

Received: 2010.12.17  
Accepted: 2011.03.24  
Published: 2011.04.21

## Wpływ polimorfizmu wirusa zapalenia wątroby typu B na przebieg choroby u osób przewlekle zakażonych\*

### The influence of hepatitis B virus polymorphism on the progression of chronic liver disease

Magda Rybicka<sup>1</sup>, Piotr Stalke<sup>2</sup>, Urszula Charmuszko<sup>3</sup>, Krzysztof Piotr Bielawski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>2</sup> Klinika Chorób Zakaźnych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>3</sup> Zakład Mikrobiologii Molekularnej i Serologii – Krajowy Ośrodek Salmonella, Katedra Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

#### Streszczenie

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) jest problemem ogólnoswiatowym, który dotyka ponad 350 milionów ludzi. Jest jedną z ważniejszych przyczyn przewlekłego zapalenia wątroby prowadzącego do rozwoju marskości wątroby, a następnie raka wątrobowokomórkowego. Charakterystyczną cechą wirusa HBV jest jego duża zmienność genetyczna, która powstaje na skutek błędów polimerazy. Odwrotna transkryptaza wirusa nie ma bowiem aktywności korekcyjnej błędów replikacyjnych, co skutkuje większą niż w przypadku innych wirusów DNA frekwencją mutacji. Występowanie rozmaitych wariantów wirusa HBV ma istotny wpływ na przebieg zakażenia. Dotąd zidentyfikowano 8 genotypów wirusa (A–H), a ich występowanie uzależnione jest od położenia geograficznego. Określenie typu genetycznego HBV dostarcza informacji na temat aktywności choroby, tempa progresji w kierunku marskości i pierwotnego raka wątroby.

Naturalny polimorfizm wirusa sprzyja powstawaniu zmian w sekwencji genomu wirusa HBV, które mają istotny wpływ na przebieg zakażenia oraz powstawanie wariantów o obniżonej wrażliwości na leki przeciwwirusowe. Zmienność genetyczna wirusa HBV jest jedną z głównych przyczyn przewlekłego zakażenia oraz trudności w terapii.

#### Słowa kluczowe:

HBV • genotyp • polimorfizm

#### Summary

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the major human health problems worldwide. It is estimated that chronic HBV infection affects more than 350 million people globally. It is one of the leading causes of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. High genetic variability is a characteristic feature of HBV as the viral polymerase lacks proofreading activity. The nucleotide substitution rate for HBV is 10-fold higher than for other DNA viruses.

Genetic variations of HBV influence the clinical outcome of HBV infection. There are eight genotypes of hepatitis B virus (A–H) that have a distinct geographical distribution. There is clinical significance of HBV genotype in terms of disease activity, risk of progression to cirrhosis, the development of hepatocellular carcinoma and response to antiviral treatments. Moreover,

\* Praca finansowana z grantu ST-79 Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego NN302183639.



polymorphism in HBV viral polymerase influences the development of HBV mutants resistant to nucleotide analogue treatment that is a consequence of treatment failure.

**Key words:** HBV • genotype • polymorphism

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=939665>

**Word count:** 4878

**Tables:** –

**Figures:** 3

**References:** 121

**Adres autora:** prof.dr hab. Krzysztof Piotr Bielawski, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: bielawski@biotech.ug.gda.pl

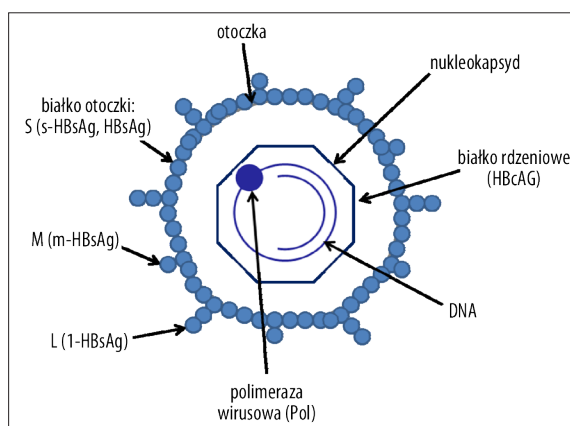
## 1. WIRUS ZAPALENIA WĄTROBY TYPU B

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) jest ogólnoswiatowym problemem dotykającym 30% całej populacji (anty-HBc plus), spośród której ponad 350 milionów cierpi na przewlekłe zapalenie wątroby (chronic hepatitis B – CHB). U blisko 30% osób proces ten prowadzi do rozwoju marskości wątroby, a następnie raka wątrobowokomórkowego (hepatocellular carcinoma – HCC). Szacuje się, że wirus HBV jest najczęstszym, po tytoniu, pojedynczym czynnikiem rakotwórczym [20,91]. Z powodu zakażenia HBV co roku rejestruje się na świecie ponad 1 mln zgonów [68,116]. W Polsce liczba nosicieli HBV (HBsAg dodatnich) stanowi około 1,3% populacji i sukcesywnie obniża się [12].

Wirus zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus – HBV) należy do rodziny *Hepadnaviridae* i rodzaju *Orthohepadnavirus* [103]. Do tej grupy zaliczane są również zwierzęce wirusy zapalenia wątroby: świstaka amerykańskiego (woodchuck hepatitis virus – WHV), wiewiórki ziemnej (ground squirrel hepatitis virus – GSHV) [66,95], kaczki pekińskiej (duck hepatitis B virus – DHBV) oraz czapli siwej (heron hepatitis virus – HHBV) [66]. Wszystkie hepadnawirusy wykazują swoisty hepatotropizm oraz zbliżony cykl życiowy. Umożliwiło to wykorzystanie ich jako modeli przebiegu zakażenia HBV, a doświadczenia prowadzone na zakażonych nimi zwierzętach laboratoryjnych pomogły w lepszym poznaniu biologii oraz przebiegu infekcji HBV u człowieka. Do tej pory nie było to możliwe, ponieważ wirus zapalenia wątroby typu B jest patogeny jedynie dla ludzi i niektórych małych naczelnych (szympanasy) [63,90].

