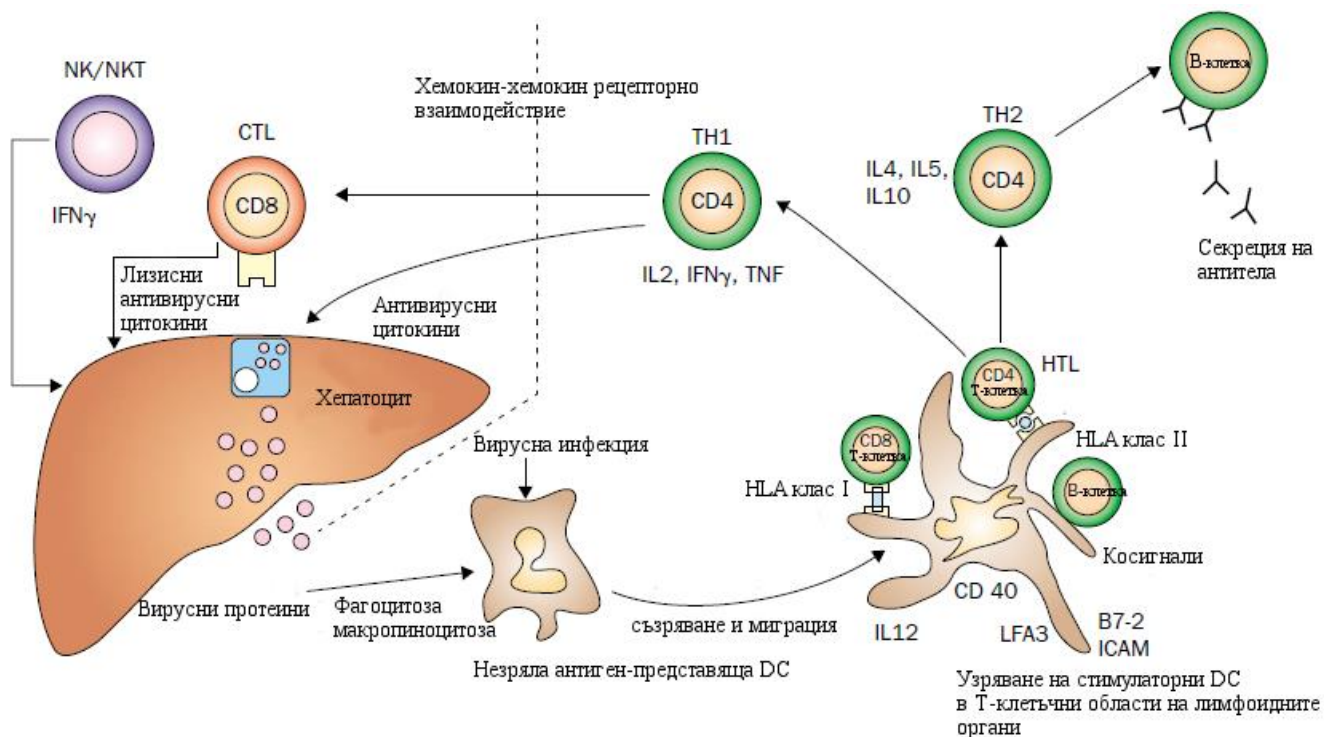
1.4 HBV генотип

HBV генотипите могат да се класифицират в осем генотипа от А до Н. Разликата между отделните генотипи се прави въз основа на относителния дял различия в нуклеотидната секвенция на вирусния геном - не по-малко от 8% (42). Има сведения за различия в терапевтичните отговори към нуклеоз(т)идни аналози и терапията с интерферон- α (IFN- α), в зависимост от генотипа на вируса (43). Освен това, при някои генотипи, като В и С, има по-голям риск от развитие на хепатоцелуларен карцином (44,45).

Географското разпределение на HBV генотипа показва, че генотип D е най-честия генотип в Средиземноморието, Индия, Близкия изток и Северна Америка (46) (Фиг.3). У нас първите данни за генотипа на вируса са публикувани през 2013г. от Доц. Павел Теохаров. Те показват наличие на генотип D в 41 (93%) от пациентите с остра и хронична форма на хепатит В и генотип А при 2 (5%) от пациентите с остра форма на инфекцията (2).

Пациентите, инфектирани с HBV генотип В (41%) са склонни да реагират по-добре на IFN- α терапия, отколкото заразените с генотип С (15%). Подобна разлика се наблюдава между лица, заразени с HBV генотип А (33%) в сравнение с генотип D (11%) (47). Съответно, процентът на HBeAg сероконверсия е по-висока сред пациенти, инфектирани с HBV генотип А и В, в сравнение с генотипове D и С. Въпреки това, за разлика от хепатит С, определянето на HBV генотипа не е рутинен клиничен процес (48).

Повечето цитотоксични Т-клетки са CD8⁺ и убиват инфектираните клетки, като предотвратяват вирусната репликация, разпознавайки преработения антиген, представен чрез МНС клас I молекули. Освен, че имат директно цитотоксично действие CD8⁺ Т клетки произвеждат и цитокини TNF- α и лимфотоксин. Друг продукт на CD8⁺ Т клетки е INF- γ , който спомага за антивирусната защита, чрез създаване на резистентни клетки към инфекцията. Хелперните Т-лимфоцити като цяло са CD4⁺ и разпознават преработения антиген представен, чрез МНС клас II молекули като могат да се разделят на две главни популации: Th1-секретитаци INF- γ , IL- 2 и Th 2-секретиращи IL-4,5,6 и подпомагащи В клетъчните отговори. Цитокините имат централна роля за поляризацията на имунния отговор, нужен за оптимална защита срещу определени инфекциозни агенти. Освобождането на IL -12 от APC стимулира производството на INF- γ от Th1-клетките. Този цитокин ефективно активира макрофагите, позволявайки им да убиват интрацелуларни организми. Продуцирането на цитокини от Th1-клетките улеснява клетъчно медирания имунитет, активира макрофагите и Т-клетъчно медираната цитотоксичност, докато Th2-клетките подпомагат продукцията на антитела от В-клетките. Хемокините са друга група от протеини, които имат много голяма роля в имунните отговори. Взаимодействието на хемокини с техните рецептори, експресирани от лимфоцитите, води до тяхната миграция към черния дроб.



Фиг. 4 Взаимовръзка между различни клетъчни системи при имуен отговор срещу HBV.

NK и NK-T клетките са основни клетки на вродения имунитет. DC клетките преработват вирусните протеини и мигрират към лимфоидните органи, където те представят вирусните пептиди в състава на HLA клас I и клас II молекули на CD8+ и CD4+ T-клетки респективно, полярирайки T-клетъчния отговор като Th1 или Th2. Th1 хелперните T-клетки секретират INF- γ или IL-2, които подпомагат макрофагите и цитотоксичните T лимфоцити, за да елиминират интрацелуларните патогени. Th2 хелперните T-клетки секретират интерлевкин 4,5,6, подпомагачи B клетъчните отговори. Хемокините синтезирани в черния дроб индуцират натрупването на лимфоцити в черния дроб, чрез хемокин-хемокин рецепторно взаимодействие. Вирус специфични CTL директно убиват инфектираните хепатоцити, чрез FAS-медирани и перфорин медиран механизми.

5.1 Вроден имуен отговор при HBV инфекция

Вроденият имунитет обикновено играе роля в началото на инфекцията за ограничаване разпространението на патогена и допринася за развитието на ефективен адаптивен имуен отговор. След инфектиране с HBV се смята, че хепатоцитите, които имат ниска експресия на

човешки левкоцитни антигени (HLA) клас I, освобождават IFN- α и IFN- β . Първоначално разпознаването на HBV се медира от Toll like рецептори (TLRs) (49). Производство на тип 1 интерферони се задейства пряко от вирусната репликация, чрез клетъчни механизми, които засичат присъствие на вирусната РНК или ДНК (50,51,52), докато NK клетки се активират от разпознаването на стрес-индуцирани молекули и/или от модулирането на част от class I молекулите на главния комплекс на тъканна съвместимост, експресирани по повърхността на заразените клетки (53).

5.1.1 Роля на NK клетките

NK клетките изпълняват важна имунорегулаторна функция в естествения имунен отговор и защитата на организма срещу вирусно инфектирани клетки (54, 55). Пациенти с NK-клетъчен дефицит и запазен адаптивен имунен отговор страдат от протрахирани вирусни инфекции, което ясно показва важната им роля в началните фази на вирусните инфекции (56).

Смята се, че има два механизма, чрез които циркулиращите NK разрушават клетките мишени: естествена цитотоксичност и антитяло-зависима клетъчно-медирана цитотоксичност (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity, ADCC). Първият се отключва от лиганд-рецепторно взаимодействие между активиращите рецептори на NK клетките и лиганди върху таргетната клетка. В резултат на това цитотоксичните клетки „изсипват” съдържимото от гранулите си (перфорин, гранзими и др.) върху атакуваната клетка. Това води до разрушаване на клетката мишена чрез апоптоза (57-60). За осъществяване на втория механизъм е необходимо взаимодействие между Fc γ III рецептор (CD16) от повърхността на NK клетките с антитяло от IgG клас. Тези антитела са специфично насочени и свързват антигени от прицелната клетка и изпълняват ролята на мост между нея и цитотоксичната клетка. Унищожаването на таргетната клетка се извършва посредством извънклетъчни механизми (61).

След активиране, освен цитотоксична активност NK клетките секретират и цитокини, участващи в регулацията на имунологичното възпаление и адаптивния имунен отговор (62). Това ги определя

като важен посредник между антиген-неспецифичната (вродената) и антиген-специфичната (придобитата) защита на организма. NK клетките не притежават имунологична памет (19) и не изискват генно пренареждане за диференциацията (63).

IFN- α/β медираат функцията на антиген-представящите клетки (APCs), в частност Купферови клетки (макрофаги, които се намират в черния дроб) и дендритни клетки (DC). Тези APC от своя страна произвеждат интерлевкин-18 (IL-18) и хемокина CCL3, който индуцира NK и NK-T клетъчната активност (Фиг. 4) (64). NK, NK-T и Купферови клетки играят роля в първичния отговор срещу HBV (65,66,67). В HBV трансгенни миши модели, NK-T клетки могат да инхибират директно HBV репликацията, чрез производството на IFN- γ (66, 67, 68). TNF- α и IFN- γ премахват HBV, чрез няколко механизма, включващи дестабилизация на вирусния капсид, чрез NF- κ B пътя, деградация на вирусния протеин, чрез азотен оксид, протеозомна активност и пост-транскриптно разграждане на HBV-RNA (69,70). Потискане на HBV се открива дори и при T-клетъчно дефицитни мишки, което предполага, че производството на IFN- γ не зависи от самата активация на CD4 + и CD8 + T клетки (68). Последните резултати показват, че NK-T клетки могат директно да се активират при инжектиране в мишки, експресиращи HBV антигени в черния дроб (71). По този начин, NK и NK-T клетки биха могли да бъдат потенциално задействани по-време на HBV инфекция, поради проявата на стресови сигнали по повърхността на инфектирани хепатоцити или дендритни клетки в черния дроб (72). Това може да се постигне и чрез директно разпознаване на вирусни компоненти (71). Изследване с остро инфектирани шимпанзета предоставя най-силното доказателство за ролята на NK и NK-T клетките в първоначалния контрол при HBV репликация. При шимпанзета елиминиращи инфекцията ограничаване на вирусната репликация се наблюдава при производството на интрахепатален IFN- γ , преди масовото натрупване на T клетки (73).

Ниските нива на HBV не изглеждат да са определящ фактор за активирането на вродения имунитет, тъй като хронично болните имат широки граници на HBV-ДНК. Вероятно кинетиката на вирусната репликация в рамките на заразените хепатоцити може пряко да повлияе активирането на NK клетките и последващо индуциране на ефективен T-клетъчен отговор (74). Разликите в адаптивния имуен отговор при хронично болните пациенти и тези в етап на

излекуване са свързани с имунологични събития, настъпващи по време на началната фаза на HBV репликация.

Възможно е активирането на NK и NK-T клетките да предхожда експресията на HLA клас I молекули по повърхността на хепатоцитите. Увеличената експресия на HLA клас I е решаваща за разпознаване и представяне на чужди антигени от T-клетките при адаптивния имуен отговор (75). Купферовите клетки играят важна роля не само в ранния вроден имуен отговор, но и в адаптивния. Активирането на купферови клетки при ко-инфекция с малария, може да доведе до високи нива на цитокини, които ефективно да контролират и елиминират вируса (76).

При анализ на левкоцитните популации, при пациенти в инкубационната фаза на хепатит B, се установява, че броя на циркулиращите NK клетки се увеличава в пика на HBV репликация. HBV специфични CD8 T клетки се появяват по-късно (2-4 седмица), когато вирусната репликация е понижена (77). Неонатално заразените североамерикански мърмоти развиват хроничност, поради липса на достатъчно количество IFN- γ и TNF- α и липса на специфичен ефективен антивирусен отговор, който се наблюдава при животни елиминиращи вируса (78,79,80).

Експерименталните данни, събрани главно от животински модели, но и при хора (81) показват, че след заразяването, HBV не започва веднага да се реплицира успешно. Вирусна ДНК-а и антигени не се установяват в серума или черния дроб 4-7 седмици след инфекцията (82, 83, 81, 73, 84). След този период HBV започва логаритмична нарастваща фаза на репликация и може да бъде открит в черния дроб и в серума с количество от 10^9 – 10^{10} копия/ml (85) като инфектира най-много хепатоцити (86, 87, 73, 88). Началната фаза на забавяне на HBV репликация вероятно е в следствие на HBV инхибиране от елементи на вродения и адаптивен имунитет.

Друга характеристика на HBV по отношение на ранните защитни механизми на гостоприемника се състои в липсата на продукция на IFN- α и β . HBV репликацията може ефективно да се ограничава от IFN- α и β . (89, 90), но данни при остро инфектирани шимпанзета показват, че такива антивирусни цитокини не се произвеждат по време на HBV репликация (91). Вирусът може да е развил стратегии за преодоляване на първоначалните механизми на антивирусна защита, активирайки Toll-like рецептори.

Предполага се, че заради репликацията на HBV в нуклеокапсидни частици, вирусни репликационни междинни съединения с едноверижна РНК или вирусна ДНК (силни активатори на интерферон тип I гени) (92, 93) са защитени от клетъчното разпознаване (90). Хепатита, след HBV инфекция протича по-леко при шимпанзета в сравнение с хората и е вероятно тази неспособност да се открие активация на гените, свързани с вродения имунитет, да отразява лекото протичане на болестта. Интересно е да се отбележи, че липсата на ранни симптоми при HBV инфектирани пациенти, като повишена температура и общо неразположение, които са характерни за други вирусни инфекции при човека, представлява косвено доказателство за дефектен тип производство на тип I IFN по време на ранните етапи на HBV инфекцията.

5.1.2 NK клетъчни рецептори от тип I интегрални протеини с имуноглобулин-подобни домейни

KIRs са тип I трансмембранни гликопротеини с основна функция: регулация на цитотоксичната активност на експресиращите ги клетки (95,96). Механизмът на тази регулация зависи от разпознаването на HLA клас I антигените. KIRs се обозначават съобразно структурната характеристика на кодираните протеини, която съответства на функцията им. Съставени са от извънклетъчна част с домейни, подобни на C2 константната област на имуноглобулините, свързващ участък, трансмембранен домейн и цитоплазмена опашка (96). Класифицират се в 4 големи генни субгрупи в зависимост от: 1) броя на извънклетъчните Ig домейни (2D, 3D) 2) дължината на цитоплазмената опашка (L-long, S-short) и 3) наличието на секвенционна хомоложност между членовете на всяка генна субфамилия, съответно обозначени като *KIR2DS*, *KIR3DS*, *KIR2DL* и *KIR3DL* (97, 98). Всяко едно KIR семейство се състои от 1 до 5 рецептора, различаващи се по 1 до 9 нуклеотида и проявяващи различна степен на алелен полиморфизъм (97, 99).

KIRs са съставени от два (2D) или три (3D) екстрацелуларни Ig-подобни домейна (100). Дължината на интрацитоплазмената част определя функцията на съответния рецептор. Съществуват две функционално различни групи KIRs: инхибиторни (iKIRs) и активиращи (aKIRs)

(табл. 1). Наличието на дълга цитоплазмена „опашка” (L) с един или два инхибиторни тирозин-базирани мотиви (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM), които се свързват с *src* хомоложна тирозин съдържаща фосфатаза (SHPs), позволява трансдукция на инхибиращи сигнали и определя инхибиторната им функция по отношение на клетъчната цитотоксичност. Рецепторите с къса цитоплазмена „опашка” (S) не притежават ITIM, а позитивно зареден аминокиселинен остатък - лизин в трансмембрания домейн, чрез който се свързват с активиращи адапторни протеини като DAP12, който ги определя като активационни рецептори (48). Последните проучвания показват, че един от KIRs с дълга цитоплазмена част, съдържаща ITIM мотив - KIR2DL4, на базата на което е причислен към групата на инхибиторните рецептори, се свързва с активиращ мотив на FcεRIγ и изглежда провежда и активационни сигнали (101-103).

Неотдавна бяха публикувани варианти на почти всички открити и означени според възприетата номенклатура KIR гени (97, 104).

Лиганди за повечето KIRs са специфични мотиви на HLA клас I молекулите, експресирани от почти всички клетки на организма.

KIRs, специфични за HLA-C. HLA-C молекулите са специфични лиганди за инхибиторните рецептори с два имуноглобулинови домейна (KIR2D/p58). Те са основните клас I молекули, влияещи върху инхибирането и активирането на NK клетките. Разпознаването на HLA-C е рестриктирано от два епитопа в молекулата им, определени от диморфизъм на позиции 77 и 80 в α1 спиралата на тежката верига на MHC клас I. Група 1 (C1) включва алелите със серин и аспаргин (Ser77 и Asn80), а група 2 (C2) алелите с аспаргин и лизин (Asn77 и Lys80) на посочените позиции (105). Група 1 епитопа се свързват специфично от инхибиторните KIR2DL2/3, докато C2 са лиганди за инхибиращия KIR2DL1 (106, 107). Някои данни от *in vitro* изследвания през последните години допускат, че KIR2DL2/2DL3 може да свързват допълнително и някои HLA-C2 епитопа (Cw*05:01; Cw*02:02), както и някои молекули от HLA-B локуса (HLA-B*46:01; B*73:01), но с много нисък афинитет (108). Съществува йерархия в силата на инхибиторния сигнал, проведен при свързване на KIRs със съответните им HLA-C лиганди: KIR2DL1-C2 > KIR2DL2/3-C1 (108-110). Активиращите рецептори KIR2DS1, 2DS2 (p50) споделят общи секвенции в екстрацелуларните си домейни със съответните им инхибиторни аналози (KIR2DL1, 2DL2/2DL3), поради което се предполага, че те използват същите HLA лигандни

специфичности, но ги свързват с по-нисък афинитет (111-115). Установено е например, че KIR2DS1 се асоциира слабо с HLA-C2 алотипи (112), което вероятно има функционално значение и медира активиране на NK клетките (113-115), докато KIR2DS2 взаимодейства слабо с HLA-C1 епитопи (113).

KIRs, специфични за HLA-B. HLA-B алотипи с Bw4 мотив на позиция 77-83 са лиганди за инхибиращия KIR3DL1 (p70) (116,117). Афинитетът на свързване е по-силен, когато HLA-Bw4 алелите имат изолевцин на 80-та позиция (Le80) в сравнение с тези, при които на същата позиция е аминокиселината треонин (Thr80) (116, 118). Според най-новите проучвания KIR3DL1 разпознава HLA-Bw4 алели с изключение на HLA-B*13:01 и *13:02, както и някои HLA-A алели с Bw4 мотиви (119,120). Например, KIR3DL1*005 алелът разпознава като лиганд HLA-A*24:02 (120). Допълнително Foley и сътр. (119) доказват, че инхибиращата сила е по-голяма при асоциация на KIR3DL1 с Bw4 епитопите на HLA-B молекулата в сравнение с тази на HLA-A. Противоположно на тези данни Gumpertz и сътр. (117) не намират връзка между силата на проведения сигнал и аминокиселинния остатък на позиция 80, а Stern и сътр. (121) доказват, че един HLA-A^{Bw4} (A*25:01) алотип не е лиганд за KIR3DL1. До момента не съществуват данни, че HLA-Bw6 алели могат да бъдат лиганди за KIRs (118). Подобно на KIR2DS1 и KIR2DS2 и инхибиторните им аналози, активираният KIR3DS1(p70cut) споделя >95% хомоложност с KIR3DL1 в екстрацелуларния домейн, което дава основание да се предположи, че те са алели на един ген (122). Независимо, че все още няма директни доказателства за свързване на KIR3DS1 с Bw4 алотипи, генетико-епидемиологични, функционални и популационно-генетични данни убедително подкрепят подобни взаимодействия (123-126).

KIRs, специфични за HLA-A В допълнение на споменатата рецепторно-лигандна двойка - KIR3DL1/HLA-A^{Bw4}, някои HLA-A алели (HLA-A3, -A11) се свързват специфично с друг представител на KIR3D рецепторите - KIR3DL2 (p70/p140) (127,128).

Лигандите за KIR2DL5, 2DS5, 2DS3 и 3DL3 все още не са идентифицирани.

Известно е, че полиморфизми в KIRs на алелно ниво влияят върху разпознаването на HLA молекулите и обратно алелни полиморфизми в HLA епитопите повлияват тяхното свързване със специфичните им рецептори. Например KIR3DL1*002 е по-силен инхибиторен рецептор за Bw4

лигандите от KIR3DL1*007 (129). Свързването на KIR3DL1 с В*51:01 води до генериране на по-силен инхибиторен сигнал, последван от този чрез В*38:01 и В*58:01, докато съединяването с В*27:05 генерира съвсем слаб инхибиторен сигнал (130). Известно е, че пет HLA-B27 алела (всички с Вw4^{Thr80}) - В*27:01, *27:03, *27:04, *27:05 и *27:06 са инхибиторни лиганди за НК клетъчната функция, но свързването на KIR3DL1 с HLA-B27 алел с изолевцин на 80^{-та} позиция (В*27:02) няма роля в регулацията на цитотоксичната им активност (131). HLA-B*07:02 е много по-силен лиганд за KIR3DL1*002 съпоставено с KIR3DL1*001, а обратното е вярно за В*58:01 (130).

KIRs, разположени на хромозома 19q13.4 и HLA, на хромозома 6p21.3 са силно полиморфни генни системи и се унаследяват независимо, което допълнително допринася за голямото разнообразие по отношение на броя и вида KIR/HLA двойките при отделните индивиди. НК клетъчното рецепторно-лигандно разпознаване може да варира на много нива: KIR алелен полиморфизъм, KIR хаплотип, HLA-B и C полиморфизъм и различия в клоналната генна експресия.

5.2. Адаптивен имунен отговор

Адаптивният имунен отговор обхваща комплексна мрежа от ефекторни клетки, които играят ключова роля за развитието на HBV имунитета. Хелперните CD4⁺ Т клетки, произвеждат цитокини и са нужни за ефективното развитие на CD8⁺ Т клетки и производство на антитела от В лимфоцитите. Т клетъчни отговори, които ефикасно повлияват *ин vivo* на антивирусната функция все още не са охарактеризирани при HBV инфекция. Концепцията, че силната имуногенност е свързана с по-добри защитни показатели при животински модели показва, че имунодоминантността не осигурява адекватната защита (132). Въпреки, че клетъчния имунен отговор е основен фактор за елиминиране на вируса, хуморалните отговори също играят роля в контролирането на HBV. Активирането на клетъчния и хуморалния имунитет при адаптивния имунен отговор позволяват на гостоприемника да контролира инфекцията. Различните

компоненти са така взаимосвързани, че провалът на един от тях се отразява на ефективността на другите. Липсата на CD4+ Т хелперни клетки понижава CD8+ Т клетъчната активност и антитяло производството (133). Слабите CD8 Т-клетъчни отговори водят до високи нива на циркулиращия вирус и невъзможност за елиминиране на вируса от антителата (134).

Регулаторни Т клетки (CD25+CD4+) също участват в инхибиране на провъзпалителни отговори с цел да се намали вредата от имунната модулация (135). Спорен е въпроса за увеличаване или намаляване на CD25+CD4 +Т клетки в периферната кръв при HBV хронична инфекция в сравнение с незаразени здрави контроли (136, 137). В инвитро тестове изчерпване на регулаторни Т клетки водят до увеличено производството на цитокини, дори това да не е HBV специфично. Въпреки, че ролята на регулаторните Т клетки в изчерпването на HBV специфични Т клетки не е голяма, те могат да бъдат важни при определяне степента на увредата на черния дроб. Това се установява и при хронични HCV инфекции, където увеличението на регулаторните Т клетки е свързано с намаляване на степента на чернодробното увреждане (138).

5.2.1. Вирус специфични CD4 + и CD8 + Т клетъчни отговори

Силен HLA клас II рестриктивен CD4+ Т хелперно клетъчен отговор към множество епитопи на HBV нуклеокапсидните антигени се наблюдава в периферната кръв на всички пациенти със самоограничаващ се остър хепатит. Точното начало на специфичните клетъчни имунни отговори при хората не е установено, но е вероятно в рамките на седмици от инфектирането.

При остра HBV инфекция, HBV-специфични CD4 +Т клетки могат да се открият в момента на повишена HBV (139). CD4 + Т клетки са намерени също срещу други HBV генни продукти като вирусна полимераза и протеини на обвивката (140,141). Въпреки това, общите отговори на CD4+ Т-клетки (измерени чрез пролиферацията или производството на антивирусни цитокини) са често срещани срещу core протеина (ядрения протеин), отколкото към други HBV протеини (139,141,142). Имунодоминантните ядрени епитопи могат да стимулират хелперните Т-клетки в

90% от пациентите, независимо от техния HLA-клас II профил (143). Наблюдава се увеличение на core специфични CD4+ отговори по време на обостряне на хроничен хепатит В, което предхожда HBeAg сероконверсия, показател за намалено ниво на вирусната репликация (144,145).

При остра инфекция HBV специфичния CD8+ Т клетъчен отговор е поликлонален и мултиспецифичен към повечето HBV протеини, което означава, че съществуват няколко рецептора за всеки епитоп и различни епитопи се разпознават от една CD8+ Т клетка. Тези два фактора увеличават разпознаването на целевия епитоп и намалят вирусното изплъзване чрез мутация. Следователно присъствието на функционални HBV специфични CD8+ Т клетки, поддържани от Th1 CD4+ Т клетки и IL-12 са по-значими от тяхното количество (146). HBV специфични CD8+ Т клетки са били проучени в HLA-A2-позитивни индивиди. Установено е увеличена честота на CD8+ Т клетъчни отговори срещу епитопи на обвивката на вируса (s183–191, s250–258, s335–343) и вирусната полимераза (p455–463, p575–583) епитопи (147). Тези отговори се откриват в черния дроб по време на остър хепатит и остават във високи нива три месеца след възстановяване (148).

Зрелите CD8+ Т клетки са основните ефекторни клетки, които се включват при HBV клирънс. Изчерпването на CD8+ Т клетки след остра HBV инфекция при шимпанзета води до запазване на HBV инфекцията и показва важността, както на цитолитичното, така и на нецитолитичното действие на HBV специфичните CD8+ Т клетки (149). Не всички индивиди, които се възстановяват от остра HBV инфекция имат повишени нива на ALT или клинични симптоми, което предполага, че нелинични механизми като тези, индуцирани от IFN- γ и TNF- α водят до изчистване на острата HBV инфекция (150). IFN- γ се произвежда основно от HBV специфичните CD8+ Т-клетки, както и от NK, NKT клетки и HBV-специфични Th1 CD4+ Т cells.(151).

При хронична инфекция HLA клас II рестриктивен Т клетъчен отговор към вирусни антигени (HbcAg и HbeAg) е по-слаб в сравнение с отговора при остър хепатит. Нуклеокапсидния Т клетъчен отговор се усилва по време на изостряне на болестта и предхожда увеличаването на HBV ДНК и HBeAg. Последните спадат, когато болестната активност стихне.

Има ясни различия в адаптивния имунитет при пациенти с установена хронична HBV инфекция и при пациенти елиминиращи вируса. HBV специфични CD4 и CD8 Т-клетъчни отговори с Th1 профил на продуциране на цитокини се откриват в кръвта на индивиди с благоприятен изход. Тези хелперни и цитотоксични вирус специфични Т клетъчни отговори са количествено по-силни от отговорите установени при пациенти с хронични инфекции (152, 153, 154,155,156, 157). Трудно е да се каже, дали причините за различните изходи от HBV инфекция се дължат на силата и обхвата на HBV специфичните Т клетъчни отговори.

Експерименти при шимпанзета с отстранени CD8+ Т клетки, инфектирани с HBV инфекция подкрепят схващането, че CD8+ Т клетки са основната клетъчна подгрупа, отговорна за изчистване на вируса (158). Допълнителни експерименти с HBV пациенти и североамерикански мармоти подчертават значението на координираните хелперни и цитотоксични Т клетъчни отговори при остър хепатит. При североамерикански мармоти ограниченото ранно развитие на вирус специфични Т клетъчни отговори се свързва с постоянство на вируса (80). При пациенти, изследвани по време на инкубационната фаза при остра HBV инфекция, увеличаването броя на вирус специфични IFN- γ CD8+ и CD4 Т клетки предхожда пълното елиминиране на вируса и се установява само при пациенти, при които инфекцията е овладяна (77). Друг вариант е цитотоксичните Т клетки да са насочени към HBV региони, податливи на вирусни мутации, които да могат да избегнат CTL разпознаване. Допълнително косвено доказателство, че CD4 и CD8 Т клетъчните отговори са свързани с имунологичния контрол на HBV е представено, чрез връзката на специфични HLA-клас I и клас II генетични профили с изхода от инфекцията (159,160).

Хуморалният отговор също е от решаващо значение за дълготрайно изчистване на HBV и защита от инфекция. При пациенти, които се възстановяват от остра HBV инфекция, активираните CD4 + Th2 хелперни клетки индуцират производството на HBsAb, HBcAb и HBeAb от В клетките. HBsAb осигуряват защитен имунитет срещу последващи HBV инфекции и при ваксинирани лица. Общо прието е, че анти-HBcAb нямат вирус-неутрализираща активност (161).

При индивиди с хронична HBV инфекция, HBV специфичните CD4+ и CD8+ Т клетъчни отговори са с намалена активност (162,163). При HBeAg позитивни хронични носители,

специфични CD8 + Т клетки срещу ядрения епитоп (в област с18-27) са почти неоткриваеми и с намалена способност да произвеждат IFN- γ . Този голям инфилтрат от CD8 + Т клетки се наблюдава и при остро инфектирани индивиди с повишен ALT (164). Установяват се силни CD4+ Т клетъчни отговори при хронична HBV инфекция (165). Този силен Т клетъчен отговор може да бъде следствие на нарушена функция на HBV-инфектирани DC, които продуцират ниски нива на IFN- γ , TNF- α и IL-12 (166). Друг механизъм може да бъде увеличаване на експресия на PD-1 във вирус-специфичните Т клетки. Последните разработки при HIV-1 инфекция показат, че експресията на PD-1 от CD 4+ и CD 8+ Т клетки е свързана с потискане на ефективната антивирусна Т клетъчна функция (167). Свързването на PD-1 към неговите лиганди води до възстановяване на вирус-специфични функционални Т клетки (168,169). При индивиди, които изчисляват остра HBV инфекция експресията на PD-1 намалява с едновременното увеличение на CD127 - маркер на ефекторните CD8+ Т клетки (170).

Стойността на НК клетките е повишена при хора, които са в имунно-толерантна фаза на хроничната инфекция (висок HBV вирусен товар, но нормална ALT), за разлика от тези, които са във фаза на имунен клирънс (високи нива ALT). Това предполага, че присъстват НК клетки с понижена активност срещу HBV (164). Слабите вродени имунни отговори при HBV са предпоставка за хронифицирането на инфекцията и понижената ефективност на адаптивния имунен отговор.

VI. Роля на генетичните фактори на гостоприемника при HBV инфекция

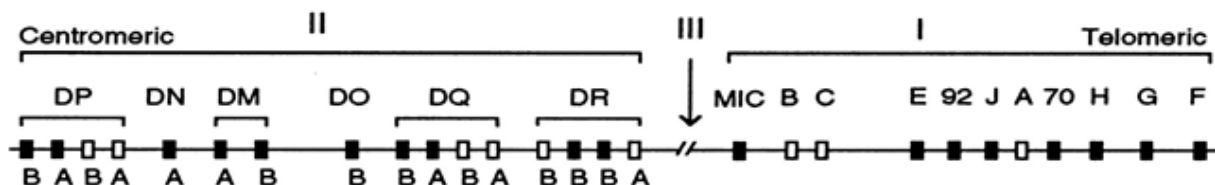
6.1 HLA структура и генетична организация

Човешкият главен комплекс на тъканната съвместимост е разположен върху късото рамо на хромозома 6 в дисталната част на бp21.3 ивицата и обхваща приблизително 4000 kb от ДНК (Фиг. 5). В зависимост от функцията на кодираните от тях молекули се разделя на три области - клас I,

клас II и клас III. МНС клас I и клас II областите кодират силно полиморфни мембранны гликопротеини, които участват в антигенното представяне на Т лимфоцитите, а следователно и в индуцирането на имунния отговор. Клас III областта съдържа гени, част от които кодират белтъци с важни имунологични функции, като някои компоненти от системата на комплемента, цитокини и белтъци на топлинния шок.