### 1a. Budowa wirionu HBV

Cząsteczka infekcyjna wirusa HBV (wirion, ryc. 1), tzw. cząstka Dane'a [26], ma średnicę około 42 nm, otoczona jest białkowo-lipidowym płaszczem składającym się z trzech białek budujących strukturę otoczki: dużego (L), średniego (M) oraz małego (S) nazywanego białkiem powierzchniowym – HBsAg; Env (hepatitis B surface antigen; envelope protein) [91]. Białko S to główny komponent otoczki, przeciwciała skierowane przeciw niemu pełnią funkcję ochronną oraz umożliwiają neutralizację

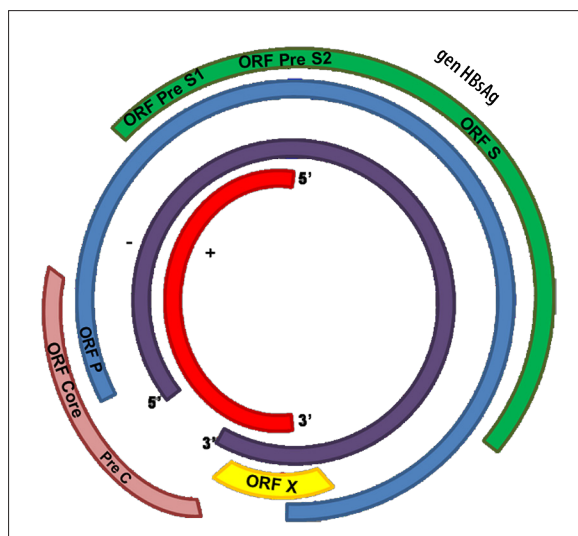


Ryc. 1. Budowa wirionu HBV (na podstawie [120] zmodyfikowano)

wirusa zanim zainfekuje on hepatocyt [16]. Rdzeń wirusa o średnicy 27–37 nm zawiera kolistą, częściowo dwuniciową HBV-DNA wraz z polimerazą DNA (antygen P) oraz starterem RNA otoczonymi przez antygen rdzeniowy wirusa – HBcAg (hepatitis B core antygen) [17]. Rdzeń cząstki wirusowej z materiałem genetycznym HBV oraz polimerazą wirusa nazywany jest nukleokapsydem [91]. W surowicy osób zakażonych HBV, oprócz pełnych cząstek wirusowych, występują też wiriony pozbawione nukleokapsydu. Te „niekompletne” cząsteczki HBV mogą mieć postać kolistą o średnicy 20–22 nm, bądź tubularną o długości 50–250 nm [91].

### 1b. Genom wirusa HBV

Cechą charakterystyczną wirusa jest jego unikalna struktura DNA, częściowo dwuniciowa. Kolisty kwas nukleinowy ma jedną nić niekompletną (relaxed circular DNA – rcDNA), która występuje na odcinku 10–50% długości nici pełnej. Genom HBV o wielkości 3128–3221 p.z. zbudowany jest z dwóch nici DNA o różnej długości, z których tylko dłuższa tworzy zamknięte koło. Genom HBV jest zatem częściowo jednoniciowy [85]. Pod względem wielkości genom HBV jest najmniejszym wśród genomów wirusów zwierzęcych. Utrzymanie kolistej struktury wirusa możliwe jest dzięki „lepkiemu” końcom 5' obu nici. Koniec 5' nici ujemnej DNA [L(-)] związany jest kowalencyjnie



Ryc. 2. Schemat genomu HBV. Wewnętrzne, niepełne okręgi przedstawiają genomowy DNA HBV. Wewnętrzny + reprezentuje zmienną co do długości dodatnią nić DNA. ORF to otwarte ramki odczytu (na podstawie [89] zmodyfikowano)

z N-terminalnym końcem polimerazy wirusa i stanowi matrycę do syntezy pregenomowego (pgRNA) RNA oraz mRNA. Z kolei nić dodatnia [S(+)] ma na końcu 5' oligorybonukleotyd pochodzący z końca 5' pgRNA, który jest starterem syntezy nici dodatniej. Końce 5' obu nici są komplementarne względem siebie i tworzą dsDNA, podczas gdy końce 3' są różne. Ta asymetria ma istotne znaczenie w mechanizmie replikacji wirusa [104,118].

Ujemna nić HBV DNA zawiera cztery częściowo nakładające się, otwarte ramki odczytu (open reading frame – ORF): ORF PreS/S, ORF PreC/C, ORF P oraz ORF X [71,107]. Kodują one następujące białka wirusowe (ryc. 2):

- region ORF PreS/S (gen *env*) koduje białka otoczki nukleokapsydu (L, M, S),
- ORF PreC/C polipeptydy rdzeniowe, które wchodzi w skład nukleokapsydu (HBcAg) i sekrecyjne białko HBeAg,
- ORF P (gen *pol*) koduje polimerazę, która ma aktywność trzech enzymów: DNA-zależnej polimerazy DNA, odwrotnej transkryptazy i RN-azy H,
- ORF X białko regulatorowe pX o wielkości 17 kDa.

### 1c. Białka wirusa HBV

Produktami ekspresji ramki odczytu preS/S są białka strukturalne otoczki wirusowej: S, M i L [17]. Zawierają one ten sam fragment C-końcowy, różnią się natomiast odcinkiem N-końcowym. Wszystkie trzy białka zawierają determinanty antygenowe i powodują powstawanie przeciwciał u osób zakażonych HBV.

Białko powierzchniowe S (HBsAg) stanowi główny składnik strukturalny otoczki HBV oraz niezakaźnych postaci wirusa [91]. Dominujące znaczenie ochronne mają przeciwciała przeciwko białku S (anty-HBs), które w niewielkich stężeniach mogą się utrzymywać w surowicy osób zakażonych nawet do końca życia [25]. Białko S pełni istotną rolę w cyklu życiowym wirusa HBV przez regulację procesu

formowania wirionu oraz uwalniania dojrzałych cząstek wirusowych do przestrzeni międzykomórkowej. Na podstawie różnic antygenowych białka S wyodrębniono podtypy serologiczne wirusa (serotypy). Swoistość antygenowa białka S związana jest z występowaniem w rejonie hydrofilnym białka (122-155aa) determinant (*a, d, w, y, r, q*) i subdeterminant (*w1-w4*) antygenowych. Obecność lub brak poszczególnych determinant w budowie białka zależy od obecności określonych aminokwasów w cząsteczce HBsAg i umożliwia wyróżnienie następujących serotypów wirusa: *ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4q-, adrq+ i adrq* [46].

Białko L jest niezbędne do połączenia HBV ze swoistym receptorem na powierzchni hepatocytu. Odgrywa ono również istotną rolę w procesie formowania i dojrzewania cząstek wirusowych, a także ich wydzielania do przestrzeni międzykomórkowych [4,16]. Nadmierne wytwarzanie tego białka, w stosunku do innych białek otoczki, powoduje zahamowanie wydzielania cząstek wirusa. Zjawisko to indukuje retencję wirusa, a to prowadzi do zwyrodnienia i uszkodzenia hepatocytów oraz ich wzmożonej proliferacji [110].

Białko M pełni głównie funkcję strukturalną, a jego nadekspresja i retencja w zakażonych hepatocytach wprowadza komórki w stan stresu oksydacyjnego, co może powodować jej uszkodzenie [88].

Produktem ekspresji ramki odczytu ORF preC/C jest główne białko rdzeniowe c (HBcAg, p21) oraz polipeptyd przedrdzeniowy (preC, p25), który potranslacyjnie modyfikowany jest do sekrecyjnej postaci HBcAg – antygeny e (HBeAg, p1-p18) [93]. Białko rdzeniowe c zbudowane jest z 183–185 aminokwasów. Pełni ono funkcję strukturalną, gdyż jego monomery łączą się ze sobą tworząc cząstkę rdzeniową. Cząsteczki białka wiążą się następnie z pgRNA, by po odwrotnej transkrypcji z DNA wirusa utworzyć nukleokapsyd. Za związanie kwasu nukleinowego wirusa odpowiedzialny jest bogaty w argininę C-końcowy fragment białka. Cząsteczki rdzeniowe ulegają fosforylacji w miejscach bogatych w serynę i treoninę, co umożliwia stabilizację struktury nukleokapsydu. HBcAg bierze udział w tworzeniu postaci cccDNA podczas replikacji oraz w jego transporcie do jądra hepatocytu. Proces opłaszczania nukleokapsydu oraz sekrecja dojrzałych cząstek wirusowych są również związane z działaniem białka c. HBcAg jest ponadto silnym antygenem, przeciwko któremu limfocyty wytwarzają niemające funkcji ochronnej przeciwciała. Utrzymują się one we krwi przez długi okres czasu, dzięki czemu stanowią niekiedy jedyny dowód przebytego lub czynnego zakażenia [16,31]. Nieobecność krążącego antygeny HBc we krwi powoduje, że przeciwciała anty-HBc są wykrywane nawet wtedy, gdy ich stężenie jest niewielkie (wczesna faza zakażenia, czy też po wielu latach od inokulacji) [31,101].

Białko HBeAg zwane antygenem „e” jest produktem trawienia proteolitycznego białka preC. Wykrycie we krwi chorego białka e świadczy o intensywnej replikacji wirusa, o dużym stężeniu w surowicy HBV-DNA. Białko HBeAg nie ma bezpośredniego wpływu na replikację materiału genetycznego ani dojrzewanie cząstek wirusa. Pełni ono natomiast funkcję markera aktywności replikacji



wirusa, a serokonwersja HBeAg→anty-HBe jest uważana za jeden ze wskaźników zahamowania replikacji i ustępowania zakażenia [31,45,101]. Ponadto HBeAg jest związane z aktywnością immunomodulacyjną – wygaszanie odpowiedzi immunologicznej na obecność białek wirusa HBV. Mechanizm ten nie jest do końca jeszcze poznany, ale wydaje się istotnym zahamowanie przekazania sygnału od komórek prezentujących antygen (antigen-presenting cell – APC) do limfocytów T. W biopsjach wątroby u pacjentów zakażonych wariantami „e minus” obserwuje się bardziej nasilony proces zapalny oraz szybszą progresję do marskości wątroby, niż u zakażonych wariantem „e dodatnim” [31,45,101].

Produktem ekspresji ORF X jest białko X, które pełni funkcję transaktywatora i może regulować zarówno ekspresję genów wirusowych, jak i genów gospodarza. Białko X nie wiąże się bezpośrednio z DNA, mimo to regulując aktywność i swoistość wielu czynników transkrypcyjnych, wpływa na transkrypcję genów komórkowych i wirusowych. Odbyna się to poprzez tworzenie kompleksów bądź za pośrednictwem różnych białek uczestniczących w przekazywaniu sygnałów w komórce [57,73,101]. Ponadto HBxAg może kontrolować procesy wzrostu, proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek gospodarza. Antygen HBx stymuluje również ekspresję receptora odpowiedzialnego za utrzymanie zmienionego fenotypu komórek w przypadku HCC [14,24].

#### 1d. Cykl życiowy wirusa HBV

Podstawowym celem infekcji HBV jest hepatocyt, jednakże obecność wirusa wykrywana była także w innych komórkach, m.in. w komórkach groniastych śledziony, szpiku kostnego, nabłonkowych przewodów żółciowego, mononuklearach krwi obwodowej, śledziony i nerek [106]. Replikacja HBV wykrywana była przede wszystkim w komórkach wątroby i jak dotąd nie ma jednoznacznych, bezpośrednich dowodów na zdolność wirusa HBV do trwałej replikacji w komórkach innych niż hepatocyty [9,18,91]. W badaniach eksperymentalnych wykazywano czynną replikację hepadnawirusów w komórkach m.in. tkanki limfatycznej (węzły chłonne, jednojądrzaste komórki krwi obwodowej), jednak była to replikacja bez cech procesu przewlekłego i ulegała samoograniczeniu. Pozawątrobową replikacja wirusa HBV może być najważniejszą przyczyną, ale nie jedyną, przetrwania infekcji nawet po usunięciu wątroby w trakcie zabiegu jej przeszczepienia.

Podstawowym materiałem genetycznym wirusa HBV (obecny w zdolnych do infekcji wirionach) jest DNA, jednak matrycą do rozpoczęcia procesu namnażania genomu jest RNA. Warunkiem koniecznym do zakażenia komórki wątrobowej przez HBV jest związanie się cząstki wirusowej i wnikięcie do komórki wątrobowej. W tym celu wirus wykorzystuje swoiste receptory powierzchniowe umiejscowione w błonie komórkowej hepatocyta. Za to zjawisko odpowiedzialne jest białko kodowane przez rejon *pre-S1*, będące składnikiem białka powierzchniowego L oraz swoisty receptor hepatocytowy, HBV-BP [9,27,32]. Wiązanie się cząstek wirusowych do komórek wątrobowych może się odbywać również na drodze zależnej od albuminy i fibronektyny, a także za pośrednictwem białka powierzchniowego M [18,49,112].

Wewnątrz komórki wątrobowej dochodzi do proteolitycznego usunięcia białek otoczki wirionu i uwolnienia nukleokapsydu. Rozpoczyna się pierwszy etap replikacji materiału genetycznego. Transportowany w rozluźnionej postaci dwułańcuchowego DNA (relaxed dsDNA) genom wirusa ulega przekształceniu w kolistą cząsteczkę cccDNA (covalently closed circular DNA – cccDNA). Proces ten przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie za pomocą wirusowej polimerazy DNA uzupełniona zostaje niekompletna dodatnia nici S(+) na matrycy nici o ujemnej polarności. Dzięki temu możliwa jest zmiana rozluźnionego DNA w kowalentnie zamknięty kolisty DNA. W takiej postaci HBV-DNA jest magazynowany w jądrze. W drugim etapie ujemny łańcuch cccDNA ulega transkrypcji do mRNA za pomocą pochodzącej z komórki wątrobowej polimerazy RNA II i tworzy się matrycowy RNA dla odwrotnej transkryptazy. W wyniku transkrypcji, oprócz pgRNA, powstają także cztery molekuly mRNA, które transportowane są ponownie do cytoplazmy. Tu stanowią one matrycę do powstania siedmiu białek wirusowych: polimerazy, białka X, białek otoczki (S,M,L), HBcAg oraz polipeptydu przedrdzeniowego preC. Po translacji białko polipeptydu przedrdzeniowego preC ulega modyfikacji wewnątrz siateczki śródplazmatycznej, a następnie jako HBeAg wydzielane jest do krwi osób zakażonych [91,92].