HLA клас I областта е разположена телометрично и съдържа 6 експресиращи се гени: 3 класически HLA клас I гени (HLA-A, -B и -C), кодиращи α веригата на класическите клас I молекули и 3 некласически клас I гени (HLA-E, -G и -F), кодиращи тежките вериги на некласическите клас I молекули. Клас II областта (HLA-D) се разделя на шест подобласти: DP, DQ, DR, DO, DN и DM, всяка от които съдържа поне една двойка гени – A и B, кодиращи α и β веригите на клас II молекулите. При DR веригите повечето от полиморфните участъци са разположени върху β веригата (171).

Human (HLA)



Фиг.5 Генетична организация на главния комплекс на тъканна съвместимост.

HLA клас I и клас II молекулите са трансмембранны гликопротеини, състоящи се от две нековалентно свързани вериги.

Свързването на пептиди към HLA клас I и клас II молекулите е необходимо условие за оформянето на пространствената структура, стабилизирането и повърхностно-клетъчната

експресия на молекулите. Експресираните върху клетъчната повърхност комплекси HLA/антигенен пептид се разпознават от Т клетките посредством Т клетъчния рецептор (T cell receptor – TCR). Комплексите HLA клас I/пептид взаимодействат с TCR на CD8+ Т лимфоцити, докато комплексите HLA клас II/пептид взаимодействат с TCR на CD4+ Т лимфоцити. Кристалографските структури на тримолекулните комплекси TCR/МНС/пептид показват, че и шестте области, определящи комплементарността (CDR – complementarity determining regions) на TCR, контактуват с повърхността на свързаната с пептида МНС молекула.

6.2. HLA алелите и хаплотипи при HBV

След остра хепатит В вирусна инфекция, клирънса или вирусното персистиране се определя от части от големината и силата на имунния отговор на гостоприемника. Тъй като системата на човешкия левкоцитен антиген (HLA) е основна част от имунния отговор предполагаме, че високо полиморфните HLA гени са ключови детерминанти за вирусния клирънс.

Възстановяването или хронифицирането след остра HBV инфекция е резултат от сложни взаимодействия между имунната система на гостоприемника, вирусни фактори (мутации, генотип), както и фактори на околната среда. Генетичните фактори на гостоприемника са разглеждат като основни фактори за различното протичане на инфекцията. Главният комплекс на тъканна съвместимост (Major Histocompatibility Complex-МНС) играе ключова роля в антиген специфичния имуен отговор и кодира силно полиморфни HLA молекули (172). Тези молекули са основни при подбора и създаването на специфичен Т клетъчен репертоар и активацията на Т клетките в началния етап на имунния отговор (173). В регулацията на имунния отговор участват HLA-клас I молекули, които представят антигени на CD8+ цитотоксични Т клетки, разпознаващи инфектираните хепатоцити и HLA- клас II молекули, които представят антигените на CD4+ хелперните Т клетки. HLA клас I и клас II рестриктираните Т клетъчни отговори към вируса са силни, поликлонални и мултиспецифични при пациентите с остра инфекция, които успешно елиминират вируса. Тези отговори, обаче са относително слаби и с по-ограничена специфичност при болните с хронична инфекция, което е основна причина за персистиране на вируса по време

на HBV инфекцията. Тези находки могат да се обяснят с възможността дадени HLA алотипи да представят с различна ефективност вирусните епитопи на Т клетките в сравнение с други алотипи. Съществуват силни доказателства, че генетичните фактори на гостоприемника играят важна роля за изхода от инфекцията. Проучванията са съсредоточени главно в изследване на асоциациите на определени HLA- клас I и II алели с вирусното персистиране при хронична инфекция или клирънс на вируса. Поради ключовата роля на тези молекули в антигенното представяне през последното десетилетие редица проучвания са насочени към изследване на полиморфизма на HLA, което би разкрило причините за различния ход на инфекцията.

Проучванията в тази насока са многобройни и са осъществени за различни популации. Рядко определен HLA локус, алел или хаплотип се приема за протективен или рисков фактор във всички етнически групи. В тайванско проучване HLA- A*02:06 се асоциира с вирусно персистиране, докато HLA – B*4001 се асоциира с елиминиране на вируса (173). В американско проучване за кавказката раса, хаплотипите HLA - A*01- B*08 -DRB1*03, B *44-Cw *1601, и B *44-Cw *0501 се свързват с вирусно постоянство, като HLA - A *0301 е свързан с вирусния клирънс. За европейско-кавказко население HLA - B*08, HLA- DRB1*15 се свързват с липсата на отговор при HBV ваксинация (11). Karan и др.(174) в проучване на турската популация установяват, че HLA-A 24 и Cw1 са протективни алели при хепатит В инфекцията. Singh и др. (173) обобщават достъпните данни от голям брой проучвания и популационно-специфични асоциации на определени HLA алели с клирънса и вирусното постоянство.

Тези наблюдавани HLA алелни асоциации са противоречиви и предлагат влиянието на други гени относно ефективността на тези алели за изхода от заболяването. Открити са определени асоциации, които са общи за повечето популации. Така HLA-DR13 е свързан с HBV клирънс с изключение на едно проучване в Турция (174), докато HLA-DRB1*11/*12 алелите и DQB1*0301 са асоциирани с персистиране на вируса. Предполага се, че протективната роля на HLA-DR13 се дължи на ефективно антигенно представяне от DR13 молекули. На Табл.1 и 2 са представени установените протективни и предразполагащи алели за хронична HBV инфекция.

Табл. 1 HLA клас I и клас II предразполагащи алели за хроничност при HBV в световната популация.

МНС клас. I/II алели	Популация/етнически генетичен фон/страна и случай	Референция
A*0206	Китай (Тайвански Аборигени)	(174)
A*2	Япония	(176)
A*3	Казакстан	(177)
A*33	Китай	(178)
B*13	Турция	(174)
B*18	Русия, Казакстан	(177)
B*35	Китай, Русия	(174,175)
B*08	Сенегал	(174, 179,180)
	USA(кавказоидна популация), Турция	
B*27	Иран	(181)
B*40	Русия	(180)
B*44	USA(кавказоидна популация)	(180)
DRB1*03	Китай, USA (кавказоидна популация)	(180,182)
DRB1*07	Турция	(174)
DRB1*08	Китай	(183)
DRB1*11	Индия	(184)
DRB1*12	Китай	(185)
DRB1*13	Турция	(174)
DRB1*15	Индия	(184)
DRB1*16	Китай	(183)
DQB1*03	USA(кавказоидна популация)	(186,174)
	Турция	

Табл. 2 HLA клас I и клас II алели асоциирани с клирънс на HBV в световната популация.

МНС клас I/II алели	Популация/етнически генетичен фон/страна и случай	Референция
A*02	Русия	(177)
A*03	USA(кавказоидна популация),	(180)
A 11	Казакстан	(177)
A 24	Турция	(174)
B 61	Китай	(186)
DRB1*04	Китай,	(175)
	USA (кавказоидна популация)	(180)
DRB1*11	Китай	(182)
DRB1*12	Китай	(188)
DRB1*1301/1302	Китай, Корея, Индия, Гамбия, Германия, Япония USA (кавказоидна популация)	(189,190,184,191, 192,193,194)
DRB1*11	Китай	(182)
DRB1*12	Китай	(183)

6.3 Геномна организация и еволюция на KIR гените

KIR гените заемат 100-200 Kb регион от LCR комплекса, в който се разполагат и други членове на имуноглобулиновото семейство (195,196). Кодират се от семейство гени разположени върху дългото рамо на хромозома 19 (19q13.4) (168-170,195,197).

Понастоящем KIR генното семейство включва 15 гена (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*) и два псевдогена (*KIR2DP1* и *KIR3DP1*), които не кодират функционални

рецептори (97). Все още не е ясно дали някои от първоначално установените KIR гени не представляват алели на един и същ ген. Някои автори интерпретират като доказателство за отделни гени наличието на значима положителна равновесна връзка (linkage disequilibrium, LD), а отрицателната такава тълкуват като показваща алелни отношения (198-200). Силна негативна LD е установена за няколко двойки KIR гени (*2DL2* и *2DL3*, *3DS1* и *3DL1*, *2DS3* и *2DS5*, *2DS1* и *2DS4*), но до момента само *3DS1* и *3DL1* са приети за алели на един ген (44). От друга страна позитивната LD, най-ясно изразена за двойката *2DS2* и *2DL2*, индиректно показва, че тези гени са разположени близо един до друг в хромозомата и се унаследяват като едно цяло в „блок“/хаплотипи. Различията в LD на експресираните и неекспресираните варианти на *KIR2DL5* установени от Hsu и сътр. (199), промениха общоприетото до тогава схващане, че двата варианта (*2DL5A* и *2DL5B*) са алели на един и същ ген. В последствие Gassner и сътр. (201) демонстрират, че експресираните и неекспресираните алотипи заемат различни места в хаплотипа, а Gomez-Lozano (202) доказва съществуването на два *KIR2DL5* гена: *KIR2DL5A* и *KIR2DL5B*. Поради силно изразената хомоложност между тях се допуска, че те са се формирали в резултат на неотдавнашна генна дупликация.

KIR гените и псевдогените са подредени по строго определен начин в човешкия геном и най-общо формират два хаплотипа - А и В (99). Някои от тях са представени и в двата хаплотипа (*KIR3DL2* в теломерния край, *KIR2DL4* и *KIR3DP1* в средата и *KIR3DL3* в центромерния край) (197). Между тях са разположени и останалите, които не са задължителни за всички хаплотипи. Секвенции с големина около 2,4 kb разделят отделните гени с изключение на региона между псевдогена *3DP1* и *2DL4* гена, който е приблизително 14 kb. Силно изразената хомоложност между гените, както и между късите интергенни региони, е предпоставка за възникване на асиметрични рекомбинации между KIR хаплотипите, водещо до значителни вариации в хаплотипите (146). Наскоро описаните хаплотипи, в които може да има повече от едно копие от определен KIR локус (201-204) и полиморфизмите в отделните гени допълнително допринасят за голямото разнообразие на тези рецептори. Всеки KIR ген има между тринадесет (*KIR2DS3*) и 102 (*KIR3DL3*) алели (97). Понастоящем са описани 398 различни генотипа в повече от 10243 индивида от 97 популации (205).

Поддържането на такова голямо разнообразие вероятно е резултат от необходимостта имунната система да реагира адекватно на непрекъснато променящата се заобикаляща среда.

6.4 KIR алели и хаплотипи

Днес са открити 606 KIR алела (*KIR2DL1* - 43, *KIR2DL2* - 27, *KIR2DL3* - 32, *KIR2DL4* - 47, *KIR2DL5* - 40, *KIR2DS1* - 16, *KIR2DS2* - 22, *KIR2DS3* - 13, *KIR2DS4* - 32, *KIR2DS5* - 16, *KIR3DL1* - 87, *KIR3DL2* - 84, *KIR3DL3* - 102, *KIR2DP1* - 22 и *KIR3DP1* - 23) (97). Този значителен полиморфизъм създава необходимост от въвеждане на специфична номенклатура за обозначаване на KIR алелите. През май 2002 година по време на дискусия на Номенклатурния комитет за факторите на HLA системата към Световната здравна организация (СЗО) в Канада (WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System meeting) е създаден KIR номенклатурен комитет (104). Съгласно приетата номенклатура (фиг. 6) с трицифрен код се изписват KIR алелни варианти, които се различават по секвенцията на кодираните от тях белтъци. Следващите два знака са въведени за означаване на алели, характеризиращи се със синонимни замени в кодиращите региони, а последните две цифри са за обозначаване на алелни варианти, различията между които са в интроните, промотора или други некодиращи последователности. Допълнително след KIR гена се поставя звездичка като разделител между него и цифровото обозначение на алелния вариант.

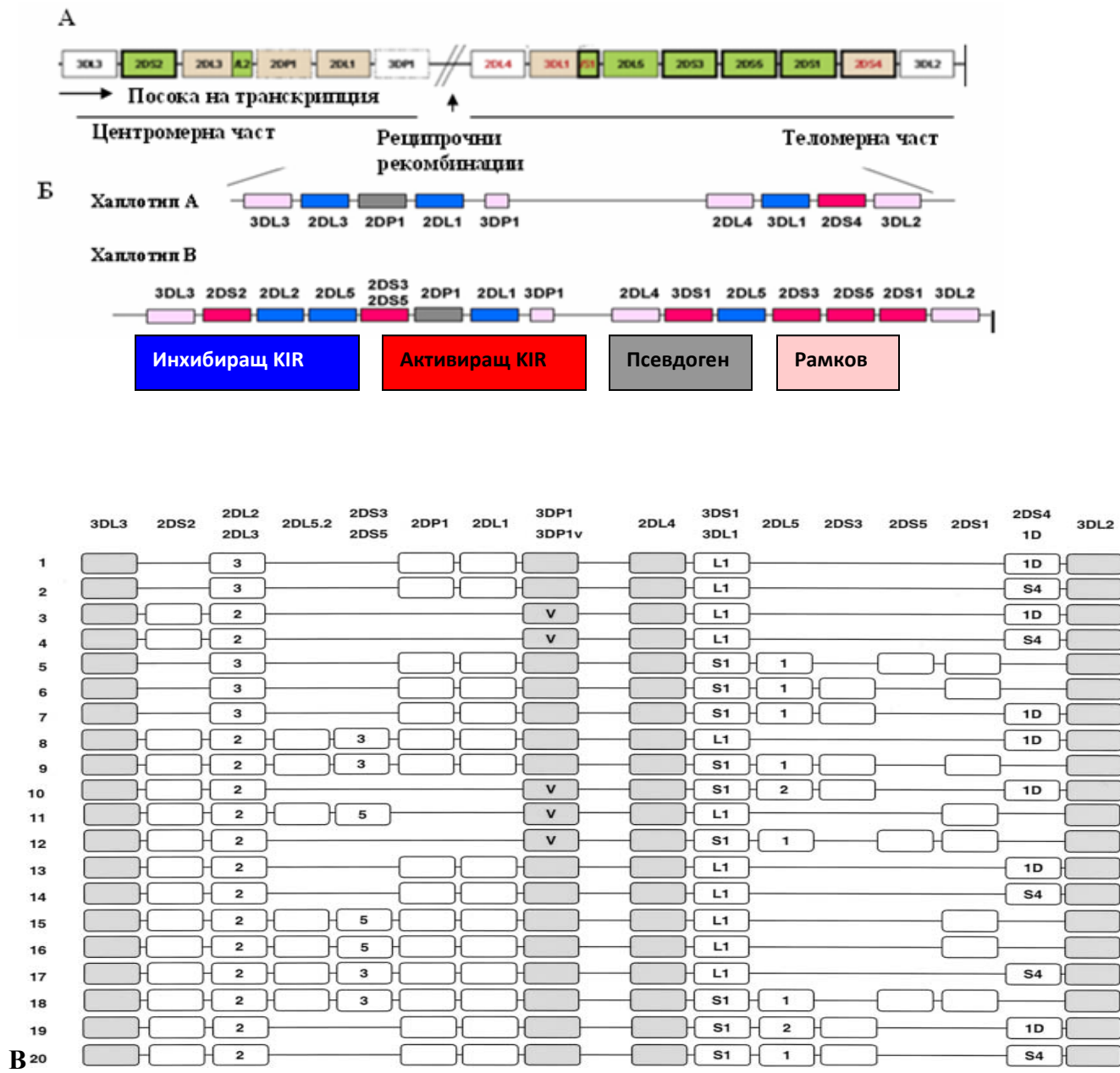


Фиг. 6 Номенклатура на KIR алели. Схематично представяне на буквените и знакови означения. Адаптирана по <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir> (97).

Съгласно стандартната номенклатура на гените, KIR гените и техните алелни варианти се изписват с „italic” шрифт (*KIR2DL1*). Означаването на KIR протеините е същото както и на кодиращите ги KIR гени, но се изписват с „нормален” шрифт (KIR2DL1). Секвенциите на всички известни до момента и приети от KIR номенклатурния комитет алелни варианти се съхраняват в KIR секвенционната база данни (97).

Гените на KIR рецепторите са тясно свързани помежду си и обикновено се унаследяват като едно цяло в „блок”/хаплотип подобно на HLA гените. Uhrberg и сътр. (100) описват при човека две основни групи KIR хаплотипи - А и В (фиг.7). Секвенционният анализ на три KIR хаплотипа, два А и един В, позволи картирането на отделните гени разположени в хаплотипа (195,205). Рамковите (framework) гени *KIR2DL4*, *3DL2*, *3DL3* и *KIR3DP1* присъстват и в двата хаплотипа с редки изключения (207-209). Група А хаплотипите се отличават с наличие на един ген за активиращ (*KIR2DS4*), пет за инхибиторни рецептори (*KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* и *KIR3DL3*) и *KIR2DL4*, който може да има както активиращ, така и инхибиращ капацитет. Характеризират се с малки вариации в броя на гените, които ги изграждат, но последните са със значителен алелен полиморфизъм. Идентифицирането на нулев вариант на *KIR2DS4* (*KIR1D*)(199) и по-високата честота на този алел в кавказката популация (78.8% срещу 35.3% за експресиращите се *KIR2DS4* алели) даде основание за разделянето на група А хаплотипи на две подгрупи: А-1D и А-2DS4. В съответствие с установената алелна честота, хаплотипното разпределение в кавказката популация показва доминиране на KIRA-1D хаплотип в сравнение с KIRA-2DS4 (38.8% и 11.8% съответно) (199). Може да се заключи, че в по-често срещания А-1D KIR хаплотип, единственият рецептор с активираща функция е рамковия *KIR2DL4* (201, 210). Освен от рамковите гени, група В хаплотипите се изграждат от различни комбинации на пет активиращи - *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* и *KIR3DS1*, и един инхибиторен рецептор - *KIR2DL2*. Група В хаплотипите се отличават с голямо разнообразие както в броя на гените, така и с алелни вариации и са основните

хаплотипи, допринасящи за изключителните различия в генните профили, наблюдавани в различни етнически групи по света.



Фиг. 7 Организация на KIR генната група. А: Двата гена от KIR семейството ограничаващи целия регион, *KIR3DL3* и *KIR3DL2* и централно разположените *KIR3DP1* псевдоген и *KIR2DL4* са представени в почти всички индивиди и е прието да се означават като рамкови (framework, anchor) гени, оцветени в бяло. *KIR3DL3* и *KIR3DP1* определят границите на центромерната част на KIR локуса, а *KIR3DL2* и *KIR2DL4* ограничават теломерната част. Уникална секвенция от 14 кВ разделя *KIR3DP1* и *KIR2DL4* и е преференциално място за реципрочни рекомбинации, механизъм осигуряващ възникването на нови хаплотипи чрез пренареждане на гените от центромерната и теломерната част на KIR локуса. *KIR2DL5*, *KIR2DS3* и *KIR2DS5* може да съществуват и в двете части на локуса, показано във „В”. Б: Група А KIR хаплотипи се определя от наличието на *KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* и *KIR3DL2* гени. Група В KIR хаплотипи се идентифицира при наличието на един или повечето активиращи KIR рецептори, различни от *KIR2DS4*. В: Група В KIR хаплотипи се отличават с много по-голямо разнообразие в сравнение с група А KIR хаплотипи по отношение на комбинациите и броя на изграждащите ги KIR гени. До момента са идентифицирани най-малко 20 различни KIR В хаплотипи. Алелните варианти на *KIR2DL5* са представени в квадрати, обозначени с 1 за експресирания варианти на *2DL5* (*2DL5.1* и *2DL5.3*) и 2 за не-експесирания алелни форми на *2DL5* (*2DL5.2* и *2DL5.4*). Адаптирана по Besson и сътр. (211) и Hsu сътр. (212).

Описаните до сега хаплотипи в човешката популация (97) са в подкрепа на приетия модел за унаследяване на KIR гените в нарушено равновесие, т.е. определени KIR алели се срещат в един и същ хаплотип много по-често, отколкото се очаква въз основа на индивидуалните им алелни честоти в популацията. Връзката при нарушено равновесие може да бъде обяснена с намалени до липсващи рекомбинации в определени участъци на KIR региона, селекция на свързани полиморфизми и изменения в популационната структура.

6.5 Асоциация на KIR алели, KIR/HLA –лигандни комбинации и хаплотипи при HBV

Участието на NK клетките в противовирусната защита на организма е безспорно. През последните години все повече се обсъжда ролята на NK клетките в антиген неспецифичната имунна защита на организма и потенциалното им участие в развитието на автоимунни и инфекциозни заболявания. Експресирания KIR на клетъчната повърхност на NK и Т клетки играят роля в регулирането на вродените и придобити антивирусни имунни отговори, чрез трансдукция на инхибиращи и активиращи сигнали (213, 214, 215). Данните за ролята на KIR генния фон за възприемчивостта, оздравяването или хронифицирането на инфекцията с HBV сред

населението са оскъдни и противоречиви, а в достъпната ни литература не открихме проучване на KIR/лигандния полиморфизъм при хепатит В. Генетично-популационни анализи разкриха, че честотата и разпространението на KIR гени и хаплотипи варира спрямо етноса (216).

Лу и сътр. установяват, че броя на активиращите и инхибиращите KIR имат значение за клирънса на вируса (217). Техните резултати показват, че броят на активиращите KIR е значително по-голям при пациентите със спонтанна ремисия, а честотата на KIR2DS1 и KIR3DS1 и инхибиторния KIR2DL5 е по-висока в същата група в сравнение с хроничните носители и здравите контроли. Тези рецепторни гени са смятани за протективни за хронифициране на инфекцията

Kibar и сътр. (218) установяват висока честота на KIR2DL3 и KIR3DS1 в контролната група и при пациенти със спонтанна ремисия, което предполага протективен характер на двата гена KIR2DL3 и KIR3DS1 за HBV инфекцията. За ролята на KIR3DS1 като трансдюсер на повишена NK активация е и посочения му протективен ефект, асоцииран с хепатоцелуларен карцином (219).

По същия начин проучването на Гао и сътр.(220), сравняващо 182 хронични HBV пациенти с 140 здрави контроли, установи че KIR2DL3(+)/C1(+) хомозиготността е протективна за инфекция, а KIR2DL1(+)/C2(+) е предразполагащ към HBV инфекция. Това може да се дължи на по-силно инхибиране на NK клетки след взаимодействие на KIR2DL1 с HLA-C2 и невъзможност за активация. От друга страна по-слабото KIR2DL3-HLA-C1 взаимодействие може да бъде преодоляно от осъществените активиращи сигнали, което води до лизиране на прицелната клетка (6). Рецепторно-лигандната двойка KIR2DL3(+)/C1(+) е протективна и при HCV инфекция, но при ко-инфекция с ХИВ, тя губи своя протективен ефект (221). Висока честота на двойката KIR2DL3(+)/C1(+) се наблюдава при пациенти, които преминават успешно интерферон- α базирана терапия в сравнение с тези, които не постигат успешен терапевтичен отговор. KIR2DL5 се асоцира с лош терапевтичен отговор (221,222). Пан и сътр. установяват, че комбинацията от HLA-C1C1 хомозиготност, HLA-Bw4 Ile80 позитивност и KIR2DS4 (KIR2DS4 /dell) са свързани с увеличен риск за развитие на HCC. Друго проучване показва, че HLA-Bw4 алел с аминокиселината изолевцин на 80 позиция, който се свързва с по-висок афинитет с инхибиторния

KIR3DL1, отколкото HLA-Bw4 алела с треонин на същата позиция, намалява цитотоксичния потенциал на NK клетките и увеличава риска от НСС (224).

Тези данни насочват към възможна роля на KIRs и KIR/HLA лигандния генен фон за възприемчивостта, оздравяването или хронифицирането на инфекцията с HBV сред населението.

Обобщение

HBV инфекцията е световен здравен проблем с над 1 милион смъртни случаи годишно. Според данни на Световната Здравна Организация (от месец юли 2014 г.) съществуват над 240 милиона индивида хронично инфектирани с HBV, които са изложени на риск от развитие на хепатоцелуларен карцином (225). Хроничната хепатит В вирусна инфекция е най-важният етиологичен фактор за развитието на този тумор, който е на трето място по разпространение след карцинома на белия дроб и на стомаха. Между 25-40 % от HBV носителите развиват НСС и цироза (226).

Пациенти с хронична HBV инфекция (СНВ) имат 100кратно по-висок риск от развитие на хепатоцелуларен карцином в сравнение със здрави индивиди, докато пациентите с HBV цироза са изложени на още по-висок риск (227, 228). Установяването на хронична HBV инфекция е изключително важно за намаляване на риска за развитие на усложнения като хепатоцелуларен карцином. Прилагането на адекватна антивирусна терапия е изключително важно не само за забавяне развитието на заболяването прогресиращо до цироза и нейната декомпенсация, но също така и от гледна точка на възможна превенция за развитие на хепатоцелуларен карцином или смърт.

Установена е силна връзка между нивото на HBV-ДНК и риска от НСС във времето. Рискът от НСС започва да се увеличава, когато нивото на HBV-DNA е по-високо от 2000 IU / ml. При нива на HBV-ДНК над 200 000 IU/мл рискът е най-голям и е изчислен на 14,9% (229). Проследяването на хроничните пациенти чрез измерване на серумната HBV-ДНК позволява започване на антивирусна терапия за понижаване на вирусната титрация, подобряване на чернодробната функция, с очакването и предотвратяване или забавяне на прогресията към цироза, чернодробна декомпенсация и развитие на НСС.

Основна насока в нашето проучване е изследване на гените на вродения и адаптивен имуноен отговор (HLA- A,-B,-DR, и KIR и техните HLA клас I лиганди) отговорни за противовирусната

защита и установяване на предразполагащи и протективни алели и хаплотипи, свързани с хроничното протичане на болестта. Основавайки се на съществуващите до сега изследвания се установи, че полиморфизмът на HLA молекулата е един от многото фактори, определящи изхода след остра HBV инфекция. От друга страна полиморфизми в KIRs и техните HLA клас I лиганди, предетерминиращи на генно ниво NK клетъчната функционална активност в посока на повишена инхибиция и/или понижена активация може да благоприятстват използването на вирус инфектираните клетки от вродения имунен надзор и да участват в механизмите на вирусна персистенция и хронифициране. Разбирането на начина, по който генното разнообразие повлиява имунния отговор на гостоприемника към вирусната инфекция може да предостави възможности за разработването на нови терапевтични средства и стратегии за имунна терапия и манипулиране на клетъчната активност на NK (230).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се проучи полиморфизма на някои гени на вродения и придобит имунитет (HLA, KIR, KIR/лиганди) и вирусния генотип при HBV инфекция в българската популация.

За постигане на целта си поставихме следните **задачи**:

1. Въвеждане, оптимизиране и валидиране на методика за количествено определяне на HBV-ДНК, чрез Real time -PCR. Въвеждане на методика за генотипизиране на HBV, чрез nested-PCR с и изследване на вирусния генотип при хронично инфектирани пациенти от българската популация.
2. Количествено определяне на HBV-ДНК при лечение на хронично инфектирани пациенти. Оценяване влиянието на HLA клас I и клас II генен полиморфизъм за вирусната репликация при хронично инфектирани пациенти преди, по време и след приключване на антивирусно лечение.
3. Проучване на асоциацията на HLA клас I (-A и -B) и клас II (DR) гените с хепатит В инфекция.
4. Проучване ролята на KIR генен полиморфизъм при хепатит В вирусна инфекция.
5. Проучване на KIR/лиганден полиморфизъм при хепатит В вирусна инфекция.

Материали и методи

I. Материали

Изследвани бяха общо 139 пациенти, от които 118 с хроничен хепатит В (84 мъже и 34 жени на възраст от 18 до 73 [44±27] години) и 20 индивида, оздравели от остър хепатит В (10 мъже и 10 жени на възраст от 31 до 58 [44±13.5] години). Подборът на пациентите, включени в проучването, бе извършен в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ "Александровска" и в Инфекционно отделение на ВМА гр. София, чрез комплексна оценка на съвкупност от включващи и изключващи критерии. Диагнозата на хроничната хепатит В инфекция е основана въз основа на препоръките на Американската асоциация за проучване на чернодробни болести. Петдесет и шест са новодиагностицирани (скрининг) и нелекувани към момента на проучването. От останалите 62 пациента с хроничен хепатит 20 са на терапия с Пегинтерферон алфа-2а, а 42 – с нуклеозидни/нуклеотидни аналози (инхибитори на обратната транскриптаза).

В проучването се включени 126 случайно подбрани неродствени здрави индивиди от българската популация (58 мъже и 68 жени на възраст от 24 до 70 [46±12] години) при изследване на KIR/лиганден полиморфизъм и 204 (110 мъже и 96 жени на възраст от 22 до 73 [48±9] години) при изследване на HLA полиморфизма. Контролите са съпоставими по пол и възраст с изследваните болни, без фамилна анамнеза за наследствени заболявания, с нормална чернодробна функция и отрицателни серологични маркери за хепатитни вирусни инфекции. Мотивът за включването на контролна група от здрави индивиди беше да се оцени, дали съществуват имуно-генетичните профили (маркери), благоприятстващи хронифицирането на заболяването при болните от хепатит В, които да са свързани с нарушени защитни механизми.

Всички включени в проучването пациенти и здрави индивиди са подписали информирано съгласие.

II. Методи

1. Изолиране на геномна ДНК

Принцип:

Изолирахме геномна ДНК от периферна венозна кръв, взета върху антикоагулант-3,8 М Na - цитрат с автоматизирана система за ДНК (iPrep™ Purification Instrument, Invitrogen, USA) с готов набор Prep PureLink® gDNA™ Blood. Технологиата се основава на използването на магнитни частици със силиконова повърхност, свързващи ДНК от кръвните проби и последващо елуиране на ДНК чрез магнитен сепаратор.

Изпълнение на метода:

Като изходен материал се използва 350 µl периферна венозна кръв, взета върху антикоагулант натриев цитрат. Към нея се прибавят лизиращ разтвор, необходим за разкъсване на клетъчните мембрани и протеиназа К за разграждане на клетъчните белтъци. Следва смесване на лизата с магнитни микросфери (Dynabeads® MyOne™ SILANE), които свързват и извличат ДНК от сместа. След две последователни измивания със съответните буфери за премахване на контаминиращи агенти и потенциални PCR инхибитори, ДНК се елуира чрез буфер и магнитен сепаратор. Всички консумативи се съдържат в търговския кит, а автоматичната система извършва последователно описаните процедури при ДНК екстракцията. Концентрацията на изолираната ДНК се определя спектрофотометрично (спектрофотометър SHIMADZU, Япония), а чистотата ѝ според съотношението A260/A280 (оптималното съотношение при добре освободена от белтъци ДНК е между 1.6 и 1.9). Интактността на ДНК се оценява електрофоретично върху 0.7% агарозен гел (100 V, 15 мин.). Изолираната ДНК се съхранява на +4 °C за няколко седмици или при -20 °C за по-продължителен период.

Предимството на автоматичната система за изолиране на геномна ДНК е относително голямото количество добивана високопречистена ДНК, подходяща за анализиране, чрез високо-

чувствителни молекулярно-биологични техники. Методът е бърз (~40 мин.) и позволява едновременната обработка на 12 кръвни проби.

2. Изолиране на вирусна ДНК

Принцип:

Изолирането на вирусна ДНК от серум чрез QIA viral mini кит се основава на лизиране на клетките и задържане, чрез центрофугиране на отделената ДНК върху силиконови мембрани в QIA amp колоните. След неколккратно измиване с оглед премахване на контаминиращи агенти и потенциални PCR инхибитори, ДНК се елуира от колоната и може да бъде използвана директно.

Изпълнение на метода:

Към изходния материал (200 µl серум) се прибавят 20 µl протеиназа К и се 200 µl от буфера за лизиране. Ако пробата е по-малко от 200ml, се добавя PBS до 200ml и се отбелязва разреждането на серума. Пробата се инкубира на 56°C за 10 мин. След приключване на инкубацията се добавят 200 µl 96-100% етанол. Пробата внимателно се прехвърля в QIAamp Spin колонка и се центрофугира се 8000 оборота за 1 минута. Филтратът се изхвърля. Колоната се отваря внимателно и се нанасят 500 µl буфер AW1. Следва отново центрофугиране при 8000 оборота за 1 минута. Същата стъпка се повтаря с буфер AW2. Колонката се поставя в чиста епруветка и се прибавят 50ml буфер АЕ. Инкубира се на стайна температура (15-25°C) за 10 минути и след това се центрофугира на 13000 оборота за 1 минута. В случай, че не се използва веднага, изолираната ДНК се съхранява за кратък период (до 3 дни) при 4 °C, а за по-дълъг период при -20°C.