Za pośrednictwem struktury epsilon („sygnał enkapsydacji”) pregenomowy RNA tworzy kompleks z polimerazą i cząsteczkami białka rdzeniowego (HBcAg) [8,42,58]. Wewnątrz powstałych nukleokapsydów zachodzi ostatni etap replikacji materiału genetycznego wirusa. Pregenomowy RNA ulega odwrotnej transkrypcji do kompletnego ujemnego łańcucha L(-) cDNA [80,91]. Jednocześnie z wydłużaniem końca 3' nici DNA, pregenomowy RNA jest stopniowo hydrolizowany dzięki aktywności RNA-zy H. Pregenomowy mRNA ulega całkowitej degradacji z wyjątkiem niewielkiego fragmentu, który jest wykorzystywany do zapoczątkowania syntezy nici DNA o dodatniej polarności. Starterem w tej syntezie jest krótki oligorybonukleotyd pochodzący z końca 5' pregenomowego RNA. Po wydłużeniu nici (+) następuje przekształcenie liniowych DNA w rozluźnione, kolisty struktury genomowego DNA (rcDNA) [80].

Ostatnim etapem cyklu życiowego wirusa jest składanie wirionów HBV. Część powstałego w poprzednim etapie dwuniciowego HBV-DNA migruje do siateczki śródplazmatycznej (ER), gdzie po połączeniu z pakietami białka c tworzy nukleokapsyd, a następnie po opłaszczeniu przez białka powierzchniowe formuje kompletne uwalniane do krwi wiriony [4,16].

Część cząstek nukleokapsydu jest również transportowana z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie powstaje cccDNA. W ten sposób zwiększa się pula cccDNA w jądrze komórkowym. Szacuje się, że w każdym zakażonym hepatocycie zmagazynowanych jest 10–50 kopii cccDNA [62].

## 2. ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA WIRUSA HBV

Cechą swoistą wirusa HBV jest bardzo duża zmienność genetyczna. Powstaje ona na skutek błędów polimerazy wirusowej [120]. Dzieje się tak, ponieważ mimo iż jest to wirus DNA, jego replikacja opiera się na procesie odwrotnej

transkrypcji. Wewnątrz zakażonych hepatocytów znajduje się wiele nici L(-). Nie wszystkie są związane z niemi R(+). Postaci asymetryczne to produkty pośrednie procesu replikacji, które umiejscowione są w wirusowych nukleokapsydach w cytoplazmie. Z wirusowym DNA integralnie połączona jest polimeraza DNA o cechach odwrotnej transkryptazy i dzięki temu odgrywa zasadniczą rolę w replikacji wirusa. Podobnie jak RNA-zależne polimerazy reowirusów, odwrotna transkryptaza HBV nie ma aktywności korekcyjnej błędów replikacyjnych (proof reading unit). Z tego względu frekwencja mutacji w genomie HBV jest o wiele większa niż w innych wirusów DNA. Szacuje się, że wynosi ona  $1,4-3,2 \times 10^{-5}$  substytucji na 1 zasadę na rok zakażenia, co oznacza powstawanie dziennie  $10^{10}$  mutacji [19,120]. Niezwykle duża dynamika zmienności genetycznej HBV jest ściśle związana z potencjałem replikacyjnym wirusa. Liczba krążących w jednym mililitrze surowicy cząsteczek wirusa wynosi  $10^8-10^{10}$ . Czas półtrwania krążących wirionów jest krótki i wynosi 1-2 dni. Dane literaturowe wskazują, że hepatocyty osób zakażonych uwalniają do krwi w ciągu jednego dnia ok.  $10^{11}$  potomnych wirionów dziennie [5].

Ze względu na dużą zmienność genetyczną wirusa podczas jego replikacji dochodzi do licznych mutacji, które skutkują występowaniem w surowicy osób zakażonych kilku wariantów wirusa, tzw. „quasi-species” HBV [84]. Powstałe warianty wirusa różnią się między sobą cechami fenotypowymi oraz ekspansywnością. W trakcie rozwoju infekcji, w krótkim czasie od zakażenia, heterogenna populacja wirusa zostaje zdominowana przez mutantą o największym potencjale replikacyjnym [119]. Natomiast ekspansja poszczególnych wariantów wirusa HBV zależy od ich zdolności do przetrwania w określonych, zmiennych w trakcie trwania zakażenia warunkach oraz od dostępnej przestrzeni replikacyjnej [101]. Zatem działanie presji selekcyjnej ze strony układu immunologicznego człowieka oraz innych czynników niezależnych od gospodarza (np. stosowane leki przeciwwirusowe) powoduje zmiany w proporcjach między różnymi mutantami HBV występującymi w populacji wirusa jednego chorego [70,101,120].

## 2a. Polimorfizm wirusa HBV – genotypy

Pojawiające się zmiany w sekwencji genomu HBV spowodowały jego różnicowanie genetyczne w warianty (genotypy). Obecnie znanych jest osiem ludzkich genotypów HBV oznaczonych literami A-H [72]. Na podstawie budowy HBsAg wyodrębniono również odmienne genetycznie subgenotypy (A1-A3, B1-B4, C1-C4, D1-D4, F1-F2) [46].

Nowy genotyp wyróżniano, gdy sekwencja nukleotydowa genomu HBV różniła się >8% lub >4% w sekwencji genu kodującego HBsAg [22].

Występowanie poszczególnych genotypów i podtypów HBV uzależnione jest od położenia geograficznego. I tak powszechnie występujący w środkowej Afryce genotyp A jest dominującym genotypem w Europie [29,72]. W Azji występują głównie genotypy B i C. Genotyp D wykrywany jest na całym świecie, najczęściej w krajach Basenu Morza Śródziemnego. Genotyp E występuje głównie w Afryce, genotypy F i H izolowano przede wszystkim w obu Amerykach, ale także w Europie i Japonii [10].

Genotyp G odnotowuje się natomiast wśród mieszkańców Francji i USA [72].

Polska jest krajem, w którym dominuje zakażenie genotypem A i D [11,117]. Spośród 58 pacjentów badanych przez Bielawskiego i wsp. [11] u 74,1% pacjentów wykryto genotyp A, natomiast genotyp D u 20,7% osób. Znaczną przewagę zakażeń wywołanych genotypem A potwierdziły wyniki Zalewskiej i wsp. [117] (78,8% A i 13,6% D). Badania przeprowadzone przez Ślusarczyka i wsp. wykazały występowanie genotypu A u 86,1% i D u 9,2% chorych. U 4,6% badanych stwierdzono jednocześnie występowanie genotypów A i D [94]. Na podstawie badań przeprowadzonych przez nasz zespół stwierdzono, że w Polsce występuje również genotyp H [10,11].

Ponadto występowanie określonego typu genetycznego wirusa HBV może decydować o przebiegu zakażenia [72]. Rodzaj genotypu HBV dostarcza również informacji o potencjalnej aktywności choroby, tempie progresji zapalenia wątroby w kierunku marskości i pierwotnego raka wątroby, występowaniu powikłań oraz przewidywanej skuteczności leczenia [21,34,40].

Dane literaturowe wskazują, że istnieje zależność między odpowiedzią na leczenie interferonem alfa (IFN- $\alpha$ ) a genotypem HBV [83,105]. Skuteczność leczenia interferonem oceniana jest poprzez pomiar ilościowy HBV-DNA w surowicy, serokonwersję HBeAg do anti-HBe oraz HBsAg do anti-HBs oraz normalizację biochemiczną procesu zapalnego [83].

Na podstawie ostatnich badań prowadzonych w grupie pacjentów leczonych pegylovanym IFN- $\alpha$ -2b stwierdzono, iż zależność pomiędzy występowaniem określonego genotypu wirusa a utratą HBeAg i pojawieniem się przeciwciał anti-HBe jest statystycznie znamienne. W przypadku pacjentów HBeAg dodatnich serokonwersja HBeAg do anti-HBe była istotnie większa u chorych z genotypem A i B (47 i 44%), niż C i D (28 i 25%) [86,105]. Dalsze badania prowadzone w tej samej populacji wykazały, że serokonwersja HBsAg do anti-HBs była również związana z genotypem HBV i wynosiła odpowiednio: 14% (genotyp A), 9% (genotyp B), 3% (genotyp C) i 2% (genotyp D) [86].

W roku 2009 opublikowano wyniki oceniające zastosowanie pegylowanego IFN- $\alpha$  w leczeniu chorych HBeAg ujemnych. Odpowiedź wirusologiczna, mierzona obniżeniem replikacji wirusa, była znacznie wyższa w przypadku wariantu A (20%), niż wariantów: B(6%), C (9%) i D (6%). Wyniki tych badań sugerują konieczność rozważenia oznaczania genotypu wirusa przy kwalifikacji do leczenia, ocenie optymalnej terapii, długości jej trwania [64].

## 3. MUTACJE O ZNACZENIU KLINICZNYM

Występowanie określonych zmian w sekwencji genomu wirusa HBV ma istotny wpływ na przebieg zakażenia, tempo progresji choroby w kierunku marskości wątroby oraz HCC, a także skuteczność stosowanej terapii przeciwwirusowej. Z punktu widzenia badań diagnostycznych zakażeń HBV niezwykle istotne są zmiany prowadzące do powstania wariantów odpowiedzialnych za infekcję przebiegającą z ujemnym antygenem HBe oraz HBs [2,47,101].



Te pierwsze charakteryzują obecność mutacji w regionie poprzedzającym (precore) i/lub w podstawowym promotorze genu kodującego białko rdzeniowe (basal core promotor – BCP). Przyczyną wystąpienia wariantu HBe minus jest mutacja w regionie precore genomu HBV, która prowadzi do zaburzenia transkrypcji lub translacji, a co za tym idzie brakiem syntezy białek HBeAg [4,38]. Obecność niektórych mutacji genu *env* może być przyczyną nieskuteczności stosowanej profilaktyki czynnej i biernej, a także utrudniać proces diagnostyczny (wiele programów skriningowych infekcji HBV jest celowane na wykrycie białka HBeAg). Z punktu widzenia skuteczności terapii przeciw-wirusowej krytyczne są mutacje w obrębie genu *pol* HBV, które prowadzą do powstania szczepów o obniżonej wrażliwości na leki nukleotydowe/nukleozydowe [109]. Z kolei zmiany w obrębie regionu kodującego białko X wirusa wydają się mieć istotny związek z transformacją nowotworową hepatocytów [1].

### 3a. Mutacje w rejonie preC/C genomu HBV

Pierwsze opisane zmiany w genomie HBV dotyczą regionu preC/C. Szczepy mające te mutacje nie są zdolne do syntezy HBeAg (HBeAg (-); „e minus”) [13]. Zakażenia takie charakteryzują się brakiem antygeny HBe z jednoczesną obecnością wysokiej wirēmii HBV oraz podwyższoną aktywnością aminotransferaz. U zakażonych wariantami „e minus” HBV dochodzi do nasilenia procesu zapalnego w wątrobie, bardziej agresywnego przebiegu zakażenia i szybszego rozwoju marskości wątroby oraz HCC [38].

W regionie preC występują pojedyncze lub podwójne mutacje punktowe, które prowadzą do przesunięcia otwartej ramki odczytu i powstania kodonu stop. Do najważniejszych zaliczamy: zamianę guanozyny (G) na adenozynę (A) w nukleotydzie 1896 (G1896A), której konsekwencją jest powstanie w kodonie 28 preC sygnału „stop”, co powoduje zahamowanie syntezy HBeAg [45,98,101].

Zaobserwowano wyraźną zależność między występowaniem szczepów HBV zawierających tego typu mutacje, a położeniem geograficznym oraz genotypem wirusa [60]. Mutacja G1896A jest ściśle zależna od występowania w DNA wirusa tymidyny (T) w pozycji 1858. Częstość jej występowania jest duża w rejonie śródziemnomorskim i w Azji, gdzie przeważają genotypy mające w pozycji 1858 genu wirusa tyminę (genotypy D i B). W Europie i Ameryce Północnej, gdzie przeważa genotyp A, częstość występowania mutacji G1896A jest niewielka [60].

Mutacjom preC towarzyszą często mutacje w rejonie C genomu HBV. Istotne są zwłaszcza delekcje aminokwasów (Y38-R39-E40 i L-42), które przyczyniają się do zwiększenia wirulencji wirusa. Z kolei mutacje o charakterze insercji prowadzą do wystąpienia dodatkowych aminokwasów w białku rdzeniowym (EFGA poniżej A11 i LDTASALYR poniżej R39). Takie białka nie są rozpoznawane przez cytotoksyczne limfocyty T oraz przeciwciała anti-HBc [50,101].

### 3b. Mutacje w preS/S genomu HBV

Ważne znaczenie w czynnej i biernej profilaktyce zakażenia oraz w badaniach diagnostycznych prawdopodobnie mają zmiany w obrębie HBV-DNA, które prowadzą

do powstania szczepów wirusa o odmiennej budowie antygeny HBs. Mutacje w rejonie preS/S HBV-DNA skutkują ponadto znacznym zredukowaniem bądź całkowitym zablokowaniem ekspresji HBeAg [47].

Zaburzenie syntezy HBsAg jest wynikiem różnej długości delekcji zarówno w rejonie S, jak i preS1 ORFpreS/S1, które prowadzą do przesunięcia otwartej ramki odczytu i powstania kodonu stop [97]. W wyniku tego procesu powstaje białko zbudowane zaledwie z kilkunastu lub kilkadziesiątu aminokwasów białko S, które jest pozbowione rozpoznawanych przez przeciwciała anti-HBs epitopów [108]. Z kolei warianty, które w ogóle nie wytwarzają białka HBs, a co za tym idzie nie indukują powstawania przeciwciał anti-HBs, mają delekcje w rejonie preS1. Obejmują one sekwencję promotora S2P, w obrębie którego rozpoczyna się transkrypcja HBsAg [69].