QIAamp viral mini кит дава възможност за бързо и лесно изолиране на вирусна ДНК в рамките на 60 минути. Методът е подходящ за едновременно изолиране на ДНК от много проби. Елуираната ДНК може директно да бъде използвана за PCR и други ензимни реакции или да бъде

съхранена при -20°C . Изолираната по този метод ДНК е пречистена от белтъци, нуклеази и други замърсители или инхибитори.

3. HLA-клас I и клас II генотипизиране с ниска разграничителна способност чрез PCR-SSP метод.

Принцип:

За изследването използвахме кит на фирмата Protrans medizinische diagnostische Germany, Protrans HLA SSP. PCR-SSP методът е базиран на принципа, че напълно комплементарни на ДНК матрицата праймери ще се използват по-ефективно в първите критични цикли на PCR реакцията в сравнение с праймери, съдържащи в 3` края си един или няколко различни нуклеотида. Така полимеразата не притежава 3`-5` екзонуклеазна активност и поради това праймер с един или няколко несъвпадащи нуклеотида в 3` края не може да бъде използван ефективно.

При PCR-SSP метода се използва панел от праймерни смеси, всяка от които съдържа двойка праймери, чиито 3` краища съвпадат напълно с последователността на даден алел или група от алели. Когато PCR реакцията се провежда при строго определени условия, амплификация се наблюдава само при пълно съответствие на двойката алел или групово-специфични праймери и матрицата. Тъй като специфичността на типизирането е част от амплификацията, пост-амплификационните процедури са сведени до разделяне на амплификатите, чрез агарозна гел електрофореза и визуализирането им, чрез етидиев бромид. По този начин, въз основа на наличието и размера на амплификационния продукт за дадена реакционна смес може да се определи специфичността на изследваната проба. Липсата на амплификат за дадена смес може да е резултат от технически грешки. Поради това всяка смес от праймери съдържа и една двойка вътрешно контролни праймери, които амплифицират консервативен участък от геномната ДНК и верифицират ефективността на PCR реакцията.

Изходен материал:

За извършване на теста се използва ДНК с концентрация 45-60 ng/μl, изолирана от периферна венозна кръв.

Изпълнение на метода:

1. Protrans-ABDR SSP кита (Protrans SSP, Germany) съдържа 96 лиофилизирани праймери, предварително разпределени в 0.2 ml тънкостенни PCR епруветки или плаки.

2. Приготвяне на PCR амплификационните смеси: За всички PCR реакции, които трябва да бъдат извършени за типизирането на една проба (един пациент) се приготвя една предварителна PCR смес, съдържаща: Buffer D, Buffer Y, включен във всеки кит, изолираната ДНК и Taq полимераза (табл.3.)

Табл 3. Компоненти на PCR амплификационна смес за Protrans HLA ABDR SSP типизиране.

Компонент	Количество
ДНК	200μl ДНК (45-60ng/μl)
Buffer D	280 μl
Buffer Y	160 μl
Taq полимераза (5 units/μl)	6,6 μl

Преди да се прибави ДНК към сместа (съдържаща PCR master mix. и Taq полимераза), 10μl от нея се прибавят към негативната контрола. Към останалата част от сместа се прибавя съответното количество ДНК. Разбърква се добре и към всяко гнездо на плаката се прибавят по 10μl от PCR сместа. Към негативната контрола се прибавят 10μl стерилна d H₂O.

3. Плаката се поставя в PCR апарат Applied Biosystems 9700 с параметри на температурния блок PE 9600 и се стартира амплификационна програма със следните параметри:

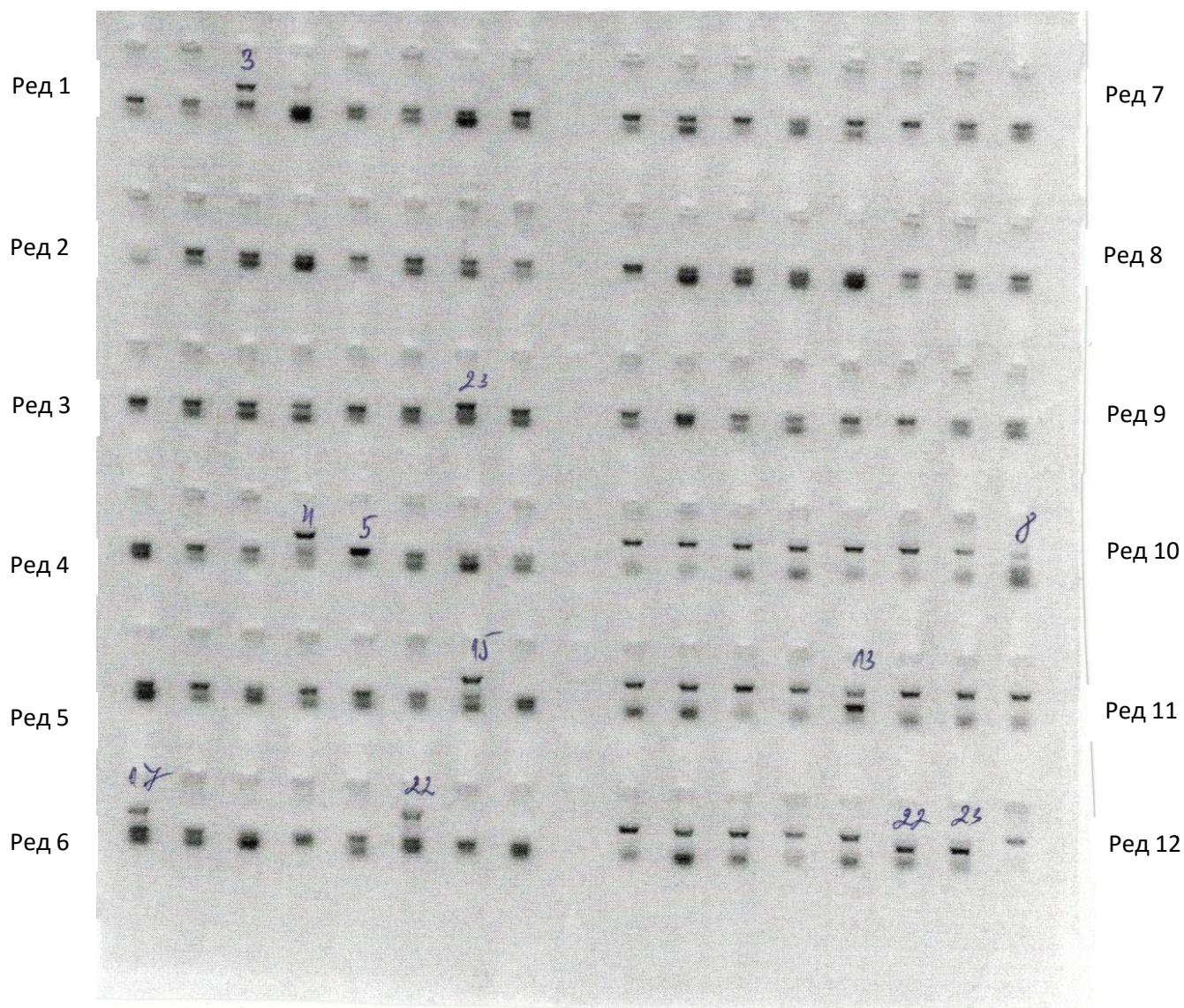
1цикъл	96°C	2 мин.
10 цикъла	94°C	15 сек.
	65°C	60 сек.

20 цикъла	94°C	15 сек.
	61°C	50 сек.
	72°C	30 сек.
	4°C	∞

4. Детекция на амплификатите чрез агарозна гел-електрофореза.

Агарозната гел-електрофореза е метод за разделяне на ДНК фрагменти по големина и при PCR-SSP метода има редица предимства като: визуализиране на вътрешната контрола, възможност за относително определяне размера на амплификатите и разграничаване на специфичните амплификати от праймер-олигомерни артефакти и неспецифични амплификати.

Приготвя се 2% агарозен гел в 1xTAE буфер. Цялото количество PCR амплификати се нанася директно в съответните кладенчета на гела. Стартира се програма за електрофореза (15 мин., 200 V). Разделените амплификати се визуализират, чрез UV облъчване и се документират чрез фотографиране. Специфичността на отделните разтвори на праймери от всеки Protrans типизиращ кит е отбелязана в информация, приложена към кита и е специфична за всеки лот номер. Всеки Protrans кит съдържа и таблица за интерпретиране на резултатите. Резултатите от гел-електрофорезата се документират посредством дигитален фотоапарат Kodak (фиг. 8). Праймерите за вътрешна контрола амплифицират участък от гена на човешкия растежен хормон. Вътрешната контрола дава възможност да се определи, дали липсата на специфична амплификация е резултат от липса на определен алел в изследваната ДНК проба или се дължи на технически проблем в хода на PCR.



Фиг. 8 PCR-SSP метод за определяне на HLA-ABDR. Специфичните амплификати на позиции 1-3 ред определят HLA- A*, 4-9 редове HLA-B*, 10-12 редове дефинират HLA- DRB1* и 96 - негативна контрола.

4. Определяне на KIR полиморфизъм.

KIR генотипизирането се осъществи, чрез PCR-SSP, който беше валидиран в Клиниката по клинична имунология, използвайки търговски китове Olerup SSP® KIR Genotyping Kit (Olerup SSP AB, Sweden) и PEL-FREEZ® KIR Genotyping Kit (Dynal Biotech, USA).

PCR-SSP KIR генотипизиране

За типизиране на KIR локуса се използват 23 праймерни смеси, съдържащи се във всеки един от двата използвани кита и позволяващи определянето на 15 KIR специфичности: 13 гена (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL1/3DS1*, *3DL2*, *3DL3*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*) и 2 псевдогена (*2DP1*, *3DP1*). В последните десетилетия стана ясно, че първоначално приеманите като отделни гени *KIR3DL1* и *KIR3DS1*, съществуват като алели на един и същи ген. Приложената в проучването PCR-SSP методика позволи тяхното диференциране и определяне. Допълнително използваните праймерни двойки дават възможност за разграничаване на алелните групи на два KIR гена - *2DS4* и *2DL5*.

Субтипизирането на пробите, носещи *KIR2DS4* ген (*KIR2DS4 norm* и *KIR2DS4 dell*) и *KIR2DL5*(*KIR2DL5A* *KIR2DL5B*) се направи с набор от алел-специфични SSP праймери включени в индивидуални PCR-SSP реакции за двата кита Olerup SSP® и PEL-FREEZ®, отговарящи две алелни групи.

В Olerup SSP® “KIR Genotyping Kit” допълнително е включена една праймерна двойка амплифицираща специфично *KIR3DL1*004* и праймерни смеси, разграничаващи две алелни групи на *KIR2DS1*: *2DS1*001* и *2DS1*002-004*, докато използването на PEL-FREEZ® “KIR Genotyping Kit” не предоставя тези възможности. На табл. 4 е представена разграничителната способност на двата използвани кита за KIR генотипизиране и съответните KIR гени/алели, които амплифицират.

Въпреки, че двата използвани търговски кита за KIR генотипизиране дефинират еднакви KIR, предимство на Olerup SSP® KIR Genotyping Kit е определянето на *KIR3DL1*004* алел, за който се

знае, че кодира функционално инертен рецептор и разграничителната способност за две *KIR2DS1* алелни групи.

Табл. 4 Разграничителна способност на използваните китове за **KIR** генотипизиране.

KIR	Аmplифицирани KIR гени/алели	
	Olerup SSP® “KIR genotyping kit”	PEL-FREEZ® “KIR genotyping kit”
<i>2DL1</i>	да	да
<i>2DL2</i>	да	да
<i>2DL3</i>	да	да
<i>2DL4</i>	да	да
<i>2DL5A</i>	да	да
<i>2DL5B</i>	да	да
<i>2DS1</i>	да	да
<i>2DS2</i>	да	да
<i>2DS3</i>	да	да
<i>*2DS4norm</i>	да	да
<i>**2DS4del</i>	да	да
<i>2DS5</i>	да	да
<i>3DL1</i>	да	да
<i>#3DL1nul</i>	да	не
<i>3DS1</i>	да	да
<i>3DL2</i>	да	да
<i>3DL3</i>	да	да
<i>2DP1</i>	да	да
<i>3DP1</i>	да	да

2DS4norm* (*2DS4*001*); *2DS4del* (*2DS4*003*, **004*, **006*); *#3DL1nul* (*3DL1*00401-00402*)

Изпълнение на метода:

PCR-SSP праймерите за определяне на съответния KIR ген са предварително разпределени по 10 µl в 0,2 ml тънкостенни PCR епруветки. Към тях се добавя по 10 µl от амплификационна смес, приготвена според протокол, посочен от производителя. Приготвяне на PCR амплификационните смеси:

Olerup SSP® KIR Genotyping Kit: PCR сместа включва 54 µl от изследваната ДНК (20 ng/µl), 2.4 µl Таq полимеразата, 84 µl PCR Master Mix (Olerup SSP®) и 132.8 µl dH₂O.

Амплификацията протича в PCR апарат (Applied Biosystems 9700) при следните PCR циклични параметри:

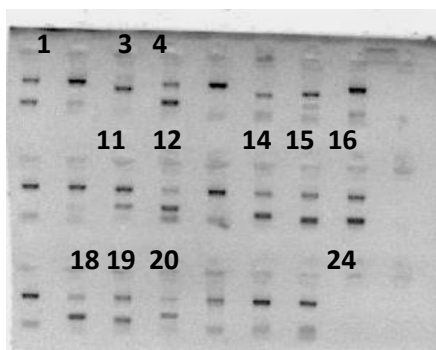
1 цикъл	94°C	2 мин.
10 цикъла	94°C	10 сек.
	65°C	60 сек.
20 цикъла	94°C	10 сек.
	61°C	50 сек.
	72°C	30 сек.

PEL-FREEZ® KIR Genotyping Kit: PCR амплификационната смес се приготвя от 25 µl от изследваната ДНК (75-125 ng/µl), 2.4 µl Таq полимеразата, 150.0 µl PCR Master Mix (PEL-FREEZ®) и 60.0 µl dH₂O.

Амплификацията се осъществява в апарат Applied Biosystems 9600 при следните PCR параметри:

1цикъл	95°C	1 мин.
30 цикъла	94°C	20 сек.
	63°C	20 сек.
	72°C	90 сек.

Наличието на специфични амплификационни продукти и вътрешна контрола за всяка PCR реакция се отчитат електрофоретично в 1.5% агарозен гел, съдържащ 0.5 µg/ml етидиев бромид. Получените резултати се документират посредством дигитален фотоапарат Kodak (фиг. 9). Праймерите за вътрешна контрола амплифицират участък от гена на човешкия растежен хормон. Вътрешната контрола дава възможност да се определи дали липсата на специфична амплификация е резултат от липса на определен алел в изследваната ДНК проба или се дължи на технически проблем в хода на PCR. Анализът на получените амплификати с оглед определянето на съответния KIR ген се извършва съобразно работните фишове и таблицата за интерпретация на резултатите, съдържащи се в съответния кит.



Фиг. 9 PCR-SSP метод за определяне на KIR генен полиморфизъм. Специфичните амплификати на позиции 1, 3, 4, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20 дефинират *KIR2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *2DS4*001*, *2DS4*003/*004/*006/*007*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *2DP1*, *3DP1*003* и 24 - негативна контрола.

5. Определяне на KIR HLA клас I лиганден полиморфизъм

За типизиране по HLA-C локуса се използва търговски кит (Olerup SSP® “HLA-C low resolution”), съдържащ 32 праймерни смеси, позволяващи определянето на 14 специфичности.

Интерпретацията на получените резултати, с оглед определянето на съответния HLA алел, се извършва чрез компютърна програма SCORE™, докато KIR HLA клас I лигандния генотип се определя в програмата “KIR Ligand calculator”.

За определяне на KIR HLA лигандните специфичности се използваха два подхода:

1. Определяне на HLA клас I лигандни групи, чрез програма “KIR ligand calculator” (http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/ligand_calculator.cgi), използвайки данните от HLA клас I генотипизиране с PCR-SSP, който е валидиран и се използват рутинно в Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска”.
2. Директно определяне, чрез PCR-SSP метод с готов търговски кит (Olerup SSP® “KIR HLA Ligand SSP typing”, Sweden).

5.1 Индиректно определяне на HLA клас I лигандни групи

Данните от HLA A, B, C типизиране с ниска разграничителна способност се използват като изходна информация за определяне на известните KIR HLA клас I лигандни групи. HLA-A3/11 свързват специфично *KIR3DL2* (78, 79), а HLA-A*23, *24, *25, *32, притежаващи Bw4 мотив (251) са лиганди за *KIR3DL1* (с изключение на HLA-A*25:01) (53, 54, 72). Индивидите позитивни за тези две групи лиганди бяха определени мануално в зависимост от HLA-A генотипа. Групите *HLA-C1*, *HLA-C2*, *HLA-B^{Bw4}*, *HLA-B^{Bw6}* и подгрупите *HLA-Bw4^{Ile80}* и *HLA-Bw4^{Thr80}* бяха дефинирани чрез “KIR ligand calculator” в http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/ligand_calculator.cgi.

5.2 Директно определяне на KIR HLA клас I лиганди.

Беше използван PCR-SSP метод с готов търговски кит (Olerup SSP® “KIR HLA Ligand SSP typing”, Sweden). Принципът на метода е еднакъв с вече описания при KIR генотипизиране чрез PCR-SSP. Като изходен материал се използва ~420ng ДНК, изолирана по посочения магнитно-базиран метод. За амплификацията се приготвя PCR амплификационна смес (табл. 5), от която във всяко гнездо със съответната праймерна двойка се поставят по 10 µl.

Табл. 5 Компоненти на PCR амплификационна смес за Olerup SSP® “KIR HLA Ligand SSP typing”.

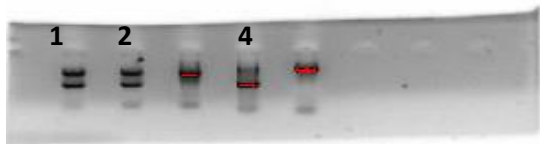
Компонент	Количество
ДНК	14 µl ДНК (30ng/µl)
PCR Master Mix без Taq	21 µl
Taq полимераза (5 units/µl)	0.6 µl
dH ₂ O	34.4 µl

В технологията се използват 5 праймерни двойки за определяне на 5 групи KIR HLA клас I лиганди (HLA-Cw алели с аспаргин (Asn) или лизин (Lys) на 80-та позиция, HLA-Bw4 алели с изолевцин (Ile) или треонин (Thr) на позиция 80 и HLA-A^{Bw4} алели). На табл. 4 са представени HLA клас I лигандните групи и HLA клас I алелите, изграждащи съответната група, дефинирани чрез използвания търговски кит.

Амплификацията протече в PCR-апарат Applied Biosystems 9700 с PCR параметри, идентични на описаните при Olerup SSP® KIR Genotyping. Детекция на амплификатите се осъществява чрез описаната вече методика с агарозна гел-електрофореза. Алелите се разграничават въз основа на наличието на специфичен амплификат (фиг. 3). Наличието на специфична амплификация за дадена реакционна смес показва, че ДНК пробата съдържа алел, дефиниран от специфичните праймери в дадената смес. Таблиците за интерпретация, приложени към всеки кит се използват за определяне на алела или групата от алели, дефинирани от съответните праймери (табл.5а).

Табл. 5а KIR HLA клас I лигандни групи и изграждащите ги HLA клас I алели дефинирани от използвания Olerup SSP® кит.

Лигандни групи	HLA клас I алели
HLA-Cw ^{Asn80} (HLA-C1)	HLA Cw*01 (с изключение на *01:14), *02:12, *02:27, *03 (с изключение на *03:07/15/45), *04:11, *04:29, *04:36, *06:11, *07 (с изключение на *07:07/09/49), *08 (с изключение на *08:10), *12 (с изключение на *12:04/05/09/21), *14 (с изключение на *14:04/12), *15:07, *15:21, *16 (с изключение на *16:02/09/12)
HLA-Cw ^{Lys80} (HLA-C2)	HLA Cw*01:14, *02 (с изключение на *02:12/27), *03:07, *03:15, *03:45, *04 (с изключение на *04:11/29), *05, *06 (с изключение на *06:11), *07:07, *07:09, *07:49, *08:10, *12:04, *12:05, *12:09, *12:21, *14:04, *15 (с изключение на *15:07/21), *16:02, *16:09, *16:12, *17, *18
HLA-Bw4 ^{Thr80}	*08:02, *13(с изключение на *13:09), *15:36, *15:89, *95:15, *18:09, *27:01, *37:10, *38 (с изключение на *38:01/05/06/07/09-14/16/19/20), *40:47, *40:96, *44 (с изключение на *44:06/18/25/50), *47:04, *49:02, *51:54, *51:78, *53:09, *53:11-13, *56:07
HLA-Bw4 ^{Ile80}	*07:36, *07:38, *07:81*08:03, *15:13, *15:16-17, *15:23, *15:24, *15:67, *15:87, *15:95, *95:57, *95:62, *95:68, *95:77, *27:02, *27:30, *27:53, *27:57, *38:01, *38:05-07, *38:09-14, *38:16, *38:19, *38:20, *40:13, *40:19, *44:06, *44:18, *44:25, *44:50, *48:18, * 49 (с изключение на *49:02), *51 (с изключение на *51:54/78), *52, *53 (с изключение на *53:09/1/12/13), *54:12, *56:12, *57, *58, *59
HLA-A ^{Bw4}	*02:81, *02:87, *92:12, *92:24, *92:29, *92:36, *23, *24, *25, *29:13, *31:07/08/10, *32, *68:36



Фиг. 10 PCR-SSP метод за определяне на генния полиморфизъм на KIR HLA клас I лиганди. Специфични PCR продукти на позиция 1, 2 и 4 определят HLA-Cw^{Asn80} (група C1), -Cw^{Lys80} (група C2) и – Bw4^{Ile80} съответно.

6. Определяне на HBV генотип

За определяне на HBV генотипа се използва PCR-SSOP метод с търговски кит INNO-LIPA HBV Genotyping. Китът е пригоден за идентификация на генотипи: A, B, C, D, E и H, чрез детекция на типово-специфични последователности в HBV полимеразния ген-домейн B до C.

Принцип на метода:

Изолираната вирусна ДНК се амплифицира, чрез две последователни PCR реакции с помощта на биотинилирани праймери. Първият PCR амплифицира част от HBV полимеразния ген (домейн B и C). Използваните олигонуклеотидни праймери са комплементарни на силно консервативен участък на таргетния регион. Точно копие на матрицата (409 двойки бази) се получава след един цикъл на денатурация, хибридизация на праймерите и удължаване на ампликоните. Процесът се повтаря 40 пъти. Количеството на амплификационния продукт в повечето случаи е недостатъчно, поради което се налага втори PCR. Принципът на втората амплификация е идентичен с изключение, че ДНК е заместена с амплифициран продукт, а “външните” праймерите с биотинилирани “вътрешни” праймери. Необходима е проверка на 2% агарозен гел за наличието на амплификати и при двете реакции.

След амплификация биотинилираната ДНК се хибридизира със специфични олигонуклеотидни проби (сонди), имобилизирани като паралелни линии на мембранно базиран стрип. След

хибридизация, нехибридизираната ДНК се измива от стрипа. Стрептавидин маркиран с алкална фосфатаза се свързва към формираните биотонилирани хибриди. Инкубацията с BCIP/NBT хромоген води до образуването на пурпурно-кафяв преципитат.

Изпълнение на метода:

6.1. Амплификационен протокол –“ Outer” амплификация

- (N x 32.4 µl) - дестилирана вода
 - + (N x 5.0 µl) - 10xTaq buffer
 - + (N x 0.4 µl) -dNTP mix (25 mM)
 - + (N x 2.0 µl)- Outer primers
 - + (N x 0.2 µl) - Taq polymerase (5 U/µl, Stratagene)
- , където N е броя на пробите.

След хомогенизиране на реакционния микс по 40 µl от него се разпределят в амплификационни епруветки. Прибавят се по 10 µl от изолираната ДНК или 10 µl дестилирана вода за негативната контрола в определената епруветка. Стартира се амплификационна програма, предназначена за INNO-LIPA HBV Genotyping outer амплификация.

Амплификацията протича в PCR апарат (Applied Biosystems 9600) при следните PCR циклични параметри:

	94°C	4 мин.
40 цикъла	94°C	30сек.
	45°C	30сек.
	72°C	30 сек.
20 цикъла	72°C	10 мин.
	4°C	∞

След приключване на амплификацията се пристъпва към “Nested “амплификация.

6.2 Амплификацион протокол – “Nested” амплификация

- (N x 40.4 μ l) - дестилирана вода
 - + (N x 5.0 μ l) - 10xTaq buffer
 - + (N x 0.4 μ l) - dNTP mix (25 mM)
 - + (N x 2.0 μ l) -Nested primers
 - + (N x 0.2 μ l) - Taq polymerase (5 U/ μ l, Stratagene)
- , където N е броя на пробите.

След хомогенизиране на мастър микса по 40 μ l от него се разпределят в амплификационни епруветки. Прибавят се по 10 μ l амплификационния продукт или 10 μ l дестилирана вода за негативната контрола.

Амплификацията протича в PCR апарат (Applied Biosystems 9600) при следните PCR циклични параметри:

	94°C	4 мин.
35цикъла	94°C	30сек.
	45°C	30сек.
	72°C	30 сек.
	72°C	10 мин.
	4°C	до употреба

Получените амплификати се проверяват на 2% агарозен гел, чрез насяне на 5 μ l от амплифицирания продукт от outer и nested амплификацията (фиг. 11). Ако outer амплифицираният продукт дава ивица на 409 бази, може да се използва продукта за хибридизацията. Ако няма видима ивица на outer амплифицирания продукт, се използва nested амплифицирания продукт.



Фиг. 11 Проверка на амплификатите след “*nested амплификация*“. Наблюдава се амплификат с големина 342 бази.

6.2. Денатурация на пробите

1. Хибридизационният разтвор и промиващият разтвор се поставят във водната баня на 37 °С - 49 °С за разтваряне на всички кристали.
2. С помощта на пинсета се взима по един стрип от епруветката за всяка проба. За всяка проба се поставя стрип в различна ямка на трея.
3. Отпипетират се по 10 µl денатуриращ разтвор в горния край на всеки стрип.
4. Прибавят се 10 µl от пробата или негативната контрола към денатуриращия разтвор.
5. Пробите се инкубират за 5 мин на стайна температура за протичане на процес на денатурация.

6.4 Хибридизация на пробите

1. Прибавят се 2 ml хибридизационен разтвор към всяка ямка, като се внимава да не се замърсят останалите проби. Внимателно се хомогенизира.
2. Трея се поставя на 49 °С ± 0.5°С на водната баня при 80 грт и затворен капак за 60 мин.
3. Когато хибридизацията приключи, трея се изважда от водната баня.

6.5 Миене на стриповете

Течността се отстранява с пипета. Плаката се навежда под ъгъл, за да се събере цялото количество течност.

1. Прибавят се по 2 ml от миешия разтвор във всяка ямка и треза се инкубира за 1 минута на 20-25 °C, след което течността се отстранява от всяка ямка.
2. Стъпката се повтаря.
3. Прибавят се 2 ml миеш разтвор към всяка ямка, треза се поставя на 49 °C ± 0.5°C на водната баня. Водната баня се наглася на 80 грm и се инкубира за 60 минути.
4. Приготвя се измиващия и работния разтвор на конюгата.

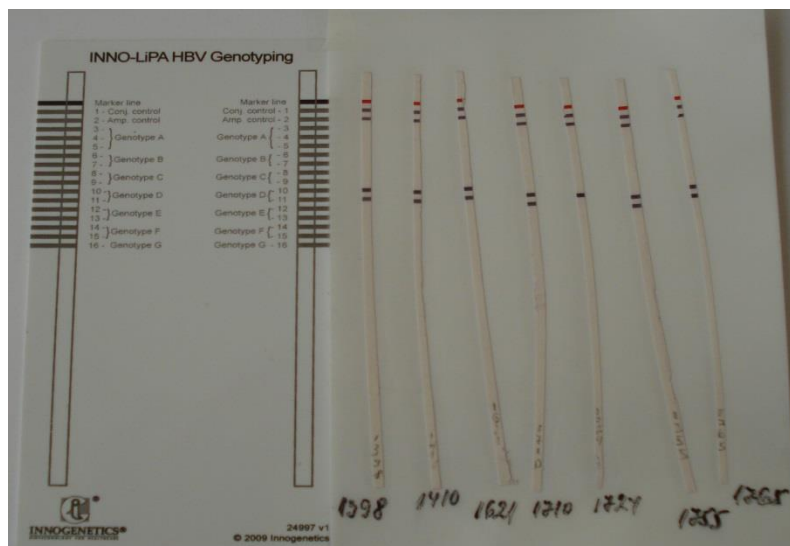
6.6 Проявяване на цветна реакция

1. Течността се аспирира от улеите чрез пипета.
2. Прибавят се по 2ml от разредения конюгат към всяка ямка и треза се поставя на клатачка при стайна температура. Инкубира се за 30 минути.
3. Когато времето за инкубация изтече, треза се сваля от клатачката и течността от улеите се аспирира чрез пипета.
4. Прибавят се по 2ml миеш разтвор към всяка ямка. Следва аспириране на течността. Стъпката се повтаря.
5. Прибавят се по 2ml субстратен буфер към всяка ямка и треза се поставя на клатачка при стайна температура за 1 минута, след което течността се отстранява от всяка ямка.
6. Прибавят се по 2ml от разредения субстрат към всяка ямка, треза се поставя на клатачка при стайна температура за 30 минути.

7. Когато времето за инкубация изтече, цветната реакция се стопира, чрез миене на стриповете с по 2ml дестилирана вода към всяка ямка. Тря се поставя на клатчка за поне 3 минути и стъпката се повтаря.
8. С помощта на пинцети, стрипове се изваждат от ямките и се поставят върху филтърна хартия с лицето нагоре.
9. Преди отчитане на резултатите, стриповете трябва да са напълно изсушени. Проявените и изсушени стрипове се съхраняват на тъмно.

6.7 Резултати

За да се отчете линията от стрипа като позитивна е необходимо да се появи тъмно-лилаво/кафяво оцветяване на края на тестовата процедура. Винаги се включва позитивна и негативна контрола при провеждане на теста. INNO-LiPA HBV Genotyping стриповете съдържат една червено маркирана линия, 2 контролни линии и 14 паралелни линии за пробите (фиг. 12) Първите линии на стрипа са маркерните линии, които позволяват правилната ориентация на стрипа. Използва се интерпретационната карта всеки път за коректна интерпретация на HBV генотипа. Конюгатната контролна линия е контрола за цветната реакция, а амплификационната контролна линия съдържа универсални HBV проби за проверка присъствието на амплифициран HBV геномен материал. Отчитането на резултатите се извършва мануално, чрез включени в кита линия и интерпретационна таблица.



Фиг. 12 HBV генотипизиране, чрез Inno-LiPa HBV Genotyping Kit. Положителните хибридационни ивици на стрипа определят D генотип при всички изследвани проби.

7. Количествено определяне на HBV DNA, чрез Real Time PCR метод (Applied Biosystems)

Изходен материал

Като изходен материал за анализ се използва серум, взет чрез венепункция и отделен при 3000 обр/мин за 5 минути. Серумите се съхраняват за 4 до 8 часа. Изолирането на вирусна DNA се извършва с мануален кит, съгласно указанията на производителя. Процедурата е описана в глава материали и методи. За изолиране на вирусна DNA се използва 200 µl серум на пациента. Използва се кит за мануално изолиране: QIAamp DNA Mini Kit, като се спазват инструкциите на производителя. Изолираната вирусна DNA се съхранява на 4 °C.

Приложение на метода

Real Time PCR (5'нуклеазен PCR анализ) е чувствителен и специфичен метод за количествено определяне на PCR продукта. Real Time PCR намира приложение в медицинската диагностика за откриване на малки количества нуклеинови киселини, за генна експресия и определяне на генетични изменения - алелни варианти, за мониторинг на вирусни инфекции, чрез диагностика на вирусния товар, за определяне на вирусния генотип и откриване на вирусни мутации.