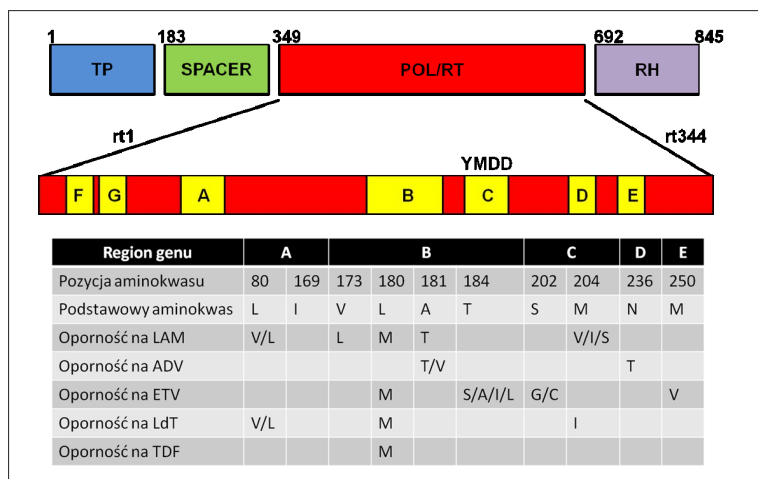
Brak HBsAg w surowicy chorych zakażonych HBV wiąże się również z występowaniem mutacji, które blokują sekrecję HBsAg. Mają one charakter mutacji punktowych i polegają na zamianie następujących aminokwasów S: izoleucyny (I) w pozycji 110 na metioninę (M) (I110M), glicyny (G) w pozycji 119 na kwas glutaminowy (E) (G119E) oraz argininy (R) w pozycji 169 na prolinę (P) (R169P) [47].

Mutacje w rejonie S powodują „pozorny” brak antygenemii HBs i są częściowo odpowiedzialne za istnienie tzw. utajonej infekcji HBV. W tym przypadku antygen jest obecny w surowicy, jednak jego struktura jest na tyle zmieniona, że wykrycie go rutynowo stosowanymi testami immunologicznymi jest niemożliwe [97].

Mutacje odpowiedzialne za zmiany struktury HBsAg dotyczą najczęściej głównej determinanty antygenowej „a” (124aa-147aa) tego białka. Do najważniejszych mutacji należą: I/T126S/N [41], Q129D/R [51,67], P142A [89], G145R [97] D144E i G145A [41,51].

Mutacje prowadzące do powstania HBsAg o częściowo tylko zmienionych epitopach antygenowych, zlokalizowane są poza determinantą a HBsAg. Mutacje te mają charakter insercji (8 aa pomiędzy T123 a C124; 2 aa pomiędzy C121 a L122, argininy pomiędzy P120 a C121), jak i mutacji punktowych (N166T, V118A, P120S, C121F, A159V, F183 C, V184A). Do tej grupy mutacji zalicza się też mutacje (W196S, I195M, M198I i E164D), które wykrywa się u chorych przewlekle zakażonych HBV i leczonych lamiwudyną (sprzężenie z mutacjami motywu YMDD polimerazy HBV) [102].

Ze względu na brak podstawowego wskaźnika zakażenia infekcje szczepami wirusa zawierającymi zmiany sekwencji aminokwasowej w białku S, będące skutkiem mutacji w obrębie genu *env*, stanowią poważny problem epidemiologiczny. Takie warianty HBV mogą powodować infekcję u osób szczepionych przeciwko HBV z zastosowaniem HBsAg typu „dzikiego”. Ponadto opisanym już zmianom w sekwencji aminokwasowej HBsAg towarzyszą dodatkowe mutacje w rejonie preS/S HBV-DNA, które nie są istotne z punktu widzenia badań diagnostycznych. Mają one natomiast wpływ na przebieg zakażenia, a zatem mają istotne znaczenie kliniczne. Do tych mutacji zaliczamy mutacje w rejonach HBV-DNA, które kodują epitopy HBsAg



Ryc. 3. Lokalizacja głównych mutacji związanych z opornością HBV na leczenie analogami nukleozydów/nukleotydydów (wg [56])

rozpoznawane przez cytotoksyczne limfocyty T w pozycjach aminokwasowych 40–49, 198–208. Z kolei mutacje punktowe oraz delecje powodujące zmianę sekwencji aminokwasów w silnie immunogennych rejonach preS2 i preS1 białek M i L są przyczyną wolniejszej eliminacji wirusa oraz możliwością przetrwania infekcji [6,49,52,99].

### 3c. Mutacje w rejonie *Pol* genu HBV

Jak wspomniano wcześniej cechą swoistą wirusa HBV jest bardzo duża zmienność genetyczna, będąca skutkiem błędów polimerazy wirusowej [120]. Mutacje w genie polimerazy wirusa HBV (ryc. 3.) są niezwykle istotne z punktu widzenia skuteczności stosowanej terapii przeciwwirusowej, gdyż powodują obniżenie wrażliwości szczepów HBV na stosowane leki [109,121].

Zahamowanie aktywności polimerazy wirusa HBV lekami z grupy analogów nukleozydowych/nukleotydydowych umożliwi kontrolę jego replikacji. W następstwie zahamowania replikacji wirusa HBV zmniejsza się liczba krążących wirionów, co prowadzi do zmniejszenia zakażenia nowych hepatocytów. Usuwanie zakażonych komórek wątroby przez cytotoksyczne limfocyty może doprowadzić do całkowitej lub częściowej eliminacji wirusa z organizmu, a także do regresji zmian zapalnych w wątrobie. Jednak długotrwałe stosowanie leków przeciwwirusowych, takich jak lamiwudyna (LVD), adefowir (ADV), entekawir (ETV), telbivudyna (LdT), może prowadzić do wyselekcjonowania lekoopornych szczepów wirusa mających zmienione białko polimerazy, o obniżonej wrażliwości na stosowane leki [54,82].

Analogiem nukleozydowym najdłużej stosowanym w leczeniu przewlekłego zakażenia HBV jest lamiwudyna – LAM, LVD, 3TC (Zeffix 100 mg). Jest to lek umiarkowanie skuteczny, dobrze tolerowany, który umożliwia obniżenie stężenia HBV-DNA o 3–4 log<sub>10</sub> w pierwszych miesiącach stosowania [30,36,76]. Niestety w miarę stosowania leku selekcjonują się warianty wirusa HBV odporne na lamiwudynę. Im dłużej trwa kuracja, tym większy jest odsetek tych wariantów [55]. W ciągu pierwszego roku terapii lamiwudyną oporność na lek pojawia się u 20–25% chorych, po trzyletniej terapii liczba pacjentów lekoopornych wzrasta do 70% [54]. Z punktu widzenia skuteczności terapii

przeciwwirusowej krytyczne wydają się mutacje zlokalizowane w motywie YMDD (Y – tyrozyna, M – metionina, D – kwas asparaginowy) polimerazy wirusa [33,36,65]. Mutacje umiejscowione w tym rejonie polimerazy dotyczą dwóch pozycji genu odwrotnej transkryptazy (reverse transcriptase rt). Mutacje w pozycji 204 (YMDD, rtM204) polegają na podstawieniu metioniny (M) przez: walinę (V) (YVDD, rtM204V), izoleucynę (I) (YIDD, rtM204I) lub serynę (S) (YSDD, rtM204S) [15]. W motywie YMDD polimerazy wirusa występują również mutacje polegające na wymianie metioniny (M) w pozycji 204 na leucynę (L) (YLDD, rtM204L) oraz kwasu asparaginowego (D) w pozycji 205 na kwas glutaminowy (E) (YMED, rtD205E). Spośród substytucji w motywie YMDD tylko jedna mutacja YIDD może występować jako pojedyncza mutacja punktuwa. Pozostałym dwóm mutacjom: YVDD i YSDD, towarzyszą mutacje umiejscowione w silnie konserwowanych rejonach A i B domeny *pol/rt* polimerazy HBV, polegające na: wymianie waliny (V) na izoleucynę (L) w pozycji 173 (rtV173L) oraz leucyny (L) na metioninę (M) w pozycji 180 (rtL180M) [5,15,28,33,74,75]. Opisano również lamiwudynooporne mutanty YIDD, które zawierają w polimerazie dodatkowe mutacje: rtL80I, rtL180C oraz rtL180M [74,77].

Badania *in vitro* wykazały, że lamiwudynooporne szczepy HBV charakteryzują się małą dynamiką replikacji w porównaniu do typu „dzikiego” i początkowo stanowią niewielki procent całej populacji wirusa [5,75]. Mimo to po kilku miesiącach leczenia mutanty takie stają się szczepami dominującymi [112]. Prawdopodobnie ma to związek z występowaniem mutacji towarzyszących w rejonie YMDD, tzw. „kompensatorowych”, które częściowo lub całkowicie przywracają aktywność replikacyjną lekoopornego wariantu [5,28,75].

U większości chorych pojawienie się szczepów lamiwudynoopornych prowadzi do znacznego wzrostu poziomu wirerii, co wywołuje zaostrzenie przebiegu choroby [5,56]. Ponadto mutanty odporne na lamiwudynę wykazują krzyżową oporność na leczenie innymi pirymidynowymi analogami nukleozydów, m.in. emtrycytabiną – FTC (Emtriva 200 mg) i telbivudyną – LdT (Sebivo, Tyzeka 600 mg) [112]. Entekawir – ETV (Baraclude 0,5 i 1 mg) jest lekiem z grupy analogów pirymidynowych, który wykazuje



działanie przeciwwirusowe w stosunku do lamiwudynopornych szczepów HBV [59]. Pojawienie się oporności na entekawir jest skutkiem dołączenia się do mutacji typowych dla lamiwudyny (M204I/V±L180M) jednej z następujących mutacji: rtM202I, rtI169T, rtS184G i rtM250V [120]. Pojawienie się tych zmian uwarunkowane jest ściśle z uprzednim występowaniem lekooporności na lamiwudynę [100]. Obiecujące wyniki leczenia chorych, u których wykrywa się mutanty HBV odporne na lamiwudynę, dają purynowe inhibitory polimerazy wirusowej: adefowir – ADV (Hepsera 10 mg) i tenofovir – TDF (Viread 300 mg) [53,65]. Skuteczność adefowiru, w porównaniu z lamiwudyną jest zbliżona, a długotrwałe leczenie również prowadzi do selekcji szczepów opornych. Jak dotąd opisano trzy rodzaje mutacji, które polegają na wymianie: asparaginy (N) w pozycji 236 na treoninę (T) (rtN236T) [3], adeniny (A) w pozycji 181 na walinę (V) lub treoninę (T) (rtA181V, rtA181T) oraz izoleucyny (I) w pozycji 233 na walinę (V) (rtI233V) [87,113]. Wydaje się jednak, że selekcja mutantów HBV opornych na ADV następuje znacznie wolniej niż w przypadku lamiwudyny – 0% po pierwszym roku, 1,3% po 2 i 29% po pięciu latach kuracji [37,113].

Kolejnym lekiem jest tenofovir, który charakteryzuje się dużą skutecznością działania w przypadku pacjentów zakażonych zarówno HIV jak i HBV. Jest bardzo efektywny u zakażonych wariantami dzikimi HBV, jak i mutantami opornymi na lamiwudynę i adefowir [36]. Swoistą dla tenofoviru mutację rtA294T opisano jedynie u pacjentów HBV/HIV (+) leczonych tym lekiem. Spośród mutacji obniżających wrażliwość wirusa na adefowir jedynie rt A181T/V i rt N236T obniżają skuteczność tego leku (oporność częściowa) [79].

### 3d. Mutacje w genie X genomu HBV

Białko X pełni funkcję transaktywatora i może regulować ekspresję genów wirusowych, jak i genów gospodarza [57,73,101]. Ponadto w rejonie X HBV-DNA znajdują się elementy regulatorowe transkrypcji i replikacji materiału genetycznego wirusa [52]. Z tych właśnie powodów mutacje w rejonie X genomu HBV zasługują na szczególną uwagę.

Z klinicznego punktu widzenia najistotniejszymi mutacjami zlokalizowanymi w rejonie X są mutacje, które występują w obrębie regionu CP/Enh2 (1586–1849 pz). Mutacje o charakterze delecji występują najczęściej w rejonie między 1748. a 1777. nukleotydem. Ich obecność skutkuje utratą zdolności wirusa do syntezy HBeAg (niekiedy również HBsAg) bez zahamowania zdolności wirusa do replikacji. Mutanty HBV mające insercję 11 nukleotydów w rejonie CP DNA wirusowego charakteryzuje zdolność do bardzo szybkiego namnażania się w zakażonych hepatocytach [81]. Mutacje punktowe występują najczęściej w rejonie podstawowego promotora rdzeniowego (BCP), który obejmuje nukleotydy 1742–1849 [52]. Zmiany te odpowiedzialne są za infekcje HBV, które przebiegają z brakiem antygeny HBe i często wzmoczoną aktywnością replikacyjną wirusa [78,98,101].

Większość mutacji dotyczących rejonów regulatorowych transkrypcji wywołuje zmiany w budowie białka HBx, a co za tym idzie wpływa na jego aktywność. Ponadto powstałe w wyniku delecji nukleotydów w rejonie BCP skrócone o kilkadziesiąt aminokwasów białko X jest często wykrywane u chorych z HCC. Skrócone HBxAg nie ma właściwości antyproliferacyjnych i proapoptotycznych oraz wykazuje wzmoczoną transaktywację w stosunku do onkogenów *ras* i *myc* [43].