Принцип на метода

Анализът използва 5'екзонуклеазна активност на Taq полимеразата да разделя двойно белязана проба (сонда) по време на фазата на удължаване на PCR продукта. Пробата (сондата) е маркирана в 5'края с флуоресцентна репортерна молекула, а в 3'края с друга молекула, която действа като "гасител" за репортерната молекула. Когато двата флуорофора са в непосредствена близост, сондата е в интактно състояние, репортерната молекула се възбужда от светлина, но детекция не се осъществява, тъй като се получава енергиен трансфер към гасителя. По време на етапа на удължаване на PCR, Taq полимеразата среща и разцепва проба (сондата), свързана към матрицата. Когато репортерната молекула се освободи от потискащия ефект на гасителя, флуоресцентен сигнал може да бъде открит. Флуоресценцията, генерирана от репортерните молекули, повишава своя интензитет с натрупването на PCR продукта. Точката, при която сигналът се издига над фоновото ниво и става различим, се нарича праг на цикъл (Ct). HBV ДНК и вътрешната контрола се амплифицират едновременно в една реакция, като се използват sequence-специфични праймери. Нарастването на флуоресцентния сигнал е правопрпорционално на количеството амплификационен продукт по време на реакцията. Нивото на флуоресценция се измерва в края на всеки амплификационен цикъл и е пропорционално на количеството, синтезиран продукт в този времеви момент. През експоненциалната фаза амплификацията се удвоява на всеки цикъл с голяма прецизност. След всеки цикъл real-time PCR апаратът изчертава амплификационна крива, която представлява отношение на интензитета на флуоресцентния сигнал (ΔR_n) към номера на цикъла. За всеки PCR се определя специфично Ct - номерът на цикъла, при който за пръв път се засича значително увеличаване на флуоресцентния сигнал. HBV ДНК и вътрешната контрола се амплифицират едновременно в една реакция, като се използват специфични праймери.

ТaqMan сондата е тип MGB - маркирана е на 5' края с флуоресцентна репортерна моллекула и на 3' края с нефлуоресцентен гасител (NFQ). Така конструирана, сондата има по-нисък фонов сигнал, което води до по-добра точност за количествено определяне. MGB сондите са по-къси в сравнение с двойна белязаните сонди, което ги прави по-подходящи за откриване на алелни различия или при проектирането на сонди в участъци с висока АТ съдържание. Темплейтната ДНК се денатурира до две едноверижни ДНК. Сондата е комплиментарна на участък от едноверижна ДНК, вътрешна за амплификационния продукт. Температурата на анилинг на сондата е 5-10⁰ С по-висока от тази на праймерите. Със спадането на температурата се свързват и двата праймера. Ензимът Tag Pol синтезира новата ДНК, чрез добавяне на нови нуклеотидни бази към темплейта.

Параметри на анализа

Rn – Съотношението между степента на интензитет на флуоресцентна емисия на репортера и пасивното багрило.

Baseline – първоначалните цикли на PCR-реакцията, при които има малка промяна във флуоресцентния сигнал.

Threshold – стойност на Rn, определен от софтуер или мануално над базовата линия, но ниско в експоненциалния регион на амплификационната крива. Пресечната точка на Threshold с амплификационната крива определя Ct.

Threshold cycle (Ct) – цикълът, от който може да се наблюдава статистически значимо увеличение на флуоресценцията.

Delta Rn – степента на флуоресцентния сигнал, генериран при определени PCR условия. (Delta Rn = Rn - Baseline)

Съхранение на реактиви

Праймерите и сондата се съхраняват на -20°C , като PCR MM се съхранява на 4°C . Разтапят се непосредствено преди. Препоръчително е да се разпределят в аликвоти и да претърпяват възможно по-малко цикли на размразяване и замразяване. Непосредствено преди работа реагентите се поставят на стайна температура върху сух лед, далече от пряка светлина. След размразяване, всички компоненти се центрофугират за кратко, за да се осигури хомогенността на реактивите преди употреба. Многократното размразяване и замразяване (повече от 3 пъти) е недопустимо, тъй като това може да намали чувствителността на анализа. Компонентите се замразяват разпределени в малки количества.

Изпълнение на метода

7.1 Приготвяне на PCR Мастер Микс за количествено определяне на HBV-DNA

Използват се реактиви на фирмата на Applied Biosystems за Taq Man анализ-Taq Man Universal Master Mix(2x), прав праймер, обратен праймер, Taq Man probe (сонда).

След изолиране на DNA от пробата, се подготвя амплификационна реакция, която съдържа: PCR микс (dNTPs,буфер, Taq Pol, MgCl_2), прав праймер, обратен праймер, флуоресцентна сонда (проба) и ДНК темплейт. Крайната концентрация на праймерите е 900 nM, на сондата е 250 nM и реакционния обем е 50 μl . В гнездата на плаката се отпипетират по 45 μl от реакционата смес и 5 μl ДНК (Табл. 6) . Тъй като при Real time PCR се извършва многоетапна флуоресцентна детекция се използват оптично пропускливо фолио и плаки, съобразени с апарата. Мастър миксът се приготвя задължително върху лед. В серията се включват винаги – положителна проба, негативна контрола за етапа на изолиране на ДНК и негативна контрола на амплификационния етап. За построяването на стандартна крива се използват стандарти Clonit, представляващи цялостен вирусен геном клониран в плазмид. След накапване на пробите върху плака, тя се покрива с адхезионно оптично фолио. При наличие на въздушни мехурчета в гнездата, плаката се центрофугира за 1 минута на

3000 оборота. Приготвената плака се поставя в апарат Applied Biosystems 7500 и се създава работен протокол за амплификация, използвайки софтуер на апарата: SDS v 1.4.

Табл. 6 Реакционни компоненти

Реакционни компоненти	Количество реактив за една проба в μl	Крайна концентрация
PCR микс	25	1X
Прав праймер	2,25	900 nM
Обратен праймер	2,25	900 nM
Taq Man сонда	0,5	250 nM
ДНК	5	
d. H ₂ O	15	

7.2 PCR програма за амплификация

Апарата се стартира предварително за 10-15 мин. преди пускането на амплификационната програма. Тъй като се използват реактиви на фирмата производител, оптимизирани за използвания от нас апарат Applied Biosystem 7500, за въвеждането на методиката се използва PCR програма зададена от производителя за количествен анализ със следните параметри:

1. 50 °C – за 2 мин.
2. 95 °C – за 10мин.
3. 95 °C – за 15 сек.
4. 60 °C – за 1 мин.

стъпка 2- 4 се повтарят 50 пъти.

7.3 Резултати

По получената стандартна крива се изчислява вирусния товар. След приключване на реакцията, резултатите се обработват със софтуер на АВ 7500 и са представят в табличен вид.

Формула за изчисление:

$$(\text{резултат}) * [(\text{обем на елуиране}) / (\text{обем на ДНК в реакцията})] * 5$$

Пример:

$$91.3 * (52 / 5) * 5 = 4747 \text{copies/ml}$$

8. Статистически методи

Сравнителният анализ в болест-асоциативно проучване между болните от хепатит В вирус и здравите неродствени индивиди беше осъществен, чрез χ^2 тест и Fisher exact тест с използване на програмата SPSS v.16.0. При статистически значими разлики между бинарни величини в модела случай/контрола допълнително беше определена стойността на odd ratio (OR) в 95% интервал на достоверност (confidential interval, CI). OR измерва относителния риск в зависимост от броя на засегнатите индивиди (заболели) изложени на анализиращия фактор. OR=1 означава, че двете групи са с еднакъв риск за болестта в зависимост от анализиращия фактор, OR<1 маркира фактора като протективен, докато OR > 1 е показател за рисков фактор.

HLA алелни честоти са анализирани, чрез maximum likelihood анализ с използване на програма Aglequin 1.1. Най-вероятните хаплотипи са определени, чрез EM алгоритъм с използване на същата статистическа програма. Сравненията между трите изследвани групи – оздравели пациенти, пациенти с хронична инфекция и здрава контролна група от българската популация са извършени чрез Chi square или Fisher exact тест, където е необходимо.

Генните честоти за: KIR, HLA-B Bw4 и HLA-Cw група 1 и 2 лиганди, и KIR/лигандни двойки бяха определени за пациенти и контроли, чрез директно броене с използване на статистическа програма SPSS v.16. Индивидуалните KIR хаплотипи и генотипи бяха определени съобразно

международната KIR номенклатура в <http://www.allelefreqencies.net/kir6001a.asp> (фиг.13), а честотното им разпределение във всяка отделна група чрез изброяване.

А: ДНК № 1

Genotype:	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1	
[1=Positive, 0=negative, n=not tested, leave blank for not known]																	
Hapl Group	Genotype ID ¹	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Bx	<u>6</u>																

Б: ДНК №2

Genotype	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1	
[1=Positive, 0=negative, n=not tested, leave blank for not known]																	
Hapl Group	Genotype ID ¹	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Bx	<u>4</u>																

Фиг. 13 Определяне на KIR хаплотипи и генотипи в зависимост от индивидуалния набор KIR гени. За пример е използвано изследването на ДНК-те от два индивида, за които чрез PCR-SSP метод са определени следните KIR генотипи:
А: ДНК № 1: *KIR2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DS1*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *2DP1*, *3DP1*, на които съответства KIR хаплотип Bx, генотип ID6.
Б: №2: *KIR2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DS2*, *2DS4*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *2DP1*, *3DP1*, на които съответства KIR хаплотип Bx, генотип ID4.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Въвеждане, оптимизиране и валидиране на „in house” Real-Time PCR за количествено определяне на HBV-DNA.

1. Въвеждане на метод за количествено определяне на HBV DNA, чрез използване на real time PCR.

За оценка на лабораторния метод и неговата изпълнение, трябва да бъдат определени няколко параметри. Само когато те отговарят на предварително дефинирани критерии, метода може да бъде подходящ за валидиране и приет за рутинен лабораторен метод. Параметри за приемане на метода са следните: аналитична специфичност, аналитична чувствителност, точност, линейност, PCR-ефективност, граница на детекция, граница на количествено определяне (231).

1.1. Аналитична специфичност

Аналитична специфичност се дефинира, като способност на метода да определя негативни резултати в съответствие с негативни, получени от референтен метод.

За валидиране на Real Time PCR, трябва да се използват референтни материали с известни точни концентрации. Клинични проби могат да се използват за валидиране, ако се използва втори метод. Специфичността на олигонуклеотидите (праймери и сонда) трябва да се провери по време на разработване на метода, за да се определи, че методът реагира само с целевата последователност (консервативна част от генома на HBV). Използваните от нас сонда и праймерите имат 100% хололожност с широк обхват клинично-свързани референтни последователности, базирани на задълбочен биоинформатичен анализ. Комплектът праймери и сонда за количествено определяне на HBV-DNA е разработен и оптимизиран от фирмата производител Applied Biosystems. В нашето

изследване ние използвахме предлаганите праймери и сонда като въведохме и валидирахме метода в конкретните лабораторни условия за определяне на HBV-DNA при мониториране на хронично болни пациенти. Праймерите са проверени от производителя за хомология с други известни патогени чрез сравнителен анализ в съществуващата база данни.

Въпреки това допълнително проверихме тяхната специфичност, като използвахме положителни проби за CMV, EBV, ВКV. Нито един от тях не показва фалшиво положителна амплификация. За да изключим неспецифична амплификация се използваха десет серума от лица ваксинирани срещу HBV, положителни за anti-HBs, както и проба на фирмата Affymetrix отрицателна за HBV. Не се установи наличие на фалшиво положителни резултати. Отрицателни проби от ВОК, се определиха като негативни.

1.2 Линеиност и аналитична чувствителност

Аналитична чувствителност (Лимит на детекция -LOD) е най-ниската концентрация или количество на анализа, при което $\geq 95\%$ от пусканията дават положителни резултати при последователни серийни разреждания на международен референтен материал, калиброван референтен материал или проба тествана в рутинни лабораторни условия (COI-95%) (231).

За определяне на аналитичната чувствителност на PCR анализ в реално време се използва калиброван референтен материал (с висок титър на HBV DNA- 1.10^6 copies/ml). С цел да се направи оценка на линейния диапазон, проба с концентрация -5.10^6 copies/ml се разрежда в серия от десетократни разреждания -5.10^6 , 5.10^5 , 5.10^4 , 5.10^3 , 5.10^2 , 5.10^1 , 5 copies/ml (Табл1.) Всяко разреждане се тества трикратно. Получихме стандартна крива с корелационен коефициент 0,99868 и наклон -3.5, интерсепт -43,2. Параметрите са в допустимите граници за количествен real time HBV(233).

Линейността на изследваният от нас метод се определя от линейния обхват за количествено определяне на вирусната DNA. Характеризира се с регресионен коефициент след линейна регресия. Най-ниските и най-високите концентрации на анализа, които могат да бъдат открити с приемлива точност в рутинни лабораторни условия, определят линейния обхват на метода. (Лимит на количествено определяне LOQ). Въз основа на направените анализи се установи, че аналитичната чувствителност на метода е 5 copies/ml, а линейният диапазон на метод в границите – 5 - 5.10⁶ copies/ml (Табл 7.).

Табл. 7 Диапазон на количествено определяне

Разреждане на HBV DNA	Прагов цикъл (Th)	Вирусен товар в copies/ml	Титърна група
10⁰	22,5	5 000 000	висока
10⁻¹	25,8	500 000	
10⁻²	29,2	50 000	
10⁻³	33,2	5 000	ниска
10⁻⁴	35	500	
10⁻⁵	37.9	50	
10⁻⁶	41	5	много ниска

1.3 Характеристики на PCR-ната реакция

1.3.1. Амплификационна ефективност

Съществуват два основни метода за количествено определение при real time PCR- абсолютно и относително. За определяне на вирусната концентрация използвахме абсолютно количествено определяне, който е метод използващ стандартна крива. Показателят амплификационна ефективност може да се определи от стандартна крива, построена от десетократни серийни разреждания на вирусна DNA в рамките на динамичния обхват на метода. Всяко разреждане се изследва трикратно. Стандартната крива се анализира 10 пъти в различни дни. Ct- стойността на разрежданията се чертаят срещу log от концентрацията на пробите или броя на копията. Наклона се изчислява чрез линейна регресия, в идеалния случай 3,329 отговаря на PCR-ефективност 1. При ефективност равна на едно броя на целевите молекули се удвоява точно след всеки цикъл. Често ефективността се изразява като процентна стойност. Наклон между 3,1-3,6 и ефективност съответно между 90-100% се считат за приемливи. Ефективността (E) зависи от много фактори: PCR- инхибитори, PCR-усилватели, DNA-концентрация, дължина на ампликоните, вторична структура на праймерите. Ефективността изчислена, чрез метода на стандартната крива предполага, че E е равна между количествените стандарти и непознатите проби.

Определя се, чрез следната формула:

$$E = (10^{-1 / \text{наклон}} - 1) \times 100$$

$$E = 10^{(-1/-3.536423)} - 1 \times 100$$

$$= (10^{0.2828} - 1) \times 100$$

$$= (1.91778 - 1) \times 100$$

$$= 0.9178 \times 100$$

$$= 91.78\%$$

1.3.2. Наклон на стандартната крива

Наклонът на стандартна крива при real time PCR, често се използва за оценка на ефективността на амплификацията. Стандартна крива графично се представя като полулогаритмична регресионна линия на Ct стойността срещу логаритъм от вложената нуклеинова киселина. Сто процента ефективност на реакцията ще се получи при 10-кратно увеличение на PCR-ия продукт на всеки 3,32 цикъла по време на експоненциалната фаза на амплификация ($\log_2^{10} = 3,3219$). Стандартната крива с наклон -3.32 показва 100% ефективност на PCR-ната реакция. Ако стандартната крива има регресионен коефициент- R^2 стойност <0.985 , наклон извън обхвата -3,1 до -3,6 и интерсепт Y- извън 37-46, анализът трябва да се повтори (232) Табл.8. Примерна стандартна крива е представена на фиг.14.

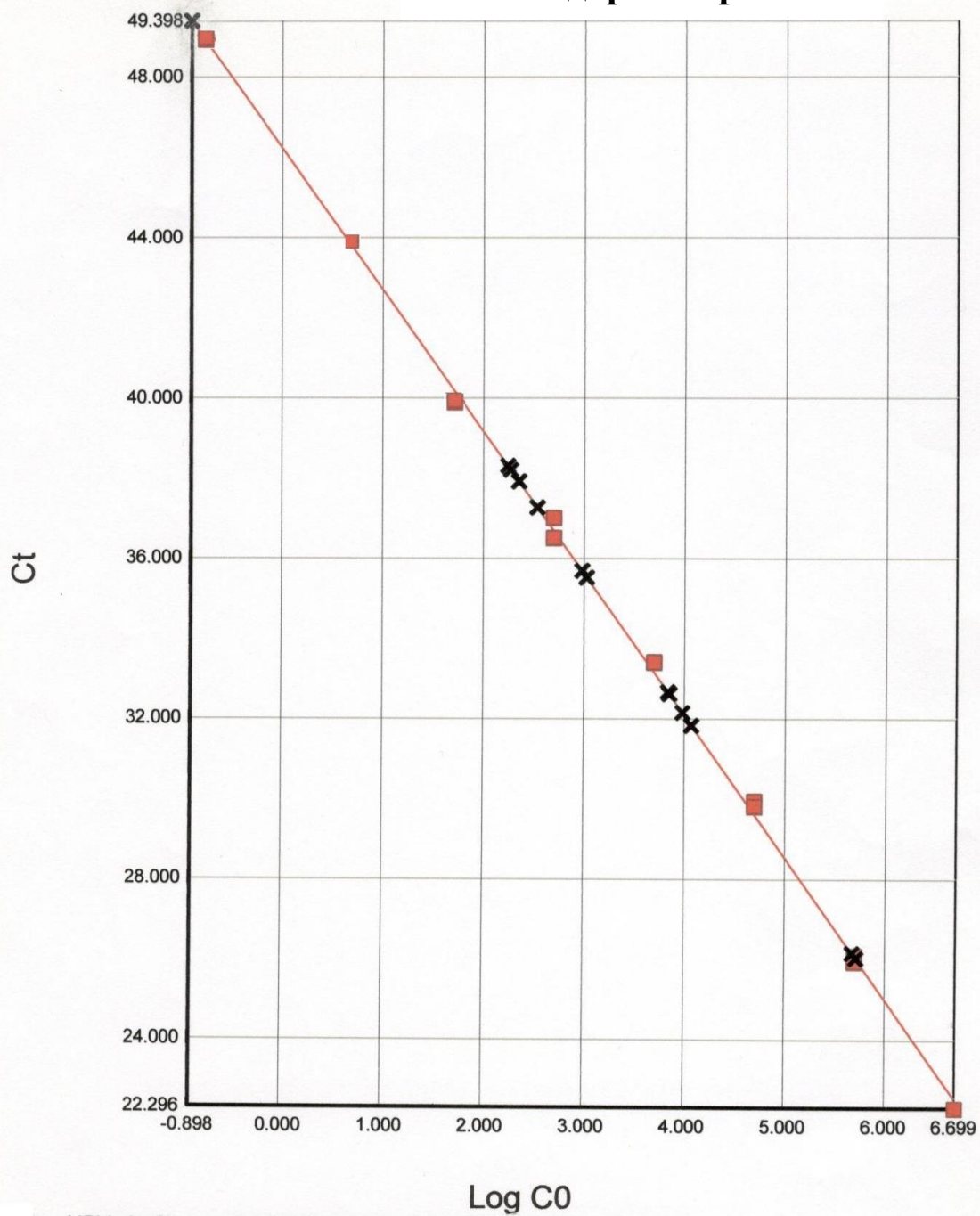
Табл. 8 Характеристика на стандартната крива

	Наклон	Интерсепт	R^2
Серия 1	-3.28	39.1	0.998
Серия 2	-3.25	39.7	0.999
Серия 3	-3.25	39.8	0.999
Серия 4	-3.25	39.9	0.998
Серия 5	-3.25	39.9	0.999

1.3.3 Корелационен коефициент

Друга характеристика на стандартната крива е корелационния коефициент (R^2), показващ до каква степен данните отговарят на стандартната крива. Стойността на R^2 отразява линейността на стандартната крива. В идеалния случай, $R^2=1$, въпреки това 0.999 обикновено е максималната стойност. Интерсепта съответства на теоретичната граница на откриване на реакцията, или стойността C_t , при която най-малък брой копия на прицелни молекули обозначени на оста x е довела до статистически значима амплификация. Въпреки че, теоретично може да се открие единично копие на дадена целева млекула, 2-10 копия е определена като най-ниското целевото ниво, което може да бъде надежно определено чрез количествен real time PCR (234).

Стандартна крива



Фиг. 14 Стандартна крива с ефективност 91,8% на реакцията.

1.4. Точност

Точността (повторяемост и възпроизводимост) се дефинира като ниво на съответствие на индивидуалните тестови резултати в рамките на една амплификация (intra assay) и между отделни амплификации (inter assay). Характеризира се чрез стандартното отклонение на измерените резултати и коефициент на вариация. Степента на съответствие на измерените или изчислени количества към тяхната действителна (истинска) стойност може да се определи, чрез анализ на референтен материал или сравнение на резултатите с тези, получени от референтен метод.

Вътрешно-аналитична вариация се оцени при изследване на петкратни повторения на 2 проби - висък и нисък товар на HBV DNA. При анализ на данните, се установи коефициент на вариация (CV%) от 0.63% до 1.04 % за Ct стойност и до 9,2 % за copies/ml HBV DNA. Възпроизводимостта между отделни серии варира от 0.95% до 1.28% за CV% за Ct стойност, и от 0,5 % до 33% CV% copies/ml HBV DNA. За по-лесно интерпретиране и съпоставимост на нашите резултати с in-house методи и комерсиални китове преобразувахме получените резултати в \log_{10} на HBV-DNA в copies/ml. Установихме, че вариабилността в рамките на самата серия на метода - “*intra-assay*”) при изследване на две проби с 5 кратни повторения показва коефициент на вариация % (CV%) и стандартно отклонения \log_{10} на HBV-DNA в copies/ml, съответно 0.7% и 0.04. При “*inter-assay*“ - вариабилност на метода между няколко серии при изследването на 3 проби в рамките на десет последователни дни, показва коефициент на вариация % (CV%) и стандартно отклонения \log_{10} на HBV-DNA в copies/ml, съответно 4,9 % и 0,33 (табл. 9).

Табл. 9 Възпроизводимост в „*inta-assay*“ и „*inter-assay*“ при \log_{10} от copies/ml HBV-DNA

HBV-DNA (\log_{10} copies/ml)	Intra-assay (\log_{10} copies/ml)			Inter-assay (\log_{10} copies/ml)		
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Коефициент на вариация (%)	Средна стойност	Стандартно отклонение	Коефициент на вариация (%)
Проба 1	7.19	0.04	0.5	5.42	0.027	0.5
Проба 2	2.68	0.02	0.72	2.97	0.14	4.9
Проба 3				8.33	0.33	4.0

Табл. 10 Стойности на Ct и HBV-DNA (copies/ml) при проби използвани за оценяване на повторяемостта на метода.

Проба	Ct-стойност	HBV-DNA (copies/ml)
1	20,15	$1.6875 \cdot 10^7$
1	20,14	$1.7372 \cdot 10^7$
1	20,16	$1.5536 \cdot 10^7$
1	19,86	$1.3875 \cdot 10^7$
1	20,10	$1.4822 \cdot 10^7$
2	36.33	491
2	36,34	487
2	36,59	464
2	36,8	448
2	36.25	505

Табл. 11 Стойности на Ct и HBV-DNA (copies/ml) използвани за изчисляване на вариацията на пробите в различни дни.

Ct	1 Ден	2 Ден	3 Ден	4 Ден	5 Ден	6 Ден	7 Ден	8 Ден	9 Ден	10 Ден
Проба 1	33,08	33,00	32,82	33,5	33,7	33,00	32,82	33,46	33,28	33,4
Проба 2	29,18	29,26	29,64	30,06	30,06	29,26	29,43	30,16	29,95	29,9
Проба 3	25,5	25,53	25,44	26,32	26,43	25,53	25,44	26,52	26,37	26,32
Проба 4	22,1	22,10	22,45	22,15	22,31	22,10	22,45	22,49	22,74	22,2
Проба 5	36,9	36,48	36,6	36,8	36,57	36,83	36,44	36,24	36,77	36,5
Log ₁₀ HBV-DNA	1 Ден	8 Ден	8 Ден	4 Ден	5 Ден	8 Ден	8 Ден	8 Ден	9 Ден	10 Ден
Проба 1	5.37	5.39	5.45	5.43	5.43	5.41	5.40	5.42	5.46	5.43
Проба 2	3.15	2.84	3.20	2.78	2.99	2.98	2.93	2.99	3.09	2.78
Проба 3	8.40	8.42	8.45	8.46	8.36	8.56	8.43	8.43	7.39	8.41

2. Валидиране на метод за количествено определяне на HBV DNA, чрез използване на real time PCR.

Метода е валидиран, чрез използването на референтни материали – проби с известни концентрации, посредством участие във външен качествен контрол – INSTAND e. V. Разработената от нас in-house методика показва успешно преминаване на 4 качествени контроли и получи сертификати за количествено и качествено определяне на HBV-DNA. Част от резултатите са представени на Табл. 12.

Табл.12 Консенсусни резултати от ВОК схема (INSTAND e. V.- 06. 2010г).

Проба	Резултат (HBV-DNA copies/ml)	INSTAND e. V (HBV-DNA copies/ml \pm 1 \log_{10} от средната стойност)	INSTAND e. V (HBV-DNA copies/ml \pm 0,25 \log_{10} от средната стойност)
31001	2500	248 - 24 750	1390- 4401
31002	98 000	11 000 - 1 100 000	61 858- 195 611
31003	Отр.	Отр.	Отр.
31004	8350	890 - 89 000	5005-15 827

Получените резултати се намират в близост до средните на консенсусните стойности на референтните проби и попадат в тесния доверителен интервал $\pm 0.25 \log_{10}$ на средната стойност.

Въведеният от нас метод е с добра клинична чувствителност, специфичност и възпроизводимост, широк линеен обхват, съчетано с малък обем на пробата и ниска цена. Анализът има добра клинична чувствителност 5 copies/ml при използване на проба с първоначален обем 200 μ l и 6 \log_{10} линеен динамичен обхват, без необходимост от разреждане, добра клинична възпроизводимост между сериите - до 33% CV% copies/ml HBV DNA. Тези резултати са в съответствие с предишни изследвания, описващи подобни in-house методи (236, 237, 238), както с данни за вариабилност, възпроизводимост, чувствителност и линейност, описани в предлаганите комерсиални китове (238).

II. Проучване връзката на HLA клас I и клас II генен полиморфизъм с предразположеността към хепатит В вирусната инфекция и отговора към интерферон и нуклеот(з)идни аналози при HBV инфектирани пациенти. Изследване на вирусния генотип.

Чрез въведената и валидирана методика за количествено определяне на HBV-ДНК се проследиха 118 хронично инфектирани пациенти. Петдесет и седем от тях бяха изследвани многократно през период от 3 или 6 месеца (в продължение на среден период от две години) в етапа на диагностициране на хроничната инфекция, включване на антивирусна терапия и по време на антивирусното лечение. Пациентите бяха разпределени в 3 групи - скрининг (n=22), терапия с нуклеот(з)идни аналози (n=25), терапия с интерферон- α (n=12). Описаните пациенти се типизираха за HLA-A, B, DRB1 локусите с цел да се проучи влиянието HLA клас I (-A и -B) и клас II (-DRB1) полиморфизма за вирусната репликация и флукуацията на вирусния товар при лечение с нуклеот(з)идни и интерферон- α .

Установиха се алели със сигнификантна значимост в групата на пациентите лекувани с нуклеот(з)идни аналози – Tenofovir, Lamivudine, Entecavir. Те са разделени на две подгрупи-добър и незадоволителен терапевтичен отговор, в зависимост от наличието или липсата на флукуация на вирусния товар - до 10 000 копия/мл след спада на вирусната ДНК и получаване на отрицателен резултат за HBV-ДНК. При 11 от пациентите се установи флукуация на вирусния товар - незадоволителен терапевтичен отговор, а при 14 от тях - добър терапевтичен отговор.

Анализът на данните показва добър терапевтичен отговор при пациентите, които носят HLA-A*24 антигена (one-tailed Fischer's exact $p = 0.020$), докато носителството на HLA-DRB1*14 антигена се асоциира с незадоволителен терапевтичен отговор (one-tailed Fischer's exact $p = 0.047$). При пациентите с добър терапевтичен отговор най-честите алели са A*24, B*35, DRB1*11, а при пациентите с незадоволителен терапевтичен отговор A*01, A*02, B*35, DRB1*14. Наблюдаваните алелни честоти при пациентите от двете подгрупи са представени в табл.13.

Табл. 13 HLA алелни честоти при пациенти лекувани с нуклеот(з)идни аналози.

HLA алел	Добър терапевтичен отговор (n=14)	Незадоволителен терапевтичен отговор (n=11)	p
A*01	0.1021	0.2273	
A*02	0.1301	0.2273	
A*03	0.0769	0.1818	
A*11	0.1154	0.0455	
A*24	0.3561	0.0909	p = 0.020
A*25	0	0	
A*26	0.0769	0.0455	
A*33	0	0.0909	
A*66	0	0.0877	
A*68	0.0385	0.0455	
A*69	0	0.0455	
B*07	0.0357	0.0632	
B*08	0.0714	0.1364	
B*18	0.0714	0.1154	
B*27	0.0357	0.0455	
B*35	0.2240	0.2273	
B*38	0.0357	0	

B*39	0.0357	0	
B*41	0.0714	0	
B*44	0.0857	0.0455	
B*49	0	0.0455	
B*50	0.0357	0	
B*51	0.1629	0.1364	
B*55	0.0357	0	
B*56	0	0.0455	
B*57	0.0357	0.0455	
B*58	0	0.0455	
DRB1*01	0.1154	0.1000	
DRB1*03	0.1538	0.2000	
DRB1*04	0.0385	0	
DRB1*07	0.1461	0	
DRB1*10	0.0385	0.1000	
DRB1*11	0.2692	0.1500	
DRB1*12	0.0385	0	
DRB1*13	0	0.0500	
DRB1*14	0.0385	0.2500	p = 0.047
DRB1*15	0.0385	0.1000	
DRB1*16	0.1054	0.0500	

От проведения анализ на HLA-A-B и HLA-A-B-DRB1 хаплотипни честоти единствено хаплотипа A*24-B*35 се асоциира с добър отговор на лечение с нуклеот(з)идни аналози –

статистическият анализ показва гранично ниво на сигнификантност (one-tailed Fischer's exact $p = 0.062$). Само при един от пациентите с добър терапевтичен отговор се установи пълна сероконверсия (наличие на анти-HBs).

При изследване на HLA алелни и хаплотипни честоти при пациенти, лекувани с интерферон ($n=12$), не се установиха алели и хаплотипи свързани с отговора към терапия, тъй като всички изследвани пациенти имат вирусен товар в края на лечението и през 1-годишния период на наблюдение след приключване на лечението. При повишаването на HBV-ДНК пациентите са повторно включени на антивирусно лечение, но този път с нуклеот(з)идни аналози. Най-честите алели са HLA-A*24, B*18, B*35, DRB1*11.

При изследване на третата група пациенти (етап скрининг - първо изследване при диагностициране на хронична инфекция) не се установиха HLA алелни и хаплотипи протективни или предразполагащи за висок или нисък вирусен товар. Най високата измерена стойност е 1 120 000 копия/мл, а най- ниската – 25 копия/мл (средно $64370 \pm 12\,345$ копия/мл). При пациентите с висок товар най-честите алели са B*51, DRB1*14, а при пациентите с нисък съответно B*35, DRB1*03. Честотното разпределение е показано в Табл.14.

Табл. 14 HLA алелни честоти при новодиагностицирани пациенти

HLA алел	Висок вирусен товар (n=8)	Нисък вирусен товар (n=15)
A*01	0.0625	0.1667
A*02	0.5000	0.3667
A*03	0.0625	0.0667

A*11	0.1875	0.1000
A*24	0.0625	0.1000
A*26	0.0625	0.1000
A*32	0.0625	0.0333
A*66	0	0.0333
A*68	0	0.0333
B*07	0	0.0333
B*08	0.1250	0.1000
B*13	0	0.0333
B*15	0.0625	0.0667
B*18	0.1250	0.0667
B*27	0	0.0333
B*35	0.1250	0.2333
B*38	0.0625	0
B*40	0	0.100
B*41	0.0625	0.0333
B*44	0.0625	0.0667
B*49	0	0
B*50	0.0625	0
B*51	0.1875	0.1000
B*55	0	0
B*56	0	0.0333
B*57	0.0625	0.0333

DRB1*01	0.0714	0.1786
DRB1*03	0.2143	0.2500
DRB1*04	0	0.1714
DRB1*07	0.2143	0.1714
DRB1*09	0.0714	0
DRB1*11	0.1429	0.1786
DRB1*12	0	0.0357
DRB1*13	0	0.0357
DRB1*14	0.2143	0.0357
DRB1*15	0	0
DRB1*16	0.0714	0.1429

Съществуват оскъдни данни за влиянието на HLA генния полиморфизъм при лечението на пациенти с хроничен хепатит В с интерферон- α или нуклеот(з)идни аналози. Проучване в Корея установява, че при лечение с Lamivudine HLA-Cw 1 и HLA-DRB*14 алели са свързани с липса на терапевтичен отговор, а HLA-A2 и HLA-DRB4 с добър терапевтичен отговор и сероконверсия. Пациентът със сероконверсия в нашето проучване е хомозигот- HLA-A*02 (239) . Han N. и сътр. установяват, че HLA-DRB1*14 алела може да се асоцира с добър, а HLA-DQB1*07 с лош терапевтичен отговор при интерферонова терапия (240).

Човешките левкоцитни антигени (HLA) са неразделна част от имунния отговор. Силно полиморфни HLA гени могат да играят ключова роля в отговора на антивирусна терапия и нивото на вирусната ДНК при хронична инфекция. Установените от нас антигени и хаплотипи могат да се използват като прогностични и предиктивни биомаркети при хронична HBV инфекция.

Носителството на конкретен HBV генотип може да бъде асоциирано с някои особености в протичането на заболяването и елиминирането на вируса от организма. Смята се, че вирусният товар е основния фактор, формиращ риска от късни последствия на инфекцията с HBV, особено риска от развитие на хепатоцелуларен карцином (241,242). Изследването на генотипа на вируса може да се изследва при подбора на пациенти, подходящи за лечение с интерферонові препарати, поради диференциалното повлияване в зависимост от генотипа на HBV, инфектирал съответния болен (243).

В настоящото проучване генотипите на HBV бяха изследвани от една страна, за да определим генетичната компонента на вируса и от друга да допринесем за характеризиране на разпространението на HBV генотипите сред хепатитно болните в нашата страна. С оглед дефинираните в хода на въвеждане детекционни граници на методиката, за генотипизиране бяха подбрани само вирусни ДНК, изолирани от пациенти с вiremия > 1000 копия/мл. От изследваните 108 индивида установихме при 106 наличие на генотип D, а при двама – на генотип A. Изследваната от нас група пациенти са носители на най-често срещания в Южна Европа и Средния изток генотип D на хепатит B вируса(244). Нашите резултати потвърждават, че този HBV генотип е най-разпространен и у нас (2).

III. Проучване на HLA клас I (-A и -B) и клас II (-DR) генетичен полиморфизъм при хронично инфектирани с HBV и спонтанно оздравели пациенти.

В настоящата работа изследвахме разпределението на HLA клас I (-A и -B) и клас II (-DRB1) алелите и хаплотипите при общо 77 пациента: 20 спонтанно оздравели след остър хепатит и 57 хронично болни. Получените данни бяха сравнени с 204 здрави индивида от българската популация.

Наблюдаваните алелни честоти при индивидите от двете групи са представени на табл. 1. Не се установи отклонение от равновесието на Hardy-Weinberg. Общо двадесет и един HLA-B и 15 HLA-A, и 13 HLA- DR алела бяха идентифицирани при изследваните HLA клас I и II локуса.

Табл. 1. HLA алели при пациенти с хроничен хепатит В, оздравели от HBV и здрави контроли.

HLA алел	Оздравели (n=20)	Хронична инфекция (n=57)	Контроли (n=204)	P
A*01	0.15000	0.15789	0.1299	
A*02	0.30000	0.28947	0.3015	
A*03	0.10000	0.09649	0.0801	
A*11	0	0.08772	0.0686	
A*23	0.02500	0	0.0392	
A*24	0.20000	0.15789	0.1300	
A*25	0.05000	0	0.0172	OR -5.56; p-0.019
A*26	0.10000	0.07018	0.0539	
A*29	0.02500	0.01754	0.0122	

A*30	0.02500	0.02632	0.0172	
A*31	0	0	0.0319	
A*32	0	0.01754	0.0466	
A*33	0	0.01754	0.0221	
A*36	0	0	0.0049	
A*43	0	0	0.0025	
A*66	0	0.00877	0.0025	
A*68	0.02500	0.02632	0.0245	
A*69	0	0.00877	0.0123	
A*80	0	0	0.002	
B*07	0.10000	0.04386	0.0466	
B*08	0.07500	0.13158	0.0515	OR-2.94, p-0.0018
B*13	0	0.02632	0.0172	
B*14	0	0	0.0196	
B*15	0.02500	0.02632	0.0294	
B*18	0.15000	0.10526	0.0882	
B*27	0.05000	0.03509	0.0466	
B*35	0.15000	0.21053	0.1495	OR-1.78, p-0.03
B*37	0	00	0.0074	
B*38	0.02500	0.02632	0.0294	
B*39	0.05000	0.00877	0.0221	
B*40	00	0.03509	0.0637	

B*41	0.02500	0.03509	0.0147	
B*44	0.17500	0.06140	0.0882	OR-3,24; p-0,032
B*45	0	0	0.0025	
B*47	0	0	0.0098	
B*48	0.02500	0	0	
B*49	0	0.00877	0.0245	
B*50	0.02500	0.01754	0.0221	
B*51	0.10000	0.15789	0.1544	
B*52	0.02500	0	0.0343	
B*53	0	0	0.0123	
B*55	0	0.00877	0.0147	
B*56	0	0.01754	0.0049	
B*57	0	0.03509	0.0343	
B*58	0	0.00877	0.0123	
DRB1*01	0.07500	0.11404	0.1029	
DRB1*03	0.07500	0.21053	0.0931	OR-2.36, p-0.002
DRB1*04	0.07500	0.04386	0.0858	
DRB1*07	0.10000	0.11404	0.0686	
DRB1*08	0.02500	0	0.0270	
DRB1*09		0.00877	0.0049	
DRB1*10	0.02500	0.01754	0.0147	
DRB1*11	0.12500	0.20175	0.2034	

DRB1*12	0.02500	0.01754	0.0074	
DRB1*13	0.10000	0.02632	0.1103	OR-0.21, p-0.006
DRB1*14	0.10000	0.10526	0.0613	
DRB1*15	0.05000	0.03509	0.0637	
DRB1*16	0.17500	0.10526	0.1569	

Сравняването на алелното разпределение показва статистически достоверни повишени честоти на HLA- A *25 и В *44 алелни групи при пациенти, оздравели от инфекцията в сравнение с тези с хронична инфекция и контролната група. Предразполагащи за хронифициране на инфекцията бяха установени HLA-B*08, В*35, DRB1*03 алелни групи, докато DRB1*13 беше намерен със статистически значима понижена честота (табл. 15).

Табл.15 HLA алели и хаплотипи асоцирани с вирусен клирънс или вирусно персистиране при хепатит В.

Алели асоцирани с клирънс	Оздравели n=20	Хронични n=57	Контроли (n=204)	OR	P
A*25	0.05000	0	0.0172	5,56	0,019
B*44	0.17500	0.06140	0.0882	3,24	0,32
DRB1*13	0.10000	0.02632	0.1103	0,21	0,006
Алели асоцирани с вирусно персистиране					
B*08	0.13158	0.0515	0.0515	2,94	0,00018
B*35	0.15000	0.21053	0.1495	1,78	0,03
DRB1*03	0.07500	0.21053	0.0931	2,36	0,002
Хаплотипи асоцирани с вирусно персистиране					
A* 01 B*08 DRB1*03	0	0.5263	0.0286		
A* 24 B*35 DRB1*11	0	0.04386	0.00274		

При пациентите с хронична инфекция бяха намерени 11 хаплотипа с повишена честота в сравнение с контролната група, които не са установени при оздравелите пациенти. Сред тези хаплотипи, най-чести са А-01 В-08 DRB1-03 като честотата на А-24 В-35 DRB1-11 хаплотипа е 21

пъти по-висока в групата на хронично болните пациенти в сравнение с честотата на хаплотипа в здравите контроли (Табл. 16).

Анализът на най-вероятните хаплотипи показва преобладаване на следните хаплотипи при оздравелите пациенти: A-02 B-18 DRB1-11, A-02 B-44 DRB1-16, A-02 B-35 DRB1-01, A-03 B-44 DRB1-14, A-24 B-44 DRB1-13. Посочените хаплотипи не бяха намерени при пациентите с хронична инфекция, докато честотата им в здравата контролна група беше значимо по-ниска.

Табл. 16 HLA хаплотипи алели при пациенти с хроничен хепатит В, оздравели от HBV и здрави контроли.

HLA хаплотип	Оздравели (n=20)	Хронична инфекция (n=57)	Контроли (n=204)
A-02 B-18 DRB1-11	0.07500	0	0.0309
A-02 B-44 DRB1-16	0.07500	0	0.00735
A-02 B-35 DRB1-01	0.05000	0	0.0217
A-03 B-44 DRB1-14	0.05000	0	0
A-24 B-44 DRB1-13	0.05000	0	0
A-01 B-08 DRB1-03	0	0.05263	0.0286
A-01 B-51 DRB1-01	0	0.02632	0.00245
A-02 B-08 DRB1-03	0	0.02632	0.00257
A-02 B-13 DRB1-07	0	0.01754	0.00245
A-02 B-18 DRB1-16	0	0.01754	0.00505
A-02 B-35 DRB1-16	0	0.02632	0.0128
A-02 B-40 DRB1-03	0	0.02632	0

A-02 B-51 DRB1-11	0	0.02632	0.0269
A-03 B-35 DRB1-04	0	0.01754	0.00735
A-03 B-35 DRB1-11	0	0.02632	0.0123
A-11 B-51 DRB1-14	0	0.01754	0.00245
A-24 B-35 DRB1-11	0	0.04386	0.00274

В настоящата работа проучихме генетичния полиморфизъм на HLA системата (HLA клас I –A, B и HLA клас II - DRB1, локусите) при пациенти спонтанно оздравели от HBV, хронично болни и здрави контроли от български произход с оглед обогатяване на данните от световната литература за връзката на HLA гените и изхода от HBV в контекста на нашата популация. Днес се приема, че полиморфните варианти в гени, кодиращи молекули на имунния отговор играят важна роля в предразположеността и развитието на инфекциозните заболявания. През последните години генетичната предразположеност към хепатит В инфекция е проучвана усилено в различни етнически групи и е установена асоциация с полиморфните гени на имунния отговор, включително и HLA гените (245).

Повечето проучвания са съсредоточени върху ролята на клас II молекулите, поради ключовата им роля в инициране на имунния отговор. Сравнително малко са данните за значението на HLA клас I гените за предразположеността и протичането на хепатит В инфекцията (246). Ето защо данните показват статистически значими асоциации както с клас I, така и с клас II. Като цяло алелите на клас I оказват влияние в хода на болестта, което предполага, че CD8+ цитотоксични Т лимфоцити са важни за вирусния клирънс или персистиране. Тази констатация е установена и при шимпанзета заразени с HBV, неспособни да елиминират вируса при понижени CD8+ Т клетки (247).

Установените предразполагащи и протективни алели за хроничност при HBV в световната популация са представени в литературния обзор на табл.1 и табл. 2 съответно.

HLA-B*08 алелът се среща сравнително често в нашата популация ($p=0.0515$), но сред хронично болните се установява с по-висока честота ($p=0.13158$). Рискът, индивидите, носещи този алел да развият хроничен хепатит е приблизително 2,3 пъти по-висок в сравнение с този за общата популация. Тези резултати корелират с данните получени от Sung и сътр., Pol и сътр., Patersun.

Установената от нас статистически значима повишена алелна честота на DRB1*13 в групата на спонтанно оздравелите потвърди протективната роля на DRB1*13 и неговите алелни варианти DRB1*1301 и DRB1*1302, демонстрирани в независими проучвания в няколко мета анализи (245, 248) От друга страна HLA DRB1*13 се отчита като предаразполагащ ген за хронична HBV инфекция за турското население (174). Предстои тези данни да бъдат потвърдени, поради относително малкия брой на изследваните пациенти ($n=20$). Предполага се, че протективната роля на DRB1*13 се дължи на ефективното антигенно представяне на DRB*13 молекулите или на полиморфизми в съседен имуно-регулаторен ген. Интерес представлява факта, че DRB1*13 има предпазваща роля за вертикално предаване при HCV, HIV, HPV и маларийна инфекция (249).

Установената от нас статистически значима повишена честота на DRB1*03 при пациентите с хронична инфекция, подкрепя данните от други проучвания демонстриращи асоциация на тази алелна група с понижен антителин отговор и персистираща инфекция в китайската Хан група и други етнически групи (248). Резултатите могат да бъдат обяснени с неефективното представяне на имунодоминантните епитопи на HBsAg от DRB1 *03 молекулите на CD4 + T клетки.

Като допълнителни фактори, асоциирани с развитието на хронична хепатит В инфекция са намерени HLA клас I алелните групи: В*08, В*35. Алелът HLA- В*35 е установен като предразполагащ в различни проучвания, проведени при пациенти от Русия, Китай, САЩ, Турция и Сенегал (177, 250), както и рисков фактор за по-бързо прогресиране на HIV. (251)

Алелът HLA-B *08 е сравнително чест в българската популация ($p - 0.0515$), но с по-висока честота при хора с хронична инфекция ($p -0.13158$). Рискът за лицата, носещи HLA-B *08, да развият хроничен HBV е приблизително 2.3 пъти по-висок в нашата популация. Честотата на HLA антиген В*08 е по-висока при индивиди, които не са в състояние да развият антителин отговор след ваксинация HBV. HLA-B * 08 и неговия разширен хаплотип е свързан с

други имунно-медирирани заболявания, като автоимунен хепатит. Karan и сътр. установиха, че HLA-B *08 и DRB1*03 са свързани с висок риск за хроничен HBV (174). HLA-B * 08 е свързан с вирусна резистентност или самостоятелно, или като част от кавказкия хаплотип А *01- В * 08-DRB1 *03 (ancestral).

Нашите данни показват статистически значима повишена честота на HLA-A*25 и В*44 при пациентите, оздравели от хепатит В в сравнение със здравата контролна група и пациентите с хронична инфекция. Това предполага възможна роля на тези алели като предразполагащ фактор за развитие на хепатит В, но свързан с по-добра възможност за изчистване на вирусната инфекция.

Поради комплексната роля на отделните HLA локуси в развитието на имунния отговор е необходимо проучване на ролята на хаплотипите за развитие на инфекциозния отговор. Понастоящем тези данни се сравнително ограничени. В нашето проучване са анализирани хаплотипните асоциации при хепатит В инфекцията и са установени значими разлики в хаплотипното разпределение, вероятно свързани с различната форма на протичане на заболяването. Интерес представлява значително повишената честота на А-01 В-08 DRB1-03 хаплотипа при пациентите с хронична инфекция. Посоченият хаплотип е намерен като предразполагащ при редица инфекциозни и автоимунни заболявания. Функционални изследвания на пациенти с този хаплотип показват дефект в ранната Т клетъчна активация (252), намалено производство на цитокини – тип 1, включително INF- γ , IL-2, IL-12.(253) и намалена НК клетъчна активност (254). Въпреки това не е изяснен нито точния механизъм, нито точния ген отговорен за това, но се запазва вероятността HLA-B*08 да е частично отговорен за тези фенотипи.

Честотата на HLA- А*24 В*35 DRB1*11 хаплотипа е 21 пъти по-висока в сравнение с честотата на този хаплотип сред здравите контроли. Няма данни за установяването му като предразполагащ в други проучвания.

Проучването на HLA гените показа, че предразполагащи за хронифициране на инфекцията в нашата популация са алелните групи: HLA-B*08, В*35, DRB1*03, докато HLA-A*25, В*44 и DRB1*13 алелни групи са протективни. Значително повишена е честотата на HLA- А*01 В*08 DRB1*03 хаплотипа при пациентите с хронична инфекция. Поради хетерогенността на HLA

алелното разпределение в различни етнически групи, установените болестни асоциации е коректно да се интерпретират в контекста на специфичния популационен генофонд. Остават отворени въпросите кои човешки гени са важни за инфекцията и как да ги открием. Установяването на генетично базирани болестни маркери, предсказващи кои пациенти ще развият хроничен хепатит и прогресиращо чернодробно заболяване и кои ще елиминират вируса е от съществено значение за въвеждане на клинични подходи. Нашето проучване се проведе, за да се определи връзката между някои от HLA алели и изхода от HBV инфекция.

IV. Проучване на KIR генен полиморфизъм при хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти.

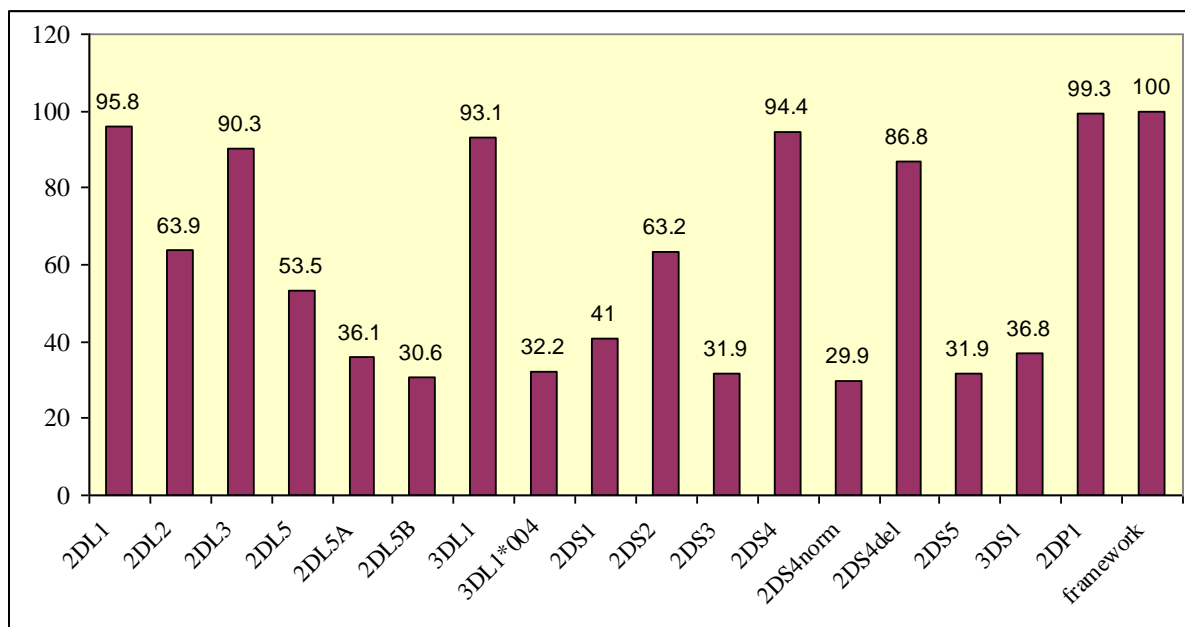
В настоящото проучване бяха сравнени носителството и честотата на 14 KIR гени (7 инхибиращи - 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5 (A/B), 3DL1, 3DL2, 3DL3; 6 активиращи - 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4 (нормален ген – пог и ген с делеция – del), 2DS5, 3DS1, един с предполагаема инхибираща и активираща активност (2DL4) и 2 KIR псевдогени (2DP1, 3DP1), KIR HLA лигандите, както и KIR/HLA лигандните комбинации между пациенти с хепатит В вирусна инфекция и контролна група от случайно подбрани здрави неродствени индивиди от българската популация.

1. KIR гени/псевдогени

Честотите на KIR гените/псевдогените в двете изследвани групи са представени на фиг.14 и табл. 17. Като изключим KIR2DL4, 3DL2, 3DL3, 3DP1, които се срещат при всички изследвани индивиди, най-честите KIRs гени сред пациентите са тези на 2DL1 (95.8%), 3DL1 (93.1%), 2DS4 (94.4%), 2DL3 (90.34%) и на 2DP1 (99.3%) псевдогена. KIR2DL2, KIR2DS2 и KIR2DL5 гените са разпространени също в по-голяма част (над ½) от изследваните, съответно в 63.9%, 63.26% и

53.5%. Със значително по-ниска честота на разпространение (под 50%) са *KIR2DS1*, *KIR3DS1*, *KIR2DS5* и *KIR2DS3*. С най-ниска честота е представен *KIR2DS5* (31.9%). Известно е, че някои *KIR2DL5* алели от *KIR2DL5B* групата са нулеви (255) или кодират функционално неактивни рецептори, които не допринасят за цитотоксичния потенциал на NK клетките. Отдиференцирането на алелните варианти на *KIR2DL5* (*KIR2DL5A* от *KIR2DL5B*) и *KIR2DS4* гените (функционално неекспресирани алели обединени в обща група – *2DS4del/ID* от останалите *KIR2DS4* алели- *KIR2DS4norm*) и *KIR3DL1* гените (нулев алел - *KIR3DL1*004* от останалите *3DL1* алели) показва следните генни честоти: *KIR2DL5A* (36.1%), *KIR2DL5B* (30.6%), *KIR2DS4norm* (29.9%), *KIR2DS4del* (86.8%) и *KIR3DL1*004* (32.2%) при болните.

В здравата българска популация (табл. 17) най-честите инхибиторни KIR гени са *KIR2DL1* (93.7%), *3DL1* (90.4%), *2DL3* (85.7%). *3DL1*004* алелът на *KIR3DL1*, който не кодира функционално активен рецептор, се открива в 17.6% от изследваните здрави контроли. От активиращите KIR гени с най-висока честота е *KIR2DS4* (92.1%), от който нормалният вариант (*KIR2DS4 nor*) е много по-слабо разпространен (20.2%) в сравнение с нулевия вариант (*KIR2DS4 del* – 78.7%). В над 1/2 от изследваните се откриват *KIR2DS2* (65.1%) и *2DL2* (60.3%) гени. Разпространението на *KIR2DL5* при здравите индивиди от българската популация е 65.1%, с малко по-голяма честота на *2DL5B* – 45.5% в сравнение с *2DL5A* – 34.7% варианта. Със сравнително по-ниска честота (под 50%) са *KIR2DS1*, *3DS1*, *2DS5* и *2DS3* гените. Подобно на други европейски популации в здравата българска популация гените за активиращите KIRs са представени с доста по-ниска честота в сравнение с тези, кодиращи инхибиторните рецептори, като само два активиращи KIRs (*2DS4* и *2DS2*) се срещат в над 50% от всички изследвани.



Фиг. 14 Честотно разпределение на KIRs при пациенти с HBV инфекция

Разпределението на изследваните KIR гени и алелни варианти при пациентите с HBV инфекция като цяло не се отличава съществено от това на здравите индивиди от българската популация. Прави впечатление, че за разлика от здравите в общата група болни (с хроничен хепатит В и оздравели) честотата на 2DL5B (30.6%) е по-ниска в сравнение с тази за 2DL5A (36.1%) варианта, което рефлектира в значимо по-ниска честота за KIR2DL5B при болните ($p=0.022$) спрямо контролите. Установена бе също по-висока честота на функционално инертния вариант на KIR3DL1 гена (KIR3DL1*004) сред болните. Беше наблюдавана и слабо изразена тенденция за по-нисък процент на KIR2DL5 (като цяло) и на KIR3DS1 позитивни индивиди в групата на заболялите сравнено със здравите контроли (табл. 2).

Допълнително беше направен сепариран сравнителен анализ KIR генните честоти в подгрупите на болни с HBV инфекция – с хроничен хепатит В и преболедали, но оздравели от остра HBV инфекция (табл. 2).

Табл. 17 KIR генни честоти при пациенти с HBV инфекция и здрави контроли

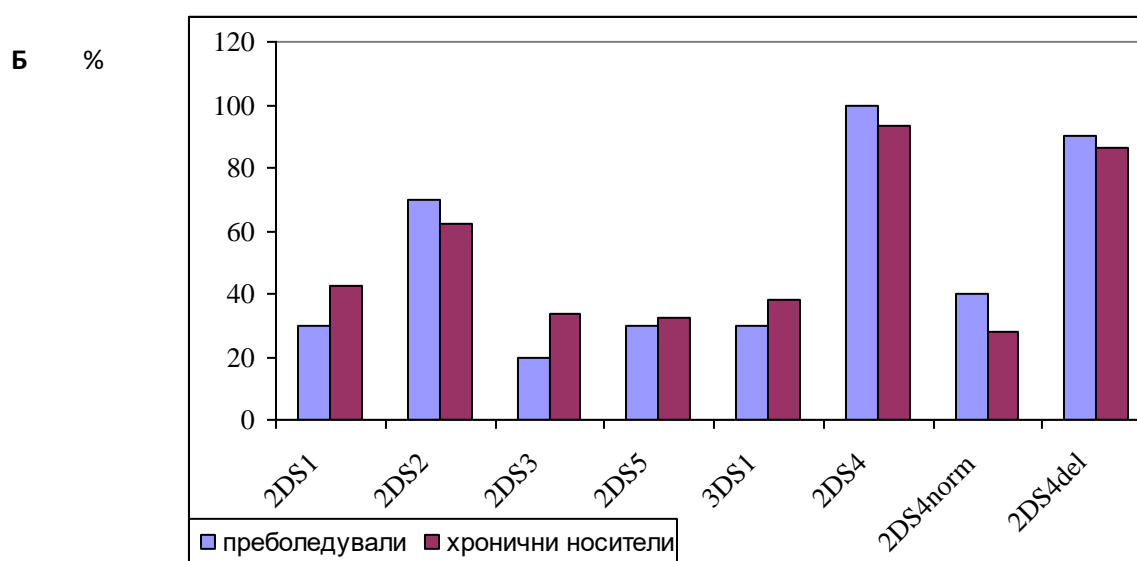
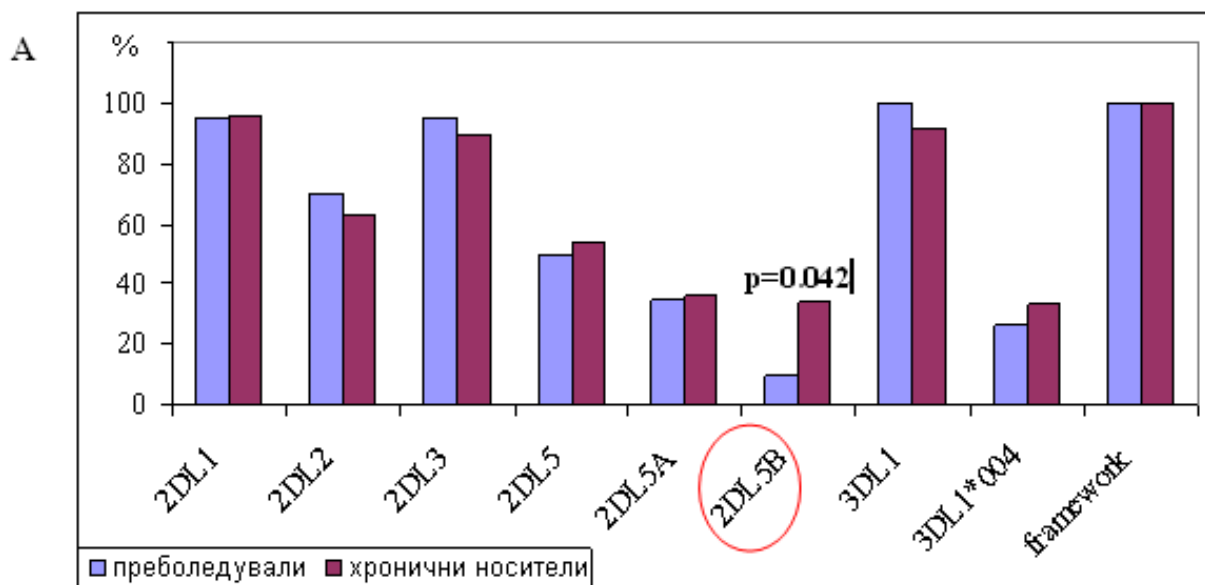
KIR ген	Здрави (n=126) n (%)	Болни (n=144) n (%)	Хронични носители (n=124) n (%)	Преболедували (n=20) n (%)
<i>3DL2;</i> <i>3DL3;</i> <i>3DP1</i>	126 (100)	144 (100)	124 (100)	20 (100)
<i>2DL4</i>	125 (99.2)	144 (100)	124 (100)	20 (100)
<i>2DP1</i>	122 (96.8)	143 (99.3)	123 (99.2)	20 (100)
<i>2DL1</i>	118 (93.7)	138 (95.8)	119 (96.0)	19 (95.0)
<i>2DL2</i>	76 (60.3)	92 (63.9)	78 (62.9)	14 (70.0)
<i>2DL3</i>	108 (85.7)	130 (90.3)	111 (89.5)	19 (95.0)
<i>2DL5</i>	82 (65.1)	77 (53.5) p=0.053, OR 0.62[0.37-1.04]	67 (54.0)	10 (50.0)
<i>2DL5A</i>	#42 (34.7)	52 (36.1)	45 (36.3)	7 (35.0)
<i>2DL5B</i>	#40 (45.5)	44 (30.6) p=0.022, OR 0.53[0.29-0.95]	42 (33.9)	2 (10.0) p=0.003, OR 0.13[0.02-0.63]
<i>2DS1</i>	57 (45.2)	59 (41.0)	53 (42.7)	6 (30)

2DS2	82 (65.1)	91 (63.2)	77 (62.1)	14 (70.0)
2DS3	48 (38.1)	46 (31.9)	42 (33.9)	4 (20.0)
2DS4	116 (92.1)	136 (94.4)	116 (93.5)	20 (100)
2DS4norm	##18 (20.2)	43 (29.9)	35 (28.5)	8 (40.0)
2DS4del	##70 (78.7)	125 (86.8)	107 (86.3)	18 (90.0)
2DS5	48 (38.1)	46 (31.9)	40 (32.3)	6 (30.0)
3DS1	60 (47.6)	53 (36.8)	47 (37.9)	6 (30.0)
		p=0.072, OR 0.64[0.38-1.07]		
3DL1	114 (90.5)	134 (93.1)	114 (91.9)	20 (100)
3DL1*004	'13 (17.6)	46 (32.2)	41 (33.1)	5 (26.3)
		p=0.022, OR 2.23[1.06-4.74]	p=0.018, OR 2.3[1.1-4.7]	

n=85, ## n=89, ' n=74, * статистически достоверна разлика при сравняване на групата пациенти със здрави неродствени контроли, [] 95 % интервал на достоверност

В съответствие с вече установената по-висока честота на *3DL1*004* в общата група болни спрямо здравата популация, същата зависимост бе намерена и при сравнителния анализ между пациентите хронични носители на HBV и контролната група (33.1% vs. 17.6%, p=0.018). Независимо, че различията не достигат статистическа значимост и при преболедевалите (оздравели) индивиди *3DL1*004* е с по-висока честота в сравнение с контролите. Изследваните оздравели от HBV инфекция се отличават от

неродствените здрави индивиди по по-ниското разпространение на още една KIR алелна група - *KIR2DL5B* (10.0% vs. 45.5 %, $p=0.003$).



Фиг. 15 Честотно разпределение на KIRs сред пациентите според персистиране на HBV инфекция: хронични носители и преболедували. А: инхибиторни KIRs; Б: активиращи KIRs.

За да се определи дали има находки, свързани с риск за хронифициране на HBV инфекцията, беше направено сравнение на KIRs честотите между двете подгрупи болни: хронични носители и преболедували (оздравели), като се прие, че двете кохорти са изложени на общ рисков фактор на околното среда – HBV вирус (фиг. 15). Приложеният вътрегрупов анализ доказва достоверно най-ниска честота на разпределение на KIR2DL5B гена сред преболедувалите пациенти (10.0% vs. 33.9%, $p=0.042$; OR 0.2 [95% CI 0.05-1.05]).

2. KIR профили

Определените KIR профили според индивидуалния набор KIR гени на изследваните индивиди показаха висока степен на вариации в двете групи – пациенти и здравите контроли. Охарактеризирани бяха общо 41 различни генотипа сред болните и контролите, чиито характеристики и честоти са представени на табл. 18. Двадесет и три известни генотипа се срещаха и в двете групи (ID1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 69, 70, 71, 73, 76, 87, 90, 91, 94, 104, 118, 377), но 8 генотипа (ID15, 19, 28, 75, 159, 200, 342, 363) бяха установени само сред пациентите, а 10 генотипа (ID12, 36, 43, 68, 72, 81, 151, 188, 293 и 440) се намериха само при здравите. Като цяло общите и за двете групи изследвани KIR профили процентно съставляват по-голяма част от разнообразието им, а редките формират по-малко от 1/9 от KIR генотипните вариации сред пациентите и контролите.

Най-честият генотип и в двете групи е ID1, отговарящ на хомозиготност по група А KIR хаплотипи (ID1- *2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *2DS4*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *2DP1*, *3DP1*), съответно 24.3% сред пациентите и 17.5% при контролите, следван от ID4 от не-АА генотипните комбинации - 18.6% в групата на болните и ID5 (13.5%) сред неродствените здрави контроли. При сравнителен анализ между болни и здрави, генотип ID 2, който е изграден от всички известни активиращи KIRs, с изключение на *2DS2* и *2DS3* и от един инхибиращ рецептор (*KIR2DL2*), се среща с по-висока честота в контролите (13.5% vs. 5.6%, $p=0.025$; OR 0.38 [95% CI 0.14-0.85]).

Според А и В хаплотипната номенклатура, включените в настоящото проучване индивиди бяха класифицирани в двете групи - KIRAA или KIRBx (AB/BB), където АА генотипна комбинация

представлява случаите, в които единственият активиращ рецептор е *KIR2DS4*, а всички останали KIR генотипи са приети за Вх. В сравнение с описаната вече честота на KIRA група хомозиготност, KIRВх комбинациите бяха доминиращи и за двете групи – болни и здрави, без да са наблюдавани различия между тях по отношение разпределението на KIRA и KIRB хаплотипи и техните комбинации (табл.19)

Табл. 18 Характеристика и честота на KIR генотипите при пациентите с HBV (n=144) и здравите контроли (n=126).

пациенти n (%)	здррави n (%)	ID*	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	2DP1	3DP1	3DL2, 3DL3
35 (24.3)	22 (17.5)	1															
27 (18.6)	14 (11.1)	4															
13 (9.0)	17 (13.5)	5															
11 (7.6)	6 (4.76)	3															
8 (5.6)	6 (4.76)	6															
8 (5.6)	17 (13.5)	#2															
6 (4.2)	4 (3.2)	7															
4 (2.8)	1 (0.79)	9															
3 (2.1)	5 (3.97)	71															
3 (2.1)	3 (2.38)	69															
2 (1.38)	2 (1.58)	70															
2 (1.38)	2 (1.58)	104															
2 (1.38)	1 (0.79)	73															
2 (1.38)	1 (0.79)	90															
1 (0.7)	2 (1.58)	8															
1 (0.7)	2 (1.58)	76															
1 (0.7)	2 (1.58)	94															
1 (0.7)	1 (0.79)	11															

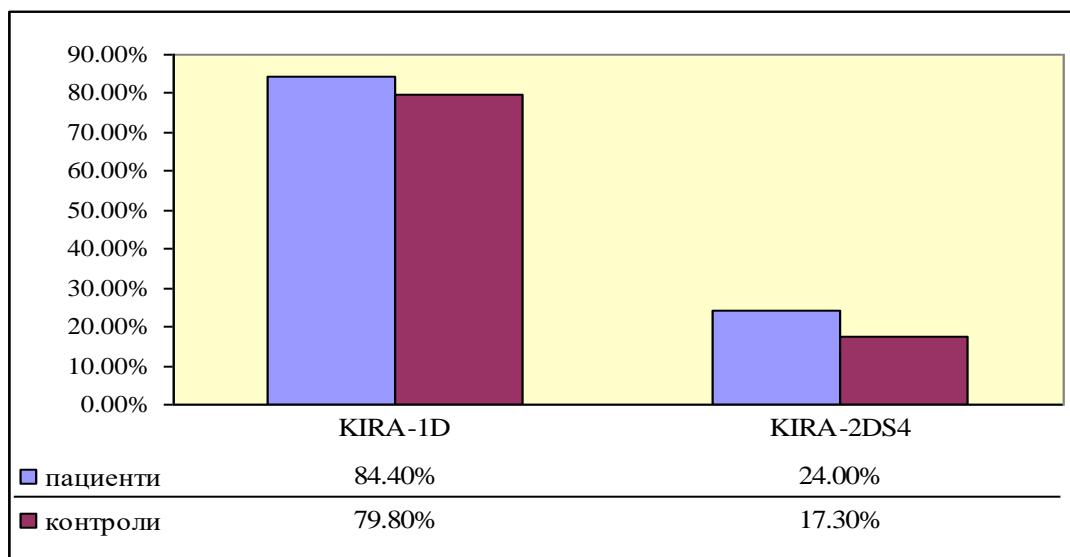
1 (0.7)	1 (0.79)	13																	
1 (0.7)	1 (0.79)	87																	
1 (0.7)	1 (0.79)	91																	
1 (0.7)	1 (0.79)	118																	
1 (0.7)	1 (0.79)	377																	
2 (1.38)	0	15																	
1 (0.7)	0	19																	
1 (0.7)	0	28																	
1 (0.7)	0	75																	
1 (0.7)	0	159																	
1 (0.7)	0	200																	
1 (0.7)	0	342																	
1 (0.7)	0	363																	
0	1 (0.79)	12																	
0	1 (0.79)	36																	
0	2 (1.58)	43																	
0	2 (1.58)	68																	
0	1 (0.79)	72																	
0	1 (0.79)	81																	
0	1 (0.79)	151																	
0	1 (0.79)	188																	
0	2 (1.58)	293																	
0	1 (0.79)	440																	

Запълнените квадрати отговарят на наличие на KIR гена, а празните на липса на съответния KIR ген;
 *Идентификационен номер на генотипа определен в <http://www.allelefreqencies.net/kir6001a.asp>), # статистически достоверна разлика при сравняване на групата пациенти със здрави неродствени контроли

Табл. 19 KIR A и B хаплотипи при пациенти с HBV инфекция (n=144) и здрави контроли (n=126).

KIR хаплотип	Пациенти 2n (%)	Контроли 2n (%)
KIRA	179 (62.2)	148 (58.7)
KIRB	109 (37.8)	104 (41.3)
AA	70 (24.3)	44 (17.5)
Bx	218 (75.6%)	208 (82.5)

В двете анализирани групи моделът на KIR A хаплотипното разпределение беше сходен, доминиране на KIRA-1D в сравнение с KIRA-2DS4 (пациенти: 84.4% vs. 24.0% и здрави: 79.8% vs. 17.3% съответно, фиг. 16).



Фиг. 16 KIR A-1D и A-2DS4 хаплотипи при пациенти с HBV инфекция и здрави индивиди.

Изчислено беше и съотношението от броя на активиращите към броя на инхибиращите KIRs в генотипа на всички индивиди включени в настоящата работа. Прилагайки този подход

изключихме от анализа *KIR2DS4del*, тъй като те не кодират протеинова молекула. *KIR2DL4* беше причислен към групата на активиращите рецептори, въпреки че данните за неговата функция са все още противоречиви. Стойностите на изчислените съотношения варира от 0.17 (преобладаване на инхибиторните KIR гени) до 1.20 (преобладаване на активиращите KIR гени) (табл.20). С най-висока честота сред здравите контроли беше представен генотип със съотношение 0.67 (4 активиращи/ 6 инхибиторни гени), като разликата между болните и здравите е статистически значима. Сред пациентите най-често срещана е KIR генната комбинация с отношение 0.2 (1 активиращи/ 5 инхибиторни гени), която е със значимо по-висока честота в сравнение с контролите. Интерес представлява и намерената тенденция за по-висока честота на индивидите със съотношение = 0.57 сред вирус инфектираните в сравнение с контролната група (8.3% vs. 3.2%, $p=0.073$; OR 2.77 [95% CI 0.8-10.5]).

Допълнително беше извършен анализ на разпределението на KIR профилите определени според броя на активиращите и инхибиторните KIR гени в отделните индивиди (табл. 21). Установи се статистически значима разлика за KIR профил, съставен от шест активиращи гена, който е по-чест при контролите в сравнение с пациентите, както и тенденция за по-висока честота на KIR генотип съставен от четири активиращи KIR гени сред незасегнатите индивиди (болни vs. контроли: 16.0% vs. 25.8%, $p=0.066$; OR 0.55 [95% CI 0.27-1.1]).

Табл. 20 Съотношение м/у активизиращите и инхибиторните KIRs при пациентите с HBV (n=144) и здрави контроли (n=126).

Съотношение акт./инх:	0.17	0.2	0.33	0.4	0.43	0.5	0.57	0.6	0.67	0.71	0.75	0.8	0.83	0.86	1,0	1.17	1.2
Здрави	0	17	7	6	10	12	4	1	30	7	1	1	7	10	12	0	1
n (%)		(13.5)	(5.7)	(4.6)	(8.0)	(9.3)	(3.2)	(0.8)	(23.8)	(5.7)	(0.8)	(0.8)	(5.7)	(8.0)	(9.3)		(0.8)
Пациенти	2	26	14	11	6	16	12	1	8	15	1	3	10	8	9	2	0
n (%)	(1.38)	(18.1)	(9.7)	(7.6)	(4.2)	(11.1)	(8.3)	(0.695)	(5.6)	(10.4)	(0.695)	(2.1)	(6.9)	(5.6)	(6.25)	(1.38)	
p		ns	ns	ns	ns	ns	0.073	ns	0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
OR							2.77		0.2								
[95% CI]							[0.8-10.5]		[0.08-0.45]								

□ 95 % интервал на достоверност, ns- not significant, без статистическа значимост

Табл. 21 KIR профили определени според броя на инхибиторните и активизиращите KIRs при пациенти с HBV (n=144) и здрави контроли (n=126).

брой акт. KIR	пациенти n (%)	здрави n (%)	p	брой инх. KIR	пациенти n (%)	здрави n (%)	p
7	5 (3.5)	0	ns	7	44 (30.55)	35 (27.8)	ns
6	11 (7.6)	16 (18.0)	0.017	6	54 (37.5)	53 (42.1)	ns
			OR 0.4 [0.2-0.9]				

5	28 (19.4)	12 (13.5)	ns	5	44 (30.55)	35 (27.8)	ns
4	23 (16.0)	23 (25.8)	ns	4	2 (1.4)	3 (2.4)	ns
3	23 (16.0)	17(19.1)	ns				
2	26 (18.1)	9 (10.1)	ns				
1	28 (19.4)	12 (13.5)	ns				

[] 95 % интервал на достоверност; ns- not significant, без статистическа значимост

Участието на НК клетките в противовирусната защита на организма е безспорно. През последните години все повече се обсъжда ролята на НК клетките в антиген неспецифичната имунна защита на организма и потенциалното им участие в развитието на автоимунни и инфекциозни заболявания. Експресираният KIR на клетъчната повърхност на НК и Т клетки играят роля в регулирането на вродените и придобити антивирусни имунни отговори, чрез трансдукция на инхибиращи и активиращи сигнали (256-258).

В съответствие с нашата работна хипотеза, че генетичен дисбаланс между активиращи и инхибиращи KIR гени може да повлияе върху „поведението” на НК клетките в посока на понижена активация и/или повишена инхибиция и да способства за повишена антивирусна защита, е намерена слабо изразена тенденция за по-ниска честота на KIR3DS1 в групата на болелите в сравнение със здравите контроли. Следователно KIR3DS1 допринася за повишена НК клетъчна антивирусна защита и предпазва от развитие на вирусна инфекция. Тези резултати са в унисон с данните от сходно генетично-популационно проучване на Kibar и сътр. (174) при спонтанно оздравели и хронични носители на HBV. Те установяват висока честота на KIR2DL3 и KIR3DS1 в контролната група и при пациентите с спонтанна ремисия. Така, че би могло да се дискутира идеята за протективен характер на давата гена KIR2DL3 и KIR3DS1 за HBV инфекцията. По същия начин, проучването на Gao и сътр. (259), сравняващо 182 хронични HBV пациенти с 140 контролно здрави, установи че KIR2DL3(+)/ C1(+) хомозиготността е протективна при HBV инфекция, а KIR2DL1(+)/C2(+) е предразполагащ за хронична HBV инфекция.

Рецепторно-лигандната двойка KIR2DL3(+)/ C1(+) е протективна при HCV инфекция без анти-HCV антитела, но при ко-инфекция с ХИВ, тя губи своя протективен ефект (260). Висока честота на двойка KIR2DL3(+)/ C1(+) се наблюдава в пациенти, които преминават успешно интерферон- α базирана терапия в сравнение с тези които не постигат успешен терапевтичен отговор, докато KIR2DL5 се асоциира с лош терапевтичен отговор (260). Zhi-ming и сътр. (261) установяват, че KIR2DS2 и KIR2DS3 са гени предразполагащи към хроничност при HBV, докато KIR2DS1, KIR3DS1 и KIR2DL5 могат да бъдат защитни гени, които улесняват изчистването от HBV в китайската популация (262). За разлика от последното проучване нашите резултати показват, че инхибиторния KIR2DL5 и неговия алелен вариант KIR2DL5B, логично свързани с по-висока инхибиторна NK-клетъчна функция, имат сигнификантно предразполагащ ефект за хроничност при HBV инфекцията. Тези резултати могат да се обяснят и с факта, че някои алели на KIR2DL5 се асоциират с KIR генотипи, съдържащи по-нисък брой активиращи рецептори. Следователно повишената честота на 2DL5B при хроничните носители на HBV може да се приеме като индикатор за по-силна инхибиция и по-ниска активация, което вероятно е причина за понижена анти-HBV активност на NK и инсуфициентен противовирусен имунен отговор, резултиращо в хронифициране и персистиране на инфекциозния причинител.

Трябва да се отбележи и намерената тенденция за по-висока честота на активиращият KIR3DS1 в здравата популация спрямо общата група на заболялите, който вероятно допринася за повишена NK клетъчна антивирусна защита и предпазване от развитието на вирусни инфекции. Установен е протективен ефект на този рецепторен ген и при развитието на вирусни инфекции, причинени от друг патоген – Human immunodeficiency virus (HIV). Генетичните анализи на популацията разкриха, че честотата и разпространението на KIR гени и хаплотипове варира спрямо етноса (263). Въпреки, че нашите изследвания и тези на “Zhi-Ming” са били извършени в различни популации, KIR3DS1 гена е установен като защитен и в двете проучвания. За ролята на KIR3DS1 като трансдюсер на повишена NK активация е и посочения му протективен ефект, асоцииран с хепатоцелуларен карцином (264).

Според А и В хаплотипната номенклатура, включените в настоящото проучване индивиди бяха класифицирани в двете групи - KIRAA или KIRBx(AB/BB), където AA генотипна комбинация

представлява случаите, в които единственият активиращ рецептор е *KIR2DS4*, а всички останали KIR генотипи са приети за Вх. В сравнение с описаната вече честота на KIRA група хомозиготност, KIRВх комбинациите бяха доминаращи и за двете групи – болни и здрави, без да са наблюдавани различия между тях по отношение разпределението на KIRA и KIRB хаплотипи и техните комбинации (табл. 23).

В по-широко проучване, Zhi-Ming” и сътр. (261). анализират KIR гените при 150 пациента с хронична HBV инфекция, 251 в спонтанна ремисия, и 451 здрави контроли. Те откриват по-ниска стойност на А и по-висока на В хаплотипа при хронични пациенти и спонтанно оздравели, в сравнение със здрави контроли, което определя хаплотип В като предразполагащ в китайската кохорта. Нашите резултати показват, че хаплотип А преобладава в двете групи пациенти и контроли. Противоположните резултати се обясняват с популационните различия между кавказката и азиатската кохорта. При кавказката популация доминира хаплотип А, а при азиатците В хаплотип.

Моделът на KIR А хаплотипното разпределение в двете анализирани групи: пациенти и контроли е сходен като доминира KIR А-1D, в сравнение с KIRA-2DS4. В неотдавнашно проучване, Пан и сътр., чрез мултивариационен регресионен анализ установява, че комбинация от KIR2DS4 и KIR2DS4/1D е свързана с прогресията на заболяването през цироза към развитие на хепатоцелуларен карцином независимо от влиянието на други активиращи KIR рецептори, като KIR 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5 и 3DS1.

Въпреки, че KIR2DS4 се причислява към групата на активиращите рецептори от имуноглобулиновото семейство и следователно би трябвало да е медиатор на засилена NK клетъчна антивирусна защита, липсата на информация за неговата лигандната специфичност и за значението му в регулацията на NK, затрудняват значително интерпретацията на получените резултати. Тези данни недвусмислено доказват сложността на KIR-рецепторната генна система и необходимостта от по-задълбочени и продължителни проучвания.

Независимо от голямото разнообразие в честотата на индивидуалните KIR и вариабилността на формираните от тях KIR хаплотипни комбинации в световен мащаб (265), съществуват и ясни

сведения за наличието на някои общи характеристики на KIR генотипите (266). В съответствие с това са получените в настоящето проучване резултати за LD между отделните KIR локуси и честотното разпределение на KIR генотипите и хаплотипните им комбинации в двете изследвани групи - пациенти и здрави контроли. Определихме 41 различни KIR генотипа, като 23 от тях се срещат в двете групи. Най-честия генотип за двете групи е KIR генотип с ID1 (24,3% при пациентите и 17.5 % при контролите), кореспондиращ на хомозиготно носителство на група A KIR хаплотипи (KIRAA). Този генотип е представен с най-висока честота и в други кавказки популации като чехи (25.6%) (267), македонци (21.5%) (268), италианци (28.6%) (269), ирландци (35.1%) (270). Установените KIR хаплотипни комбинации в изследваните здрави контроли показват доминиране на група A KIR хаплотипи в българската, подобно на други кавказки и не кавказки популации – корейци (271), японци (272). Докато групата на KIR B хаплотипите са по-често срещани в Южна Азия, афро-карибския и северно-индийския региони (273). Тези данни за доминантно разпространение на инхибиторните KIR гени и група A KIR хаплотипи в нашата и други кавказки популации са в подкрепа на предположението за позитивна селекция на инхибиторните KIRs в човешката популация и по-специално в тези от кавказки произход. Логично е инхибиторните KIR, чиято основна функция е предпазване на организма от автолиза, да се запазват еволюционно. Според една от теориите в популациите с предимно активиращ KIR генен профил (австралийски аборигени, южно-азиатски, афро-карибски и северно-индийски региони), по-честата атака на организма от различни патогени на околната среда - вируси и паразити, е наложила необходимостта от еволюционно запазване на активиращите KIR генни профили, осигуряващи по-бърза и силна първична защита на организма, медирана от NK клетките.

В подкрепа на хипотезата, че генетичен дисбаланс между активиращи и инхибиращи KIR гени може да повлияе „поведението” на NK клетките в посока на понижена активация и/или повишена инхибиция и да способства за развитието на вирусни инфекции, е намерената противоположна болестна асоциация на два KIR генотипа, дефинирани въз основа на съотношението от броя на инхибиторните към броя на активиращите KIRs. Двата генотипа са изградени от еднакъв брой активиращи KIRs, но различен брой инхибиторни KIR, което определя различната им

функционална активност. KIR генотип със съотношение 0.57 (4 активиращи KIRs/7 инхибиторни KIRs) с предимно инхибиторен NK-клетъчен потенциал е предразполагащ, а KIR генотип със съотношение 0.67 (4 активиращи KIRs/6 инхибиторни KIRs) с по-слаба инхибиторна NK-клетъчна активност е протективен за развитието на HBV инфекция. Допълнително KIR профил съставен от шест активиращи KIRs, който се приема за медиатор на силни активиращи NK-рецепторни сигнали също е установен с протективен ефект. По-високата честота на KIR профил ID2 сред здравите контроли може да се разглежда в посока на по-висока вирусна резистентност в контекста на характерния за него липсващ KIR2DL2, но в присъствие на KIR2DL3 алелния му вариант, който е трансдусер на по-слаби инхибиторни сигнали и следователно се асоциира с по-слаба инхибиторна активност и повишена противовирусна NK-клетъчна функция.

Известно е, че NK клетките са първата линия на защита срещу вирусни инфекции. Но все още обект на дискусии е до каква степен имуногенетичните фактори, свързани с NK клетъчната функция биха могли да допринесат за успешно елиминиране или за персистиране и хронифициране на вирусната инфекция. Намираме се в период на интензивно разработване на имуномодулираща терапия, насочена към ефективно и безопасно модулиране на противовирусните имунни отговори. Обнадеждаващи терапевтични резултати са получени не само в експериментални модели, но и при пациенти. Това обуславя необходимостта от по-нататъшни проучвания върху инхибиращите и активиращите клетъчни пътища, за да могат да се установят точните механизми на изпълване от вродения и адаптивния имунен надзор, използвани от различни видове вируси, за да се приложат тези познания в клиничната практика. В тази насока манипулирането на NK клетъчната активност в посока на повишена активация или намалена инхибиция, или чрез двете, може да стимулира ефективен NK клетъчен имунен отговор срещу вирусно инфектирани клетки и да разкрие нови перспективи за имуноterapia в допълнение на специфичната антивирусна терапия, с цел по-бързо и ефективно ранно елиминиране на патогенния причинител, скъсяване периода на вирусно персистиране и свързаното с него хронично носителство и късни усложнения от вирусни инфекции.

V. Проучване на KIR / HLA лиганден полиморфизъм при група здрави индивиди от българската популация, хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти.

1. KIR лиганди

Лиганди за повечето KIR са специфични мотиви на HLA клас I молекулите. От особено значение за NK клетъчното разпознаване са полиморфните HLA-C молекули. Диморфизмът в HLA-C $\alpha 1$ домейна, характеризирани от Ser77/Asn80 и Asn77/Lys80 дефинира серологично различни HLA-C групи - C1 и C2, които са лиганди за различни рецептори от KIR2DL и KIR2DS субфамилиите (274). Следователно, функционалната активност на тези рецептори ще зависи от HLA-C генотипа на индивида. За да проучим, дали инфектираните с хепатит В пациенти се различават от здравите индивиди по отношение на геномното представяне на предполагаемите KIR лиганди, извършихме сравнителен анализ в зависимост от присъствието на група 1 или 2 HLA-C алели. Анализът на KIR лигандите показва, че всички изследвани носят поне по един HLA-C лиганд (табл. 8). И в двете групи доминира HLA-C1 алотипът, като сред болните процентната разлика в разпределението на двете групи HLA-C лиганди е почти незначителна, което резултира в статистически значима по-висока честота на HLA-C2 лигандната група сред болни в сравнение със здрави контроли (71.5% vs. 66.4%, $p=0.04$; OR 0.53 [95% CI 0.27-1.03]).

Разпределението на отделните HLA-C алотипни комбинации (табл. 22) показва някои особености. Подобно на здравите сред вирус инфектираните пациенти в най-голям процент са представени хетерозиготните носители на HLA-C лиганди (C1C2 – 44.4%, 50.4%, болни и здрави съответно). Сред пациентите хомозиготните индивиди по група C1 и група C2 са приблизително равни (C1C1 – 29.2%, C2C2- 26.4%), докато в здравата популация по-често срещани са хомозиготните носители на C1 (C1C1 – 32.7%), а C2 хомозиготните индивиди (C2C2) се срещат по-рядко (17.0%). Въпреки, че честотата на HLA-C лигандните профили е различна за двете групи, не се установиха

статистически значими различия асоциирани със заболяването. Единствено беше наблюдавана тенденция за по-висока честота на хомозиготни носители на С2 лиганди сред болните в сравнение със здравите контроли (26.4% vs. 17.0%, $p=0.07$; OR 1=75 [95% CI 0.91-3.41]).

Табл. 22 Разпределение на група 1 и група 2 HLA-C алелите при пациенти с HBV инфекция и здрави индивиди.

	пациенти (n=144) n (%)	Контроли (n=113) n (%)	p
<i>HLA-C1</i>	106 (73.6)	95 (84.1)	ns
<i>HLA-C2</i>	103 (71.5)	75 (66.4)	0.044 OR 1.27 [0.27-1.03]
<i>HLA-C1C1</i>	42 (29.2)	37 (32.7)	ns
<i>HLA-C1C2</i>	64 (44.4)	57 (50.4)	ns
<i>HLA-C2C2</i>	38 (26.4)	19 (17.0)	ns

[] 95 % интервал на достоверност; ns- not significant, без статистическа значимост

Разпределението на отделните HLA-C лигандни групи и алотипни комбинации сред пациентите според персистиране на HBV инфекция (табл. 23) показва, че при хроничните носители на HBV честота на С1 група лиганди е най-ниска, като разликата е значима спрямо контролната здрава популация.

Табл. 23 Разпределение на група 1 и група 2 HLA-C алелите при пациентите според персистиране на HBV инфекция и здравите индивиди

	Контроли n=113 n (%)	Хронични носители n=124 n (%)	Преболедували n=20 n (%)
<i>HLA-C1</i>	95 (84.1)	91 (73.4)	15 (75.0)
		p. 0.046; OR 0.5 [0.28-0.99]	
<i>HLA-C2</i>	75 (66.4)	89 (71.8)	14 (70.0)
<i>HLA-C1C1</i>	37 (32.7)	36 (29.0)	6 (30.0)
<i>HLA-C1C2</i>	57 (50.4)	55 (44.4)	9 (45.0)
<i>HLA-C2C2</i>	19 (17.0)	33 (26.6)	5 (25.0)

[] 95 % интервал на достоверност

В следваща стъпка беше определено разпределението на HLA клас I лигандите за *KIR3DL1/S1* (алели с *Bw4* мотив) при изследваните индивиди (табл.24), но не се установиха статистически значими различия между пациентите и здравите контроли, както и между групите на пациентите.

Табл. 24 Разпределение на HLA-Bw4 лигандите при пациентите с HBV инфекция и здравите индивиди.

	Контроли n (%)	Пациенти n (%)	Хронични носители n (%)	Преболедували n (%)
<i>HLA-B^{Bw4}</i>	84 (74.3)	57 (65.3)	83 (66.9)	11 (55.0)
<i>HLA-A^{Bw4}</i>	32 (33.7)	57 (39.6)	48 (38.7)	9 (45.0)

[] 95 % интервал на достоверност; ns- not significant, без статистическа значимост

HLA-B алотипи с *Bw4* мотив на позиция 77-83 са лиганди за инхибиращия *KIR3DL1* (p70) [9, 10]. Според най-новите проучвания *KIR3DL1* разпознава и някои HLA-A алели с *Bw4* мотиви (121). Афинитетът на свързване между рецептор и лиганд варира в зависимост от аминокиселинния остатък на 80-та позиция в HLA молекулата и е по-силен, когато HLA-Bw4

алелите имат изолевцин на 80-та позиция (Ile80) в сравнение с тези, при които на същата позиция е аминокиселината треонин (Thr80) (117).

Табл. 25 Разпределение на HLA Bw4 лигандите при пациентите с HBV инфекция и здравите индивиди в зависимост от АК на позиция 80.

	Контроли n (%)	Пациенти n (%)	Хронични носители n (%)	Преболедували n (%)
<i>HLA-Bw4^{Ile80}</i>	72 (63.7)	68 (47.2) p=0.008; OR 0.51 [0.3-0.9]	62 (50.0) p=0.033; OR 0.5 [0.3-0.99]	6 (30.0) p=0.005; OR 0.24 [0.09-0.7]
<i>HLA- Bw4^{Thr80}</i>	9 (8.0)	28 (15.3)	18 (14.5)	4 (20.0)
<i>HLA- Bw4^{Ile80 Thr80}</i>	3 (2.7)	4 (2.8)	3 (2.4)	1 (5.0)

[] 95 % интервал на достоверност

При определено разпространение на HLA-Bw4 според присъствието на Ile80 или Thr80 на посочената позиция (табл.25) се наблюдава различия в честотата на индивидите носещи HLA-Bw4 алел с аминокиселината изолевцин на 80 позиция (HLA- Bw4^{Ile80}). Техният процент е статистически значимо по-нисък при пациентите с хепатит В вирусна инфекция в сравнение с контролната група (47.2% v.s. 63.7%, p=0.008). Тази разлика е обусловена от намалена честота на HLA- Bw4^{Ile80} позитивните индивиди в двете подгрупи HBV инфектирани, сформиращи общата група болни, но е по-силно изразена при преболедувалите от HBV, при които HLA- Bw4^{Ile80} позитивността е едва 30.0% (преболедували vs. здрави: 30.0% vs. 63.7%, p=0.005). Анализът на резултатите между двете групи болни показва, че установената тенденция е запазена като такава и при сравнението на хроничните носители спрямо преболедувалите пациенти (хронични носители vs. преболедували: 50.0% vs. 30.0%, p=0.076).

2. KIR/HLA лигандни комбинации

Ефекторната функция на NK рецепторите е резултат от сложната взаимовръзка и баланса между проведените активационни и инхибиторни сигнали при тяхното специфично свързване със съответните им лиганди. Предполагайки че, двойката KIR/HLA лиганд оказва влияние върху функцията на NK клетките, логична следваща стъпка беше да се оцени разпределението на възможните комбинации в сравняваните групи, базирайки се на известните KIR/HLA лиганди взаимодействия. От анализа са изключени рецепторно-лигандни двойки, които не се срещат в никоя от изследваните проби (честота = 0%), както и такива, които са без функционална значимост (отрицателен рецептор/отрицателен лиганд). Резултатите (табл. 26 и 27) показват статистически значими различия в честотата на инхибиторните рецептор/лигандните комбинации, в които участват KIR2DL2/L3 – по-висока честота на нефункционалната рецепторно-лигандна комбинация сред общата група болни [KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(-): 26.4% vs. 15.9%, болни vs. здрави] и тези с хроничен хепатит В [KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(-): 26.6% vs. 15.9%, хронични HBV носители vs. здрави] за сметка на по-висока честота на функционално значимия KIR лиганден генотип в групата на здрави контроли [KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(+): 73.6% vs. 84.1%, болни vs. здрави; 73.4% vs. 84.1%, хронични носители vs. здрави]. В активиращите рецепторно-лигандни двойки със сигнификантно различно разпределение присъства *KIR3DS1*. Установена е по-ниска честота на *KIR3DS1(+)/HLA-A^{Bw4}(-)* комбинация сред общата група на болните, както и при пациентите с персистираща HBV инфекция, сравнявайки ги със случайно подбраните неродствени контроли (22.2% vs. 35.8% - болни спрямо здрави и 22.6% vs. 35.8% - хронични носители спрямо здрави). Преболедувалите индивиди се различават от здравите контроли единствено по носителството на *KIR3DL1(+)/HLA-B^{Bw4}(-)* [45.0% vs. 22.1%].

Табл. 26 Инхибиращ KIR/лиганд комбинации при пациентите HBV инфекция и здравите индивиди.

KIR/ лиганд*	Контроли n (%)	Пациенти n (%)	Хронични носители n (%)	Преболедували n (%)
<i>2DL1(+)/HLA-C2 (+)</i>	67 (59.3)	100 (69.4)	86 (69.4)	14 (70.0)
<i>2DL1(+)/HLA-C2 (-)</i>	38 (33.3)	38 (26.4)	33 (26.6)	5 (25.0)
<i>2DL1(-)/HLA-C2 (+)</i>	8 (7.1)	3 (2.1)	3 (2.4)	0
<i>2DL2/L3(+)/HLA-C1 (+)</i>	95 (84.1)	106 (73.6) p=0.044, OR 0.53 [0.27-1.03]	91 (73.4) p=0.046, OR 0.52 [0.28-0.99]	15 (75.0)
<i>2DL2/L3(+)/HLA-C1 (-)</i>	18 (15.9)	38 (26.4) p=0.044, OR 1.89 [0.97-3.71]	33 (26.6) p=0.046, OR 1.9 [1.0-3.6]	5 (25.0)
<i>3DL1(+)/HLA-B^{Bw4} (+)</i>	77 (68.1)	87 (60.4)	76 (61.3)	11 (55.0)
<i>3DL1(+)/HLA-B^{Bw4} (-)</i>	25 (22.1)	47 (32.6)	38 (30.6)	9 (45.0) p=0.031, OR 2.8 [01.1-7.7]
<i>3DL1(-)/HLA-B^{Bw4} (+)</i>	7 (6.2)	7 (4.9)	7 (5.6)	0
<i>3DL1(+)/HLA-A^{Bw4} (+)</i>	28 (29.5)	51 (35.4)	42 (33.9)	9 (45.0)
<i>3DL1(+)/HLA-A^{Bw4} (-)</i>	57 (60.0)	83 (57.6)	72 (58.1)	11 (55.0)
<i>3DL1(-)/HLA-A^{Bw4} (+)</i>	4 (4.2)	6 (4.6)	6 (4.8)	0 (0)

[] 95 % интервал на достоверност; *KIR/HLA лигандни комбинации, които не са идентифицирани в никоя от изследваните групи не са представени.

Табл. 27 Активиращ KIR/лиганд комбинации при пациентите с HBV инфекция и здравите индивиди

KIR/лиганд*	Контроли n (%)	Пациенти n (%)	Хронични носители n (%)	Преболедували n (%)
2DS1(+)/HLA-C2 (+)	33 (29.2)	41 (28.5)	37 (29.8)	4 (20.0)
2DS1(+)/HLA-C2 (-)	18 (15.9)	18 (12.5)	16 (12.9)	2 (10.0)
2DS1(-)/HLA-C2 (+)	42 (37.2)	62 (43.1)	52 (41.9)	10 (50.0)
2DS2(+)/HLA-C1 (+)	60 (53.1)	66 (45.8)	56 (45.2)	10 (50.0)
2DS2(+)/HLA-C1 (-)	12 (10.6)	25 (17.4)	21 (16.9)	4 (20.0)
2DS2(-)/HLA-C1 (+)	35 (31.0)	40 (27.8)	35 (28.2)	5 (25.0)
3DS1(+)/HLA-B ^{Bw4} (+)	38 (33.6)	35 (24.3)	32(25.8)	3 (15.0)
3DS1(+)/HLA-B ^{Bw4} (-)	18 (15.9)	18 (12.5)	15 (12.1)	3 (15.0)
3DS1(-)/HLA-B ^{Bw4} (+)	46 (40.7)	59 (41.0)	51 (41.1)	8 (40.0)
3DS1(+)/HLA-A ^{Bw4} (+)	15 (15.8)	21 (14.6)	19 (15.3)	2 (10.0)
3DS1(+)/HLA-A ^{Bw4} (-)	34 (35.8)	32 (22.2)	28 (22.6)	4 (20.0)
		p=0.022, OR 0.5 [0.28-0.95]	p=0.032, OR 0.5 [0.3-0.95]	
3DS1(-)/HLA-A ^{Bw4} (+)	17 (17.9)	36 (25.0)	29 (23.4)	7 (35.0)

[] 95 % интервал на достоверност. *KIR/HLA лигандни комбинации, които не са идентифицирани в никоя от изследваните групи не са представени.

В следващ етап бяха определени KIR/HLA клас I лигандните комбинации вземайки в съображение HLA клас I лиганда и съответната двойка инхибиторен/активиращ рецептор. Този подход позволява оценка на комплексното въздействие на инхибиращи и активиращи сигнали,

проведени в резултат на специфично рецепторно-лигандно взаимодействие, в което участват рецептори с аналогична лигандна специфичност от една страна и едновременно с антагонистична функционална активност. Резултатите са представени на табл. 28.

Една рецепторно лигандна двойка, в която е наличен само инхибиторния рецептор - *KIR3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-B^{Bw4}(-)* е достоверно установена по-често във всички анализирани групи пациенти в сравнение със здравите контролите (22.2%, 21.0% и 30.0% vs. 9.7%, болни, хронични носители и преболедували vs. здрави контроли съответно). Друга комбинация, характеризираща се с наличие на лиганд без специфичния му инхибиторен и активиращ KIR – *KIR2DL1(-)/2DS1(-)/HLA-C2(+)*, е представена с по-ниска честота сред общата група пациенти спрямо контролната група (0.7 % vs. 4.4%, $p=0.049$, OR 0.15 [95% CI 0.01-1.36]), като и в двете подгрупи болни същата е представена с по-ниска честота, дори 0% при преболедувалите, въпреки че значими разлики не се констатираха.

Табл. 28 Инхибиращ/активиращ KIR/лиганд комбинации при пациентите с HBV инфекция и здравите индивиди.

KIR/ лиганд*	Здрави	Болни	Хронични носители	Преболедували
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>2DL1(+)/2DS1(+)/HLA-C2(+)</i>	30 (26.5)	39 (27.1)	35 (28.2)	4 (20.0)
<i>2DL1(+)/2DS1(-)/HLA-C2(+)</i>	37 (32.7)	61 (42.4)	51 (41.1)	10 (50.0)
<i>2DL1(-)/2DS1(+)/HLA-C2(+)</i>	3 (2.7)	2 (1.4)	2 (1.6)	0
<i>2DL1(-)/2DS1(-)/HLA-C2(+)</i>	5 (4.4)	1 (0.7) p=0.049, OR 0.15 [0.01-1.36]	1 (0.8)	0
<i>2DL1(+)/2DS1(+)/HLA-C2(-)</i>	18 (15.9)	17 (11.8)	15 (12.1)	2 (10.0)

<i>2DL1(+)/2DS1(-)/HLA-C2(-)</i>	20 (17.7)	21 (14.6)	18 (14.5)	3 (15.0)
<i>2DL1(-)/2DS1(+)/HLA-C2(-)</i>	0	1 (0.7)	1 (0.8)	0
<i>2DL2/L3(+)/2DS2(+)/HLA-C1(+)</i>	60 (53.1)	66 (45.8)	56 (45.2)	10 (50.0)
<i>2DL2/L3(+)/2DS2(-)/HLA-C1(+)</i>	35 (31.0)	40 (27.8)	35 (28.2)	5 (25.0)
<i>2DL2/L3(+)/2DS2(+)/HLA-C1(-)</i>	12 (10.6)	25 (17.4)	21 (16.9)	4 (20.0)
<i>2DL2/L3(+)/2DS2(-)/HLA-C1(-)</i>	6 (5.3)	13 (9.0)	12 (9.7)	1 (5.0)
<i>3DL1(+)/3DS1(+)/HLA-B^{Bw4}(+)</i>	31 (27.4)	28 (19.4)	25 (20.2)	3 (15.0)
<i>3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-B^{Bw4}(+)</i>	46 (40.7)	59 (41.0)	51 (41.1)	8 (40.0)
<i>3DL1(-)/3DS1(+)/HLA-B^{Bw4}(+)</i>	7 (6.2)	7 (4.9)	7 (5.6)	0
<i>3DL1(+)/3DS1(+)/HLA-B^{Bw4}(-)</i>	14 (12.4)	15(10.4)	12 (9.7)	3 (15.0)
<i>3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-B^{Bw4}(-)</i>	11 (9.7)	32 (22.2) p=0.008, OR 2.65 [1.2-5.9]	26 (21.0) p=0.017, OR 2.46 [1.2-5.3]	6 (30.0) p=0.023, OR 3.97 [1.3-12.4]
<i>3DL1(-)/3DS1(+)/HLA-B^{Bw4}(-)</i>	4 (3.5)	3 (2.1)	3 (2.4)	0
<i>3DL1(+)/3DS1(+)/HLA-A^{Bw4}(+)</i>	11 (11.6)	15 (10.4)	13 (10.5)	2 (10.0)
<i>3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-A^{Bw4}(+)</i>	17 (17.9)	36 (25.0)	29 (23.4)	7 (35.0)
<i>3DL1(-)/3DS1(+)/HLA-A^{Bw4}(+)</i>	4 (4.2)	6 (4.2)	6 (4.8)	0
<i>3DL1(+)/3DS1(+)/HLA-A^{Bw4}(-)</i>	28 (29.5)	28 (19.4)	24 (19.4)	4 (20.0)
<i>3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-A^{Bw4}(-)</i>	29 (30.5)	55 (38.2)	48 (38.7)	7 (35.0)
<i>3DL1(-)/3DS1(+)/HLA-A^{Bw4}(-)</i>	6 (6.3)	4 (2.8)	4 (3.2)	0

*KIR/HLA лигандни комбинации, които не са идентифицирани в никоя от изследваните групи не са представени, ns- not significant, без статистическа значимост.

Участието на NK клетките в противовирусната защита на организма е безспорно. Правдоподобно е да се предположи, че полиморфизми в KIRs и техните HLA клас I лиганди, предетерминиращи на генно ниво NK клетъчната функционална активност в посока на повишена инхибиция и/или понижена активация, може да благоприятстват изплъзването на вирус инфектираните клетки от вродения имунен надзор и да участват пряко в патогенезата и развитието на вирусни инфекции, както и в механизмите на вирусна персистенция и хронифициране на инфекциозното заболяване. По отношение на взаимодействията между KIR и HLA лиганди, предишни изследвания подчертават значението им за вирусните инфекции (274-276). Въпреки това, малко е известно за комбинации KIR/HLA-C при хроничния хепатит В. Данните за ролята на KIR генния фон за възприемчивостта, оздравяването или хронифицирането на инфекцията с HBV сред населението са оскъдни и противоречиви (261, 277). В достъпната ни литература открихме малък брой проучвания на KIR/лигандния полиморфизъм при хепатит В (259). В настоящата работа за пръв път у нас беше проучена ролята на двете основни генетични системи, участващи в регулацията на NK клетъчната функция – KIRs и KIR HLA клас I лигандите им при инфекциозни вирусни заболявания, в частност хепатит В вирусна инфекция (хронични носители и преболедували).

В зависимост от аминокиселинния остатък на позиции 77 и 80 бяха определени честотата на хетерозиготните носители на група С HLA лиганди (HLA-C1C2) и хомозиготните индивиди (HLA-C1C1 или HLA-C2C2).

Разпределението на отделните HLA-C лигандни групи и алотипни комбинации сред пациентите и здравите контроли показва, че при хроничните носители на HBV честотата на C1 група лиганди е най-ниска, като разликата е значима спрямо контролната здрава популация. Това определя носителството на HLA-C2 лиганди като предразполагащи, а HLA-C1 лигандната група като протективна за развитието на хроничен хепатит. В съответствие с нашите резултати Гао и сътр. провеждат изследване на азиатската популация и установяват, по-висока честота на HLA-C2 лигандна група при пациентите с хронична инфекция. Те са направили сравнителен анализ въз

основа на присъствието или отсъствието на HLA-C1 или HLA-C2 лиганди. Индивидите хомозиготни за HLA-C1(C1C1) лиганди са по-рядко срещани в групата на пациентите (43,4% vs.57.9%, $p = 0.01$; OR = 0.56; 95% CI, 0.36-0.87) в сравнение с контролната група. Пациентите, носещи само HLA-C2(C2C2) алели (10,4% срещу 5,0%) и тези, които имат и двете HLA-C1C2 алели (46.2% срещу 37.1%) са били по-чести при сравнение със здрави индивиди, но не са достигнали статистическа сигнификантност. Популационно генетичния анализи показват, че честотата и разпределение на KIR гени и хаплотипове варират при различните етноси. Тази вариабилност на KIR фенотипните честоти в различните етнически групи от населението могат да бъдат свързани с целеви NK клетъчни отговори към различни инфекционни причинители (259).

Предразполагащият ефект на HLA клас I лигандната група HLA-C2 и противоположно протективният ефект на HLA-C1 вероятно са свързани с функционално значимо инхибиторно KIR/лигандно взаимодействие, което е в подкрепа на ролята на HLA клас I лигандния полиморфизъм за регулацията на NK-медиацията противовирусен имуен надзор. Известно е, че съществува йерархия в силата и афинитета на KIR/HLA лигандното свързване от инхибиторните KIR, взаимодействащи с HLA-C лигандите. Най-силен сигнал се предава от KIR2DL1, следван от KIR2DL2 и най-слаб от KIR2DL3. Допълнително инхибиторните KIR са с по-голям афинитет на свързване в сравнение с активиращите им аналози. Обобщено може да се предположи, че по-високата честота на HLA-C2 позитивни индивиди при болните, съответства на по-силна HLA-C2 медирана NK клетъчна инхибиция, опосредствена от KIR2DL1 рецепторно взаимодействие и обратно протективният ефект на HLA-C1, свързващ KIR2DL2/L3, вероятно се асоциира с по-слаба инхибиция и по-силна противовирусна активност.

Единственият функционално значим генотип с протективна роля за развитие на HBV инфекция е KIR2DL2(+)/HLA-C1(+), който вероятно е в съответствие с описаната вече по-високата честота на HLA-C1 лиганди сред здравите контроли. Gao и сътр. (259) също установяват KIR2DL3 или KIR2DL3 хомозиготност в присъствието на HLA-C1C1 генотип като протективен при хронична HBV инфекция.

Независимо, че механизмите за регулиране на НК клетъчната функция не са напълно изяснени е известно, че МНС клас I молекулите като основни лиганди, влияят върху инхибирането и активирането на НК клетките чрез KIR специфично разпознаване. По този начин индивидуалните HLA-C, HLA-B/A^{Bw4} и HLA-A алотипи са пряко свързани с функцията съответно на KIR2D и KIR3D рецепторите, което изисква анализ на KIR в контекста на съответните им лиганди.

При определяне разпространението на HLA-Bw4 според присъствието на Ile80 или Thr80 на посочената позиция се установиха различия в честотата на индивидите носещи HLA-Bw4 алел с аминокиселината изолевцин на 80 позиция (HLA-Bw4^{Ile80}). Техният процент беше статистически значимо по-нисък при пациентите с хепатит В вирусна инфекция в сравнение с контролната група (47.2% v.s. 63.7%, p=0.008). Тази разлика е обусловена от намалена честота на HLA-Bw4^{Ile80} позитивните индивиди в двете подгрупи HBV инфектирани, сформиращи общата група болни, но е по-силно изразена при преболедевалите от HBV, при които HLA-Bw4^{Ile80} позитивността е едва 30.0 % (преболедевали vs. здрави: 30.0% vs. 63.7%, p=0.005). Анализът на резултатите между двете групи болни показва, че установената тенденция е запазена като такава и при сравнението на хроничните носители спрямо преболедевалите пациенти (хронични носители vs. преболедевали: 50.0% vs. 30.0%, p=0.076). Поради значително по-ниската честота на KIR3DS1 в сравнение с KIR3DL1 и известният по-голям афинитет на свързване на инхибиторните KIRs в сравнение с активиращите им аналози, може да се предположи, че експресията на HLA-Bw4 лиганди има значение по-скоро за поддържане на НК клетките в състояние на хипореактивност, отколкото да допринесе за тяхната активация, чрез KIR3DS1/HLA-B^{Bw4} взаимодействие. Освен това, други изследвания показват, че HLA-Bw4 алел с аминокиселината изолевцин на 80 позиция, който се свързва с по-висок афинитет с инхибиторния KIR3DL1, отколкото HLA-Bw4 алела с треонин на същата позиция намалява цитотоксичния потенциал на НК клетките и увеличава риска от НСС честота (224). Следователно активираните НК клетки участват в HBV асоциирани усложнения като НСС, което от своя страна показва ролята на генетичния фонд на гостоприемника -KIR и HLA. Пан и сътр. установяват, че комбинацията от HLA-C1C1 хомозиготност, HLA-Bw4^{Ile80} позитивност и KIR2DS4 (KIR2DS4 /dell) са свързани с увеличаване риска за развитие на НСС.

При анализирание на KIR/HLA клас I лигандните комбинации се установи, че всеки от изследваните индивиди притежава поне една функционална рецепторна-лигандна двойка, в която участва KIR с инхибиращ потенциал. Този факт не е ново откритие, а потвърждава есенциалното значение на KIRxDLx/HLA клас I лигандното взаимодействие в регулацията на NK клетъчната автоцитотоксичност. Най-честата комбинация от инхибиторен KIR и съответния му HLA лиганд е KIR2DL2/L3/HLA-C1 (84.1% здрави и 73.6 пациенти), последвана от KIR3DL1/HLA-BBw4 (68.1% здрави контроли и 60.4% пациенти), KIR2DL1/HLA-C2 (59.3% здрави контроли и 69.4% пациенти) и KIR3DL1/HLA-ABw4 (29,5% здрави контроли и 35,4 % пациенти).

Установените асоциации на KIR/HLA клас I лигандните генотипи: KIR3DS1(+)/HLA-ABw4(-), KIR2DL1(-)/2DS1(-)/HLA-C2(+), KIR2DL2(+)/HLA-C1(-), KIR3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-BBw4(-) са трудни за интерпретация, тъй като това са функционално инертни генотипни комбинации, в които липса свързващия лиганд или неговият специфичен рецептор и те не би следвало да имат отношение върху болестната предразположеност като регулатори на NK клетъчната антивирусна активност.

Обобщавайки получените резултати, както и наличните, макар и оскъдни данни в литературата, може да се допусне, че генетично обусловените профили на KIR и KIR/лигандните комбинации от една страна и от друга страна епистатични взаимодействия между определени HLA и KIR хаплотипи могат да допринесат за генерирането на динамичен имунен отговор, осигуряващ успешното елиминиране на вирус инфектираните клетки или за превалирането на инхибиторни KIR фенотипи и KIR/лигандни комбинации, благоприятстващи използване от имунния контрол и представляващи рисков генетичен профил. Все още обаче точният механизъм на действие на активиращите и инхибиторните рецептори остава неизяснен. На базата на литературните данни се предлагат различни модели на взаимодействие на KIR и HLA генетичните системи при NK клетъчно разпознаване и елиминиране на вирусно инфектирани клетки, което налага по-обстойни функционални изследвания за изясняване на биологичната роля на KIR в инфекциозния имунитет.

ОБОБЩЕНИЕ

Днес се счита, че полиморфизмът на KIR и HLA гените, кодиращи молекулите на имунния отговор, може да определя предразположеността и развитието на инфекциозни заболявания. През последните няколко години генетичната предразположеност към инфекция с хепатит В е широко изследвана при различни етнически групи. Специфични HLA алели са били асоциирани с вирусна устойчивост и персистиране. Нашето изследване се проведе, за да се определи връзката на имуногенетичният профил на гостоприемника (HLA алели, KIR алели, HLA хаплотипи и KIR/лигандни комбинации) с изхода от HBV инфекция при българското население.

Проучването на HLA гените показва, че предразполагащи за хронифициране на инфекцията в нашата популация са алелните групи: HLA-B*08, В*35 , HLA-DRB1*03, докато DRB1*13 е със значимо понижена честота. Установиха се статистически достоверни повишени честоти на HLA-A*25 и В*44 алелни групи при пациенти, оздравели от инфекцията в сравнение с тези с хронична инфекция и контролната група. Значително повишена е честотата на А-01 В-08 DRB1-03 хаплотипа при пациентите с хронична инфекция.

Разпределението на изследваните KIR гени и алелни варианти при пациентите с HBV инфекция като цяло не се отличава съществено от това на здравите индивиди от българската популация.

Намерената тенденция за по-висока честота на активирания KIR3DS1 в здравата популация спрямо общата група на болелите вероятно допринася за повишена НК клетъчна антивирусна защита и предпазване от развитието на вирусни инфекции.

Нашите резултати показват, че инхибиторния KIR2DL5 и неговия алелен вариант KIR2DL5B, логично свързани с по-висока инхибиторна НК-клетъчна функция, имат сигнификантно предразполагащ ефект за хроничност при HBV инфекция.

Установена бе също по-висока честота на функционално инертния вариант на KIR3DL1 гена (KIR3DL1*004) сред болните. Беше наблюдавана и слабо изразена тенденция за по-нисък процент на KIR2DL5 (като цяло) и на KIR3DS1 позитивни индивиди в групата на заболелите сравнено със здравите контроли.

Най-честият генотип и в двете групи (зdravi контроли и пациенти) е ID1, отговарящ на хомозиготност по група А KIR хаплотипи (ID1- 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1).

Предразполагащият ефект на HLA клас I лигандната група HLA-C2 и противоположно протективният ефект на HLA-C1 вероятно са свързани с функционално значимо инхибиторно KIR/лигандно взаимодействие, което е в подкрепа на ролята на HLA клас I лигандния полиморфизъм за регулацията на NK-медиацията противовирусен имунен надзор. Обобщено може да се предположи, че по-високата честота на HLA-C2 позитивни индивиди при болните съответства на по-силна HLA-C2 медирана NK-клетъчна инхибиция, опосредствена от KIR2DL1 рецепторно взаимодействие и обратно протективният ефект на HLA-C1 вероятно се асоциира с по-слаба инхибиция и по-силна противовирусна активност.

Единственият функционално значим генотип с протективна роля за развитие на HBV инфекция е KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(+), който вероятно е следствие от описаната вече по-високата честота на HLA-C1 лиганди сред здравите контроли.

Въз основа на нашите резултати бихме могли да приемем, че имуногенетичният профил от HLA, KIR и KIR/лигандни комбинации, установен при пациенти с хроничен хепатит В в сравнение със здравите контроли и оздравели индивиди, предразполага към персистиране на вирусната инфекция и насочва към възможна роля на изброените генетични системи за хронифициране на инфекцията с HBV.

Изводи

1. Въведеният, оптимизиран и валидиран метод за количествено определяне на HBV-DNA, чрез използване на Real Time PCR метод, е надежден и може да се използва рутинно в лабораторната практика.
2. Потвърди се, че най-честия генотип сред пациентите от български произход е генотип D.
3. Установиха се сигнификантни HLA асоциации с изхода от HBV инфекция в българската популация:
 - А. Предразполагащи за хронифициране на инфекцията са алелните групи: HLA-B*08, В*35, DRB1*03.
 - Б. Протективни за хронифициране на инфекцията се установиха алелните групи: HLA-A*25, В*44, DRB1*13.
 - В. Предразполагащи за хронифициране на инфекцията са хаплотипите: А*01-В*08-DRB1*03, А*24-В*35-DRB1*11.
4. Установиха се HLA алели и хаплотипи свързани с незадоволителен и добър отговор при лечение на хронично инфектирани пациенти с нуклеозидни/нуклеотидни аналози.
 - А. Инхибиторния KIR2DL5B, пряко свързан с по-висока инхибиторна NK - клетъчна функция е предразполагащ за хронифициране на инфекцията.
 - Б. KIR генотип със съотношение 0.57 (4 активиращи KIRs/7 инхибиторни KIRs) с по-силен инхибиторен NK-клетъчен потенциал, е предразполагащ, докато KIR генотип със съотношение 0.67 (4 активиращи KIRs/6 инхибиторни KIRs) с по-слаба инхибиторна NK-клетъчна активност, е протективен за хронифицирането на HBV инфекцията.

В. Носителството на **HLA-C2** лиганди има предразполагащ ефект за развитие на инфекция, докато **HLA-C1** лигандната група е с протективен ефект за хронифициране на инфекцията.

Г. Функционално значимият генотип **KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(+)** е с протективна роля при HBV инфекция.

5. Установените предразполагащи генетични фактори могат да бъдат използвани като биомаркери за изхода от HBV инфекция.

Справка за приноси

I. Теоретични (научно-експериментални) приноси

1. За първи път у нас се оцени влиянието на генетичните фактори управляващи вродения и адаптивен имунен отговор при хронично инфектирани пациенти и спонтанно оздравели от инфекция с HBV.
2. За първи път в българската популация се проучи полиморфизма на HLA клас I (-A и -B) и клас II (DR) при хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти, като се установиха асоциации на HLA алели и хаплотипи с изхода от HBV инфекция.
3. За първи път в българската популация се проучи полиморфизма на KIR гените и техните HLA клас I лиганди при хронично инфектирани и при пациенти, спонтанно оздравели от инфекция с HBV, като се установиха асоциации на KIR алели и KIR/лигандни комбинации с изхода от инфекцията.
4. За първи път в българската популация се проучи влиянието на броя активиращи KIRs / инхибиторни KIRs за протичането на HBV инфекция.
5. За пръв път у нас се проучи влиянието на HLA алели и хаплотипи при лечение с нуклеозидни/нуклеотидни аналози на пациенти с хронична HBV от българската популация.

II. Приложни (научно-практически) приноси

1. Въведен, валидиран и оптимизиран е Real-time PCR метод за количествено определяне на HBV-ДНК с много добра аналитична чувствителност и широк линеен обхват, с ниска себестойност приложим в рутинна практика за изследване на вирусен товар.
2. Въведен и оптимизиран е PCR-SSOP метод за изследване на вирусния генотип при пациенти с хронична HBV инфекция.
3. Особено значим принос на настоящата работа е установяването на генетични фактори, които могат да бъдат използвани, като прогностични биомаркери за изхода от HBV инфекция и отговора на лечение с нуклеозидни/нуклеотидни аналози.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* 2005;34:1329-39.***EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic Hepatitis B. *J Hepatology* 2012;57:167-85.
2. Ciccozzi, M., Babakir-Mina, M., Lo Presti, A., Salpini, R., Cella, E., Gabanelli, E., Teoharov, P., Kevorkyan, A., Perno, C.F., Zehender, G., Ciotti, M. Molecular analysis of hepatitis B virus in Bulgaria (2013) *Journal of Medical Virology*, 85 (1): 49-54.
3. Wasley A, Grytdal S, Gallagher K. Surveillance for acute viral hepatitis--United States, 2006. *MMWR Surveill Summ* 2008;57:1-24.
4. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 2007;13:22-38.
5. Stephan Urban, Yi Ni, Jessika Sonnabend, Stefan Seitz, The Pre-S2 Domain of the Hepatitis B Virus Is Dispensable for Infectivity but Serves a Spacer Function for L-Protein-Connected Virus Assembly *J Virol*. 2010 April; 84(8): 3879–3888.
6. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res* 2008;134:235-
7. Summers J. The replication cycle of hepatitis B viruses. *Cancer* 1988;61:1957-62.
8. Lutwick LI, Robinson WS. DNA synthesized in the hepatitis B Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* 1977;21:96-104.
9. Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 1986;232:477-84.
10. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68.
11. Lee JY, Locarnini S. Hepatitis B virus: pathogenesis, viral intermediates, and viral replication. *Clin Liver Dis* 2004;8:301-20.
12. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 2007;11:685-706.
13. Zoulim F, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol* 1994;68:6-13.
14. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 2011;55:996-1003.
15. Schmitz A, Schwarz A, Foss M, et al. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000741.
16. Roggendorf M, Schulte I, Xu Y, Lu M. Therapeutic vaccination in chronic hepatitis B: preclinical studies in the woodchuck model. *J Viral Hepat* 2007;14 Suppl 1:51-7.
17. Roggendorf M, Tolle TK. The woodchuck: an animal model for hepatitis B virus infection in man. *Intervirology* 1995;38:100-12.
18. Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-independent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 2007;46:1759-68.
19. Gripon P, Cannie I, Urban S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 2005;79:1613-22.
20. Engelke M, Mills K, Seitz S, et al. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* 2006;43:750-60.

21. Meier A, Mehrle S, Weiss TS, et al. Myristoylated preS1-domain of the hepatitis B virus L protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* 2013; 58:31-42.
22. Kann M, Schmitz A, Rabe B. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2007;13:39-47.
23. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51:581-92.
24. Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *Journal of Clinical Investigation* 2009;119:1745-54.
25. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009;137:1593-608 e1-2.
26. Zoulim F. Assessment of treatment efficacy in HBV infection and disease. *J Hepatol* 2006;44 Suppl 1:S95-9
27. Dandri M, Volz TK, Lutgehetmann M, Petersen J. Animal models for the study of HBV replication and its variants. *J Clin Virol* 2005;34 Suppl 1:S54-62.
28. Lutgehetmann M, Volz T, Kopke A, et al. In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatology* 2010;52:16-24. (Abstract)
29. Rehmann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996;2:1104-8.
30. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507.
31. Chronic hepatitis B: diagnosis, monitoring and management, Ben Hudson, Peter Collins Prescriber Volume 25. Issue 21, pages 37-43, 5 November 2014
32. Chu CM, Liaw YF, Pao CC, Huang MJ. The etiology of acute hepatitis superimposed upon previously unrecognized asymptomatic HBsAg carriers. *Hepatology* 1989;9:452.
33. Tsang TK, Blei AT, O'Reilly DJ, Decker R. Clinical significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody positivity. *Dig Dis Sci* 1986;31:620. (Abstract)
34. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000;46:2027-49. (Abstract)
35. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010;139:483-90. (Abstract)
37. Sibnarayan Datta, Soumya Chatterjee, Vijay Veer, Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus *World J Gastroenterol* 2014 October 28; 20(40): 14615-14625, ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)
38. Paraskevis D, Haida C, Tassopoulos N, Raptopoulou M, Tsantoulas D, Papachristou H, Sypsa V, Hatzakis A. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of HBV DNA. *J Virol Methods* 2002; 103: 201-212 PMID: 12008014 DOI: 10.1016/S0166-0934(02)00033-2]
39. Mullis K.B, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350 PMID: 3431465 DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
40. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 337, DOI: 10.1016/S1473-3099(04)01044-8
41. 1 Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Hepatitis B Virus DNA Ren Wei Chen, Heli Piiparinen, Mikko Seppänen, Pentti Koskela, Seppo Sarna, and Maija Lappalainen *Journal of Medical Virology* 65:250±256 (2001)
42. Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HBsAg Subtypes Helene Norder, Anne-Marie Couroucé, Pierre Coursaget, José M. Echevarria, Shou-Dong Lee, Isa K. Mushahwar, Betty H. Robertson, Stephen Locarnini Lar, O. Magnus, *Intervirology* 2004;47:289-309

43. Kao J.H, Wu N.H, Chen P.J, Lai M.Y, Chen D.S, Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy.. J Hepatol. 2000 Dec;33(6):998-1002.
44. Hepatitis B Virus Genotype and DNA Level and Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study in Men Ming-Whei Yu , Shiou-Hwei Yeh , Pei-Jer Chen , Yun-Fan Liaw , Chih-Lin Lin , Chun-Jen Liu , Wei-Liang Shih , Jia-Horng Kao , Ding-Shinn Chen , JNCI J Natl Cancer Inst (2005) 97 (4):265-272 doi: 10.1093/jnci/dji043
- 45 Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma Qi Zhang , Guangwen Cao Hepat Mon. 2011;11(2):86-91
46. 43-45ст., ген-2007 Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B Alexandra Valsamakis* CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, July 2007, p. 426–439).
47. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. J Hepatol. 2000 Dec;33(6):998-1002.
48. Chronic hepatitis B and viral genotype: the clinical significance of determining HBV genotypes *Toumy Guettouche and H James Hnatyszyn*). Antiviral Therapy 10:593–604 генотип3
49. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. J Virol 2004;78: 7867–7873.
50. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. Nature 413, 732–738
51. Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med 198, 513–520.
52. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science 303, 1526–1529.
53. Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Mingari, M. C. & Moretta, A. (2005). Human natural killer cells: molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. Immunol Lett 100, 7–13.
54. Birtom C. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. Curr Opin Immunol 1997; 9: 24-34.
55. Naumova E., Mihaylova A., Stoitchkov K. et al. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligand in melanoma patients: Prevalance of inhibitory over activating signals. Cancer Immunol. Immunother 2005; 54: 172-178.
56. Parham P. The body's defenses against infection. In: Parham P, editors. The imune system. New York: Garland Science 2005: 252-256.
57. Garni-Wagner B., Purohit A., Mathew P., Bennett M. and Kumar V. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. J Immunol 1993; 151: 60-70.
58. Biassoni R., Pessino A., Bottino C., Pende D., Moretta L., Moretta A. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. Eur J Immunol 1999; 29: 1014-1020.
59. Shi L., Kam C., Powers J., Aebersold R. and Greenberg A. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions J. Exp. Med. 1992; 176: 1521-1529.
60. Божков Б., Огнянов М. Клинична имунология- първо издание, Знание, 1997.
61. Kulkarni S., Martin M., Carrington M. The yin and yang of HLA and KIR in human disease. Semin Immunol 2008; 20: 343–352.
62. Karre K., Ljunggren H., Piontek G., Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. Nature 1986; 319: 675-678.
63. Shinkai S., Shore S., Shek P., Shephard R. Acute exercise and immune function. Relationship between lymphocyte activity and changes in subset counts. Int J Sports Med 1992; 13: 452-461.

64. Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Immunol* 2002; 169: 5188–5195
65. Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, Niesters HG, Zondervan PE, De Man RA et al. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003; 10: 159–167.
66. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 921–930.
67. Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 10702–10707
68. Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Immunol* 2002; 169: 5188–5195.
69. Biermer M, Puro R, Schneider RJ. Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid Integrity through activation of NFkappaB. *J Virol* 2003; 77: 4033–4042.
70. Guidotti LG, Morris A, Mendez H, Koch R, Silverman RH, Williams BR et al. Interferon regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 2617–2621.
71. Baron, J. L., Gardiner, L., Nishimura, S., Shinkai, K., Locksley, R. & Ganem, D. (2002). Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 16, 583–594.
72. Trobonjaca, Z., Leithauser, F., Moller, P., Schirmbeck, R. & Reimann, J. (2001). Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN-c release by liver NKT cells. *J Immunol* 167, 1413–1422.
73. Guidotti, L. G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R. & Chisari, F. V. (1999). Viral clearance without destruction of infected cells
74. Bocharov, G., Ludewig, B., Bertoletti, A., Klenerman, P., Junt, T., Krebs, P., Luzyanina, T., Fraser, C. & Anderson, R. M. (2004). Underwhelming the immune response: effect of slow virus growth on CD8+-T-lymphocyte responses. *J Virol* 78, 2247–2254.
75. Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 10702–10707.
76. Pasquetto V, Guidotti LG, Kakimi K, Tsuji M, Chisari FV. Host-virus interactions during malaria infection in hepatitis B virus transgenic mice. *J Exp Med* 2000; 192: 529–536.
77. Webster, G. J., Reignat, S., Maini, M. K. & 9 other authors (2000). Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32, 1117–1124.
78. Cote, P. J., Toshkov, I., Bellezza, C. & 9 other authors (2000). Temporal pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: increased initial viral load and decreased severity of acute hepatitis during the development of chronic viral infection. *Hepatology* 32, 807–817.
79. Nakamura, I., Nupp, J. T., Cowlen, M., Hall, W. C., Tennant, B. C., Casey, J. L., Gerin, J. L. & Cote, P. J. (2001). Pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: chronicity as an outcome of infection is associated with a diminished acute hepatitis that is temporally deficient for the expression of interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha messenger RNAs. *Hepatology* 33, 439–447.
80. Menne, S., Roneker, C. A., Roggendorf, M., Gerin, J. L., Cote, P. J. & Tennant, B. C. (2002). Deficiencies in the acute-phase cell-mediated immune response to viral antigens are associated with development of chronic woodchuck hepatitis virus infection following neonatal inoculation. *J Virol* 76, 1769–1780.
81. Fong, T. L., Di Bisceglie, A. M., Biswas, R., Waggoner, J. G., Wilson, L., Claggett, J. & Hoofnagle, J. H. (1994). High levels of viral replication during acute hepatitis B infection predict progression to chronicity. *J Med Virol* 43, 155–158
82. Berquist, K. R., Peterson, J. M., Murphy, B. L., Ebert, J. W., Maynard, J. E. & Purcell, R. H. (1975). Hepatitis B antigens in serum and liver of chimpanzees acutely infected with hepatitis B virus. *Infect Immun*

12, 602–605

83. Korba, B. E., Cote, P. J., Wells, F. V., Baldwin, B., Popper, H., Purcell, R. H., Tennant, B. C. & Gerin, J. L. (1989). Natural history of woodchuck hepatitis virus infections during the course of experimental viral infection: molecular virologic features of the liver and lymphoid tissues. *J Virol* 63, 1360–1370.
84. Thimme, R., Chang, K. M., Pemberton, J., Sette, A. & Chisari, F. V. (2001). Degenerate immunogenicity of an HLA-A2-restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51. *J Virol* 75, 3984–3987.
85. Whalley, S. A., Murray, J. M., Brown, D., Webster, G. J., Emery, V. C., Dusheiko, G. M. & Perelson, A. S. (2001). Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* 193, 847–854.
86. Jilbert, A. R., Wu, T. T., England, J. M., Hall, P. M., Carp, N. Z., O'Connell, A. P. & Mason, W. S. (1992). Rapid resolution of duck hepatitis B virus infections occurs after massive hepatocellular involvement. *J Virol* 66, 1377–1388.
87. Kajino, K., Jilbert, A. R., Saputelli, J., Aldrich, C. E., Cullen, J. & Mason, W. S. (1994). Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. *J Virol* 68, 5792–5803.
88. Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K. A., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. (2003). CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 77, 68–76.
89. McClary, H., Koch, R., Chisari, F. V. & Guidotti, L. G. (2000). Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* 74, 2255–2264.
90. Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6669–6674.
91. Wieland, S. F., Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. (2000). Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 74, 4165–4173.
92. Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198, 513–520.
93. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529.
94. Trowsdale J., Barten R., Haude A., Stewart A. et al. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001; 181: 20-38.
95. Moretta L., Biassoni R., Bottino C., Mingari M., Moratta A. Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 2000; 9: 420–422.
96. Wilson M., Torkar M., Haude A., Milne S. et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4778–4783.
97. Crum K., Logue S., Curran M., Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens* 2000; 56: 313-326.
98. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>
99. Steffens U., Vyas Y., Dupont B., Selvakumar A. Nucleotide and amino acid sequence alignment for human killer cell inhibitory receptors. *Tissue Antigens* 1998; 51: 398-413.
100. Uhrberg M., Valiante N., Shum B., Shilling H. et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997; 7: 753-763.
101. Lainer L., Corliss B., Wu J. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998; 391: 703-707.
102. Kikuchi-Maki A., Catina T., Campbell K. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol*. 2005; 174: 3859-3863.

103. Kikuchi-Maki A., Yusa S., Catina T., Campbell K. KIR2DL4 is an IL-2 regulated NK cells receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN- γ production. *J Immunol.* 2003; 171: 3415-342.
104. Rajagopalan S., Fu J., Long E. Cutting edge: induction of IFN- γ production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 2001; 167: 1877–188.
105. Stern M., Ruggeri L., Capanni M., Mancusi A. and Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* 2008; 112: 708-710.
106. Mandelboim O., Reyburn H., Vales-Gomez M., Pazmany L. et al. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 1996; 184: 913-922.
107. Winter C., Long E. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol* 1997; 158: 4026–4028.
108. Collona M., Samaridis S. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 1995; 268: 405-408.
109. Moesta A., Norman P., Yawata M., Yawata N., Gleimer M., Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *Immunol* 2008; 180: 3969–3979.
110. Winter C., Gumperz J., Parham P., Long E., Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998; 161: 571–577.
111. Ahlenstiel G, Martin M.P., Gao X., Carrington M., Rehermann B. Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J Clin Invest* 2008; 118: 1017–1026.
112. Vales-Gomez M., Reyburn H., Erskine R., Strominger J. Differential binding to HLA-C of p50-activating and p-58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 95: 14326-14331.
113. Biassoni R., Pessino A., Malaspina A., Cantoni C. et al. Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3095-3099.
114. Stewart C., Laugier-Anfossi F., Vely F., Saulquin X. et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13224–13229.
115. Foley B., De Santis D., Lathbury L., Christiansen F., Witt C. KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol* 2008; 20: 555–563.
116. Graef T., Moesta A.K., Norman P.J., Abi-Rachet L. et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with 3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med* 2009; 206: 2557-2572.
117. Cella M., Longo A., Ferrara GB., Strominger JL., Colonna M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med* 1994; 180: 1235–1242.
118. Gumperz J., Litwin V., Philips J., Lanier L. and Parham P. The Bw4 public epitope of HLA- B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med* 1995; 181: 1133-1144.
119. Gumperz J., Barber L., Valiante N., Percival L. et al. Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor. *J Immunol* 1997; 158: 5237–1541.
120. Marsh S., Parham P., Dupont B., Geraghty DE. et al. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Nomenclature Report, 2002. *Tissue Antigens* 2003; 62: 79-86.
121. Thananchai H., Gillespie G., Martin MP., Bashirova A. et al.: Cutting edge: allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol* 2007; 178: 33-37.

122. Foley B., De Santis D., Van Beelen E., Lathbury L. et al. The reactivity of Bw4+ HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplants. *Blood* 2008; 112: 435–443.
123. Vales-Gomez M., Reuburn H., Mandelboim M., Strominger J. Kinetics of interaction of HLA-ligands with natural killer cell inhibitory receptors. *Immunity* 1998; 9: 337–344.
124. Single R., Martin MP., Gao X., Meyer D. et al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet* 2007; 39: 1114–1119.
125. Martin MP., Gao X., Lee J., Nelson G. et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31: 429–434.
126. Qi Y., Martin MP., Gao X., Jacobson L. et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2006; 2:e79.
127. Alter G., Martin MP., Teigen N., Carr WH. et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 2007; 204: 3027–3036.
128. Pende D., Biasson R., Cantoni C., Verdiani S et al. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes- A novel member of the p58-p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140 kD disulfide-linked dimer. *J Exp Med* 1996; 184: 505–518.
129. Witt C., Goodridge J., Gerbase-Delima M., Daher S., Christiansen F. Maternal KIR repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2004; 19: 2653–2657.
130. Carr W., Pando M., Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 2005; 175: 5222–5229.
131. O'Connor G., Guinan K., Cunningham R., Middleton D., Parham P. and Gardiner Cl. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cell. *J Immunol* 2007; 178: 235–241.
132. Gallimore, A., Dumrese, T., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. & Rammensee, H. G. (1998). Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides. *J Exp Med* 187, 1647–1657.
133. Kalams, S. A. & Walker, B. D. (1998). The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 188, 2199–2204.
134. Ciurea, A., Hunziker, L., Klenerman, P., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (2001). Impairment of CD4+ T cell responses during chronic virus infection prevents neutralizing antibody responses against virus escape mutants. *J Exp Med* 193, 297–305
135. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 961–968; quiz 969.
136. Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK et al. Modulation of the CD8+ T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322–3328.
137. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771–778.
138. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 188–196.
139. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 1996; 98: 1185–1194.

- 140 Ferrari C, Penna A, Bertolotti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1990; 145: 3442–3449.
- 141 Mizukoshi E, Sidney J, Livingston B, Ghany M, Hoofnagle JH, Sette A et al. Cellular immune responses to the hepatitis B virus polymerase. *J Immunol* 2004;173: 5863–5871.
- 142 Ferrari C, Bertolotti A, Penna A, Cavalli A, Valli A, Missale G et al. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* 1991; 88: 214–222.
143. Ferrari, C., Bertolotti, A., Penna, A. & 8 other authors (1991). Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* 88, 214–222.
144. Tsai, S. L., Chen, P. J., Lai, M. Y., Yang, P. M., Sung, J. L., Huang, J. H., Hwang, L. H., Chang, T. H. & Chen, D. S. (1992). Acute exacerbations of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. Implications for hepatitis B e antigen seroconversion. *J Clin Invest* 89, 87–96.
145. Rossol, S., Marinou, G., Carucci, P., Singer, M. V., Williams, R. & Naoumov, N. V. (1997). Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 99, 3025–3033.
146. Maini MK, Reignat S, Boni C, Ogg GS, King AS, Malacarne F et al. T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection. *Eur J Immunol* 2000; 30: 3067–3078.
147. Maini M, Boni C, Lee C, Larrubia J, Reignat S, Ogg G et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269.
148. Sprengers D, Molen RG, Kusters JG, Man RA, Niesters HM, Schalm SW et al. Analysis of intrahepatic HBV-specific cytotoxic T-cells during and after acute HBV infection in humans. *J Hepatol* 2006; 45: 182–189.
- 149 Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 68–76.
150. Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A et al. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000; 32: 1117–1124
151. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 921–930.
152. Ferrari, C., Penna, A., Bertolotti, A., Valli, A., Antoni, A. D., Giuberti, T., Cavalli, A., Petit, M. A. & Fiaccadori, F. (1990). Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 145, 3442–3449.
153. Jung, M. C., Spengler, U., Schraut, W. & 8 other authors (1991). Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 13, 310–317.
154. Penna, A., Artini, M., Cavalli, A. & 8 other authors (1996). Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 98, 1185–1194.
155. Penna, A., Del Prete, G., Cavalli, A. & 8 other authors (1997). Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 25, 1022–1027.
156. Rehmann, B., Fowler, P., Sidney, J., Person, J., Redeker, A., Brown, M., Moss, B., Sette, A. & Chisari, F. V. (1995b). The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 181, 1047–1058.
157. Webster, G. J., Reignat, S., Brown, D., Ogg, G. S., Jones, L., Seneviratne, S. L., Williams, R., Dusheiko, G. & Bertolotti, A. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 78, 5707–5719. 2004.
158. Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K. A., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. (2003). CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 77, 68–76.
159. Thursz, M. R., Thomas, H. C., Greenwood, B. M. & Hill, A. V. (1997). Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. *Nat Genet* 17, 11–12.

- 160 Thio, C. L., Thomas, D. L., Karacki, P. & 10 other authors (2003). Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 77, 12083–12087.
161. Pignatelli M, Waters J, Lever A, Iwarson S, Gerety R, Thomas HC. Cytotoxic T-cell responses to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis. Evidence that antibody modulation may cause protracted infection. *J Hepatol* 1987; 4: 15–21.
162. Maini M, Boni C, Lee C, Larrubia J, Reignat S, Ogg G et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269.
163. Chang JJ, Wightman F, Bartholomeusz A, Ayres A, Kent SJ, Sasadeusz J et al. Reduced HBV-specific CD4+ T-cell responses in HIV-1-HBV co-infected individuals receiving HBV-active antiretroviral therapy. *J Virol* 2005; 79: 3038–3051.
164. Sprengers D, van der Molen RG, Kusters JG, Hansen B, Niesters HG, Schalm SW et al. Different composition of intrahepatic lymphocytes in the immune-tolerance and immune-clearance phase of chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2006; 78: 561–568.
165. Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C et al. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001; 33: 963–971.
166. Beckebaum S, Cicinnati V, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H et al. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487–495.
167. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443: 350–354
168. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Wang G, Gimmig S et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8 + T cells leads to reversible immunedysfunction. *Nat Med* 2006; 12: 1198–1202.
- 169 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH et al. Restoring function in exhausted CD8T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439:682–687.
170. Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarova N, Spangenberg HC, Blum HE et al. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 2006; 80: 3532–3540.
171. Е.Наумова, М.Иванова, Главен комплекс на тъканна съвместимост-факти, хипотези, приложение в медицината, Лице, 2006.
- 173 Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol* 2007; 13(12): 1770-1787
174. M. A. Karan, N. E. Tascioglu, A. O. Ozturk, S. Palanduz, and M. Carin, “The role of HLA antigens in chronic hepatitis B virus infection,” *Journal of the Pakistan Medical Association*, vol. 52, no. 6, pp. 253–256, 2002.
175. Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, Lo SY. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 2004; 72: 17-25
176. Zeniya M, Watanabe F, Aizawa Y, Toda G. Immunogenetic background of hepatitis B virus infection and autoimmune hepatitis in Japan. *Gastroenterol Jpn* 1993; 28 Suppl 4: 69-75; discussion 76-80
177. Popov E.A, Levitan BN, Alekseev LP, Pronina OA, Suchkov SV. *Ter Arkh* 2005; 77: 54-59 Immunogenetic HLA markers of chronic viral hepatitis
178. Association of Human Leukocyte Antigen Class I Polymorphism with Spontaneous Clearance of Hepatitis B Surface Antigen in Qidong Han Population Fengqin Miao, Hang Sun, Ning Pan, Jinhuan Xu, Jie Qiu, Yuqing Shen, Wei Xie, and Jianqiong Zhang, Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology Volume 2013, Article ID 145725, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/145725>

179. Dieye A, Obami-Itou V, Barry MF, Raphenon G, Thiam A, Ndiaye R, Ndiaye M, Diaw ML, Diakhate L. *Dakar Med* 1999; 44: 166-170
180. Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, Goedert JJ, Hilgartner M, Strathdee SA, Duggal P, O'Brien SJ, Astemborski J, Carrington M. Comprehensive analysis of class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 12083-12087
181. M. Najafizadeh, N. Farhadi, B. Sarkari, Role of HLA-B7, B8, B27, and B51 in Protection against Hepatitis B Virus Infection, *Iran J Med Sci* December 2008; Vol 33 No 4 209
182. Jiang YG, Wang YM, Liu TH, Liu J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2221-2225
183. Han YN, Yang JL, Zheng SG, Tang Q, Zhu W. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5721-5724
184. Amarapurkar DN, Patel ND, Kankonkar SR. HLA class II genotyping in chronic hepatitis B infection. *J Assoc Physicians India* 2003; 51: 779-781
185. Cheng YQ, Lin JS, Huang LH, Tian DY, Xiong P. The association of HLA-DRB1 allele polymorphism with the genetic susceptibility to liver cirrhosis due to hepatitis B virus. *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2003; 20: 247-249
186. Thio CL, Carrington M, Marti D, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, Astemborski J, Thomas DL. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999; 179: 1004-1006
187. Martinetti M, Pacati I, Cuccia M, Badulli C, Pasi A, Salvaneschi L, Minola E, De Silvestri A, Iannone AM, Maccabruni A. Hierarchy of HLA-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 369-378
188. Meng XQ, Chen HG, Ma YL, Liu KZ. Influence of HLA class II molecules on the outcome of hepatitis B virus infection in population of Zhejiang Province in China. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 230-233
189. Liu HY, Kong BH, Luo X, Xu YP, Dai MS, Jiang S. *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2003; 38: 599-603 Study on the association between maternal-infantile vertical transmission of hepatitis B virus and human leukocyte antigen DR gene domain
190. Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, Kim YS, Park K, Kim DK, Moon YM. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000; 31: 1371-1373
191. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1065-1069
- in children with chronic hepatitis B virus infection: a long-term prospective sibling cohort study in Taiwan. *JPediatr* 2006; 148: 647-651
192. Cotrina M, Buti M, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Campins M, Esteban R, Guardia J. Study of HLA-II antigens in chronic hepatitis C and B and in acute hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol*. 1997 Mar; 20(3):115-8.
193. Shimbo M, Ohtsuka S, Sakaya S, Sakamoto S, Ikeda H, Sekiguchi S. Immunogenetic factors influencing HBV carrier state, the seroconversion and the development of chronic liver disease. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1990; 65: 67-73.
194. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CEM, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AVS. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1065-9.
195. Liu W., Kim J., Nwankwo C., Ashworth L. and Arm J. Genomic organization of the human leukocyte immunoglobulin-like receptors within the leukocyte receptor complex on chromosome 19q13.4. *Immunogenetics* 2000; 51: 659-669.

196. Hansasuta P., Dong T., Thananchi H., Weekes M. et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1673-1679.
197. Martin A., Freitas E., Witt C., Christiansen F. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* 2000; 51: 268–280.
198. Sambrook J., Bashirova A., Andersan H., Piatak M. et al. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. *BMC Genomics* 2006; 7: 209.
199. Norman P., Stephens H., Verity D., Chandanayingyong D., Vaughan R. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics* 2001; 52: 195-205.
200. Hsu K., Liu X., Selvakumar A., Mickelson E., O'Reilly R., Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002; 169: 5118–5129.
201. Shilling H., Guethlein L., Cheng N., Gardiner C. et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol* 2002; 168: 2307–2315.
- Gassner C., et al. Sequencing of a complete long KIR haplotype from chromosome 19: a derivation of tools for the precise identification of KIR haplotypes from genomic DNA. *Genomics*, in press
202. Gomez-Lozano N., Gardiner C., Parham P., Vilches C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 2002; 54: 314-319
204. Williams F., Maxell L., Halfpeny I., Meenagh A. et al. Multiple copies of KIR3DL/S1 and KIR2DL4 genes identified in a number of individuals. *Hum Immunol* 2003; 64: 729-732.
205. Middleton D., Meenagh A., Gourraud P. KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics*. *Immunogenetics* 2007; 59: 145-158
206. Maxwell L., Wallace A., Middleton D., Curran MD. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens* 2002; 60: 254–258.
207. Horton R., Coggill P., Miretti MM., Sambrook J.G., et al. The LRC haplotype project: a resource for killer immunoglobulin-like receptor-linked association studies. *Tissue Antigens* 2006; 68: 450–456.
208. Norman P., Cook M., Carey B., Carrington V. et al. SNP haplotypes and allele frequencies show evidence for disruptive and balancing selection in the human leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 2004; 56: 225–237.
209. Norman P., Carrington C., Byng M., Maxwell L., Curran M. et al. Natural killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. *Genes Immun* 2002; 3: 86-95.
210. Vilches C., Gardiner C., Parham P. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. *J Immunol* 2000; 165: 6416-6421
211. Besson C., Roetynck S., Williams F., Orsi L. et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin lymphoma in a familial study. *PLoS ONE*. 2007; 2: e406.
212. Hsu K., Chida S., Geraghty D., Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological Reviews* 2002; 190: 40-52.
213. Chen YY, Cheng M, Tian ZG. Hepatitis B virus down-regulates expressions of MHC class I molecules on hepatoplastoma cell line. *Cell Mol Immunol*. 2006;3:373-378.
214. Gaudieri S, Nolan D, McKinnon E, Witt CS, Mallal S, Christiansen FT. Associations between KIR epitope combinations expressed by HLA-B/-C haplotypes found in an HIV-1 infected study population may influence NK mediated immune responses. *Mol Immunol*. 2005;42:557-560.
215. Hallett WH, Murphy WJ. Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol Immunol*. 2004;1:12-21.
216. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R: New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens*, 2003; 61: 403–7

217. Association of KIR genotypes and haplotypes with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in Chinese Han population. Lu Z, Zhang B, Chen S, Gai Z, Feng Z, Liu X, Liu Y, Wen X, Li L, Jiao Y, Ma C, Shao S, Cui X, Chen G, Li J, Zhao Y. *Cell Mol Immunol*. 2008 Dec;5(6):457-63. doi: 10.1038/cmi.2008.57.
218. Role of KIR genes and genotypes in susceptibility to or protection against hepatitis B virus infection in a Turkish cohort. Kibar F, Goruroglu Ozturk O, Ulu A, Erken E, Inal S, Dinkci S, Kurtaran B, Tasova Y, Aksu HS, Yaman A. *mMed Sci Monit*. 2014 Jan 10;20:28-34. doi: 10.12659/MSM.889893
219. Gazit R, Garty BZ, Monselise Y, Hoffer V. et al. Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood* 2004; 103: 1965–1966.
220. Inhibitory KIR and specific HLA-C gene combinations confer susceptibility to or protection against chronic hepatitis B. Gao X, Jiao Y, Wang L, Liu X, Sun W, Cui B, Chen Z, Zhao Y. *Clin Immunol*. 2010 Oct;137(1):139-46. doi: 10.1016/j.clim.2010.05.011.
221. Jamil KM, Khakoo SI. Kir/hla interactions and pathogenimmunity. *J Biomed Biotechnol*; 2011: 298348. PMID: 21629750
222. Dhiman N, Bonilla RG, Jacobson RM, O'Kane D, Poland GA. Differential hla gene expression in measles vaccine seropositive and seronegative subjects: A pilot study. *Scandinavian journal of infectious diseases* 2003; 35: 332-336. PMID: 12875522
223. KIR and HLA loci are associated with hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B virus infection: a case-control study. Pan N, Jiang W, Sun H, Miao F, Qiu J, Jin H, Xu J, Shi Q, Xie W, Zhang J. *PLoS One*. 2011;6(10):e25682. doi: 10.1371/journal.pone.0025682. Epub 2011 Oct 5
224. HLA-KIR Interactions and Immunity to Viral Infections Masoud Sabouri Ghannad 1, Mehrdad Hajilooi 2, Ghasem Solgi 2* *Research in Molecular Medicine*, 20 2014, Vol: 2, Issue: 1, Pages: 1-2014, Vol: 2, Issue: 1, Pages: 1-20014, Vol: 2, Issue: 1, Pages: 1-20
225. Risk for hepatocellular carcinoma in the course of chronic hepatitis B virus infection and the protective effect of therapy with nucleos(t)ide analogues
226. Higher proportion of viral basal core promoter mutant increases the risk of liver cirrhosis in hepatitis B carriers.
227. European Association For The Study Of The Liver. EASLEORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 56: 908-943 [PMID: 22424438]
228. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57: 167-185 [PMID: 22436845 DOI: 10229.1016/j.jhep2012.02.010]
229. Risk stratification for hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma Chih-Lin Lin, and Jia-Horng Kao.
230. Impact of multiplicity of functional KIR-HLA compound genotypes on hepatocellular carcinoma.
231. S. Broeders , I. Huber , L. Grohmann, G. Berben , I. Taverniers , M. Mazzaraf , N. Roosens, D. Morisset Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, Volume 37, Issue 2, June 2014, Pages 115–126, *Trends in Food Science & Technology*
232. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of Hepatitis B Virus Genotypes A to G J. Clin Microbiol. 2006 Sep; 44(9): 3325–333 Tania M. Welzel Wendell J. Miley, Thomas L. Parks, James J. Goedert, Denise Whitby, and Betty A. Ortiz-Conde
- 233 Rapid Cycle Real-Time PCR Methods and Applications Prof. Dr. med. Stefan Meuer, Prof. Dr. Carl Wittwer, Dr. Kan-Ichi Nakagawara ISBN: 978-3-540-66736-0 (Print) 978-3-642-59524-0 (Online)
234. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR) Applied Biosystems (234)
235. Real Time PCR for Viral Load Quantification of Hepatitis Virus B in Côte d'Ivoire, West Africa Ngazoa-Kakou E. Solange, Mbengue-Kouassi Alphonsine, Doumbia Moussa, Coulibaly Ngolo David, Meite Syndou, Sylla

Aboubacar, Aoussi Serge, Faye-Kette Hortense, Dosso Mireille, 6-Journal of Microbiology Research and Reviews Vol. 2(4): 34-39, July, 2014

236. Quantitative Analysis of Hepatitis B Virus DNA by Real-Time Amplification I. Zanella · A. Rossini, D. Domenighini A. Albertini, E. Cariani, 7- Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2002) 21:22–26 DOI 10.1007/s10096-001-0648-2

237. Quantitation of Hepatitis B Virus Genomic DNA by Real-Time Detection PCR AKI ABE, AZUAKI INOUE, TAKESHI TANAKA , JUNKO KATO,NAOK I KAJIYAMA, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 0095-1137/99/\$04.0010 Sept. 1999, p. 2899–2903 Vol. 37, No. 9

238. Comparison of commercial assays for the quantification of HBV DNA load in health care workers: calibration differences. Gilbert N, Corden S, Ijaz S, Grant PR, Tedder RS, Boxall EH. J Virol Methods. 2002

239. Clinical outcomes of lamivudine therapy and HLA alleles in chronic hepatitis B patients Oh JM, Kwon KH, Kim JE, Choi JH, Beom SH, Lee SH, Lee YJ, Park MY, Jung MK, Lee KH [2008, 52(6):368-375].

240. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients.. Han YN, Yang JL, Zheng SG, Tang Q, Zhu W. World J Gastroenterol. 2005 Sep 28;11(36):5721-4.

241. Hung IF, Poon RT, Lai CL, Fung J, Fan ST, Yuen MF. Recurrence of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma is associated with high viral load at the time of resection. Am J Gastroenterol, 103, 2008:1663-1673.

242. Wu JC, Huang YH, Chau GY, Su CW, Lai CR, Lee PC, Huo TI, Sheen IJ, Lee SD, Lui WY. Risk factors for early and late recurrence in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. J Hepatol, 51, 2009:890-897.

243. Chen CH, Lee CM, Hung CH, Wang JH, Hu TH, Changchien CS, Lu SN. Hepatitis B virus genotype B results in better immediate, late and sustained responses to peginterferon-alfa in hepatitis-B-e-antigen-positive patients. J Gastroenterol Hepatol, 26, 2011:461-468.

244. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Intervirology. 2004;47(6):289-309.

245. You J, Zhuang L, Zhang YF, Chen HY, Sriplung H, Geater A, Chongsuvivatwong V, Piratvisuth T, McNeil E, Yu L, Tang BZ, Huang JH. Peripheral T-lymphocyte subpopulations in different clinical stages of chronic HBV infection correlate with HBV load. World J Gastroenterol, 15, 2009:3382-3393.

246. You J, Sriplung H, Geater A, Chongsuvivatwong V, Zhuang L, Chen HY, Huang JH, Tang BZ. Hepatitis B virus DNA is more powerful than HBeAg in predicting peripheral T-lymphocyte subpopulations in chronic HBV-infected individuals with normal liver function tests. World J Gastroenterol, 14, 2008:3710-3718.

247. Thimme, R., S. Wieland, C. Steiger, J. Ghayeb, K. A. Reimann, R. H. Purcell, and F. V. Chisari. 2003. CD8⁺ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. J. Virol. 77:68–76.

248. Tian Y, Qiu ZF, Li TS. [Difference and significance of peripheral blood T-lymphocyte subsets in patients with chronic hepatitis B and asymptomatic HBV carrier Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 85, 2005:3354-3358.

249. Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, Schneider PM, Buschenfelde KHM, Rittner C.

HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis Br J Hepatol 1997;26:503-7.

250. Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, Lo SY. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. J Med Virol 2004; 72: 17-25

251. HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. Itescu S1, Mathur-Wagh U, Skovron ML, Brancato LJ, Marmor M, Zeleniuch-Jacquotte A, Winchester R).

252. Candore, G., D. Cigna, M. Todaro, R. De Maria, G. Stassi, C. Giordano, and C. Caruso. 1995. T-cell activation in HLA-B8, DR3-positive individuals. Early antigen expression defect in vitro. Hum. Immunol. 42:289–294.

253. Candore, G., D. Cigna, F. Gervasi, A. T. Colucci, M. A. Modica, and C. Caruso. 1994. In vitro cytokine production by HLA-B8, DR3 positive subjects. *Autoimmunity* 18:121–132.
254. Caruso, C., G. Candore, A. T. Colucci, D. Cigna, M. A. Modica, G. Tantiello, and A. Salerno. 1993. Natural killer and lymphokine-activated killer activity in HLA-B8, DR3-positive subjects. *Hum. Immunol.* 38:226–230.
255. McErlean C, Gonzalez AA, Cunningham R, Meenagh A, Shovlin T, Middleton D. Immunogenetics. Differential RNA expression of KIR alleles, 62, 2010:431-440.
256. Chen YY, Cheng M, Tian ZG. Hepatitis B virus down- regulates expressions of MHC class I molecules on hepatoplastoma cell line. *Cell Mol Immunol.* 2006;3:373-378.
257. Gaudieri S, Nolan D, McKinnon E, Witt CS, Mallal S, Christiansen FT. Associations between KIR epitope combinations expressed by HLA-B/-C haplotypes found in an HIV-1 infected study population may influence NK mediated immune responses. *Mol Immunol.* 2005;42:557-560.
258. Hallett WH, Murphy WJ. Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol Immunol.* 2004;1:12-21
259. Inhibitory KIR and specific HLA-C gene combinations confer susceptibility to or protection against chronic hepatitis B..Gao X, Jiao Y, Wang L, Liu X, Sun W, Cui B, Chen Z, Zhao Y..*Clin Immunol.* 2010 Oct;137(1):139-46. doi: 10.1016/j.clim.2010.05.011
260. Jamil KM, Khakoo SI. Kir/hla interactions and pathogen immunity. *J Biomed Biotechnol;* 2011: 298348. PMID: 21629750
261. Zhiming L, Yu-lian J, Zhao-lei F, Chun-xiao W, Zhen-fang D, Bing-chang Z, Yue-ran Z. Polymorphisms of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Gene: Possible Association with Susceptibility to or Clearance of Hepatitis B Virus Infection in Chinese Han Population. *Croat Med J,* 48, 2007: 800–807.
262. Tamori A., Kawada N. HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections. *World J Gastroenterol,* 2013, 19, 5395-5401.
263. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R: New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens,* 2003; 61: 403–7
264. Gazit R, Garty BZ, Monselise Y, Hoffer V. et al. Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood* 2004; 103: 1965–1966.
265. Denis L., Sivula J., Gourraud P., Kerdudou N. et al. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. *Tissue Antigens* 2005; 66: 267-276.
266. Cao X., Lester S., Boetcher B., Cluskey Mc. J. Diversity of HLA genes in populations of Australia and the Pasific . In: Charron D, ed. Genetic diversity of HLA. Functional and medical implications. Vol I Paris:EDK, 1997: 298-306
267. Du Z., Gjertson D., Reed E., Rajalingam R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 2007; 59: 1-5.
268. Williams F., Maxell L., Halfpeny I., Meenagh A. et al. Multiple copies of KIR3DL/S1 and KIR2DL4 genes identified in a number of individuals. *Hum Immunol* 2003; 64: 729-732.
269. Djulejic E., Petlichkovski A., Trajkov D., Hristomanova S., Middleton D., Spiroski M. Distribution of killer cell immunoglobulinlike receptors in the Macedonian population. *Hum Immunol* 2010; 71: 281–288.
270. Williams F., Maxell L., Halfpeny I., Meenagh A. et al. Multiple copies of KIR3DL/S1 and KIR2DL4 genes identified in a number of individuals. *Hum Immunol* 2003; 64: 729-732.
- 271 Niokou D., Spyropoulou-Vlachou M., Darlamitsou A., Stavropoulos-Giokas C. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. *Human Immunology* 2003, 64, 1167-1176.
- 272 Whang D., Park H., Yoon A., Park M. Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. *Human Immunology* 2005; 66: 146-154.
- Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics* 2002; 54: 543-550.

273. Rajalingam R., Krausa P., Shilling H., Stein J.B. et al. Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of North India Hindus. *Immunogenetics* 2002; 53: 1009–1019.
274. Collona M, Samaridis S. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*, 268, 1995:405-408
- 274.V. Romero, J. Azocar, J. Zuniga, O.P. Clavijo, D. Terreros, X.Gu, Z. Husain, R.T. Chung, C. Amos, E.J. Yunis, Interaction ofNK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles,in hepatitis C virus infection outcome, *Mol. Immunol.* 45 (2008) 2429–2436.
275. S.I. Khakoo, C.L. , Thio M.P. Martin, C.R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, J. Cheng, J.J. Goedert, D. Vlahov, M. Hilgartner, S. Cox, A.M. Little, G.J. Alexander, M.E. Cramp, S.J. O'Brien, W.M. Rosenberg, D.L. Thomas, M. Carrington, HLA and NK cellinhibitory receptor genes in resolvinghepatitis C virusinfection, *Science* 305 (2004) 872–874.
276. G. Alter, M.P. Martin, N. Teigen, W.H. Carr, T.J. Suscovich, A.Schneidewind, H. Streeck, M. Waring, A. Meier, C. Brander, J.D. Lifson, T.M. Allen, M. Carrington, M. Altfeld, Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 3027–3036.
277. Lu Z, Zhang B, Chen S, Gai Z, Feng Z, Liu X, Liu Y, Wen X, Li L, Jiao Y, Ma C, Shao S, Cui X, Chen G, Li J, Zhao Y. Association of KIR genotypes and haplotypes with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Cell Mol Immunol*, 5, 2008:457-463