Najistotniejszymi mutacjami występującymi w rejonie X HBV-DNA są: C1653T, T1753V, T1766/A1768, A1762T/G1764A. Zwiększają one ryzyko rozwoju HCC u osób zakażonych HBV [7,23,35,39,44,48,96,111,114,115]. Z kolei mutacje G1896A oraz C1858T nie są związane z rozwojem HCC bez względu na status HBeAg oraz rodzaj genotypu HBV [61].

Podwójna mutacja A1762 T + G1764A w BCP stanowi cenny marker do identyfikacji pacjentów HBsAg (+) ze zwiększonym prawdopodobieństwem rozwoju HCC. Natomiast mutacje w obrębie nukleotydów kodujących lizynę (K) w pozycji 130 białka HBx mogą wpływać na proces nowotworzenia i powstawania przerzutów [35,48].

## 4. PODSUMOWANIE

Dotąd zidentyfikowano 8 genotypów wirusa HBV (A–H), a ich występowanie uzależnione jest od położenia geograficznego. Zgodnie z wynikami ostatnich badań wykrycie określonego typu genetycznego wirusa dostarcza informacji o drodze zakażenia, a jego rodzaj wpływa na przebieg infekcji. Oznaczenie wariantu HBV dostarcza ponadto informacji prognostycznych dotyczących aktywności choroby, tempa progresji w kierunku marskości i pierwotnego raka wątroby. Zależność między genotypem a przebiegiem klinicznym zakażenia HBV jest obecnie nadal przedmiotem intensywnych badań.

Informacji na temat związku genotypu HBV z odpowiedzią na leczenie przeciwwirusowe dostarcza retrospektywna analiza wyników leczenia w odniesieniu do genotypów HBV. Jak dotąd wykazano szybsze pojawianie się oporności na lamiwudynę u pacjentów z genotypem A w porównaniu do pacjentów zakażonych wariantem D. Natomiast analiza wyników leczenia adefowirem nie wykazała związku między odpowiedzią na leczenie a genotypem wirusa.

Badania nad mutacjami HBV oraz wrażliwością na stosowane leki wirowstatyczne, ze szczególnym uwzględnieniem genotypu wirusa, przyczyniają się do poszerzania wiedzy dotyczącej epidemiologii molekularnej zakażeń HBV. Umiejętność wyodrębnienia pacjentów zakażonych wariantami HBV wrażliwymi na konkretne leki lub niosącymi większe ryzyko rozwoju HCC umożliwi skuteczną dobieranie preparatów i zminimalizowanie odsetka „nie-trafionych” terapii.

## PIŚMIENNICTWO

[1] Adamek A.: Rola zakażeń wirusami HBV i HCV w rozwoju pierwotnego raka wątroby. *Współcz. Onkol.*, 2000; 4: 61–64

[2] Ahn S.H., Kramvis A., Kawai S., Spangenberg H.C., Li J., Kimbi G., Kew M., Wands J., Tong S.: Sequence variation upstream of precore translation initiation codon reduces hepatitis B virus e antigen production. *Gastroenterology*, 2003; 125: 1370–1378



- [3] Angus P, Vaughan R., Xiong S., Yang H., Delaney W., Gibbs C., Brosgart C., Colledge D., Edwards R., Ayres A., Bartholomeusz A., Locarnini S.: Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology*, 2003; 125: 292–297
- [4] Asif-Ullah M., Choi K.J., Choi K.I., Jeong Y.J., Yu Y.G.: Identification of compounds that inhibit the interaction between core and surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Res.*, 2006; 70: 85–90
- [5] Awan Z., Idrees M., Amin I., Butt S., Afzal S., Akbar H., Rehman I.U., Younas S., Shahid M., Lal A., Saleem S., Rauff B.: Pattern and molecular epidemiology of Hepatitis B virus genotypes circulating in Pakistan. *Infect. Genet. Evol.*, 2010; 10: 1242–1246
- [6] Aziz A., Aziz S., Li D.S., Murphy L., Leone N., Kennedy M., Dhillon S., Van Thiel D.H.: Efficacy of repeated high-dose hepatitis B vaccine (80 microg) in patients with chronic liver disease. *J. Viral Hepat.*, 2006; 13: 217–221
- [7] Bahramali G., Sadeghizadeh M., Amini-Bavil-Olyaei S., Alavian S.M., Behzad-Behbahani A., Adeli A., Aghasadeghi M.R., Amini S., Mahboudi F.: Clinical, virologic and phylogenetic features of hepatitis B infection in Iranian patients. *World J. Gastroenterol.*, 2008; 14: 5448–5453
- [8] Barrasa M.I., Guo J.T., Saputelli J., Mason W.S., Seeger C.: Does a cdc2 kinase-like recognition motif on the core protein of hepadnaviruses regulate assembly and disintegration of capsids? *J. Virol.*, 2001; 75: 2024–2028
- [9] Barrera A., Guerra B., Notvall L., Lanford R.E.: Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J. Virol.*, 2005; 79: 9786–9798
- [10] Bielawski K.P., Charmuszko U., Dybikowska A., Stalke P., Podhajska A.J.: Genetic variability of hepatitis B virus isolates in Poland. *Virus Genes*, 2006; 33: 77–86
- [11] Bielawski K.P., Dybikowska A., Lisowska-Charmuszko U., Stalke P., Gregorowicz K., Trocha H., Podhajska A.: Distribution of HBV genotypes and mutants among hepatitis B infected patients from northern Poland. *Int. J. Mol. Med.*, 2004; 14: 301–304
- [12] Bielawski K.P., Stalke P.: Molecular epidemiology of chronic hepatitis B virus infection in northern Poland. *J. Clin. Virol.*, 2005; 34(Suppl.1): S63–S69
- [13] Bonino F., Brunetto M.R., Rizzetto M., Will H.: Hepatitis B virus unable to secrete e antigen. *Gastroenterology*, 1991; 100: 1138–1141
- [14] Bouchard M.J., Schneider R.J.: The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.*, 2004; 78: 12725–12734
- [15] Bozdayi A.M., Uzunalimoğlu O., Türkyilmaz A.R., Aslan N., Sezgin O., Sahin T., Bozdayi G., Cinar K., Pai S.B., Pai R., Bozkaya H., Karayalçin S., Yurdaydin C., Schinazi R.F.: YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J. Viral Hepat.*, 2003; 10: 256–265
- [16] Bruss V.: Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res.*, 2004; 106: 199–209
- [17] Bruss V.: Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 65–73
- [18] Budkowska A., Maillard P., Theret N., Groh F., Possehl C., Topilko A., Craic R.: Activation of the envelope proteins by a metalloproteinase enables attachment and entry of the hepatitis B virus into T-lymphocyte. *Virology*, 1997; 237: 10–22
- [19] Cao G.W.: Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J. Gastroenterol.*, 2009; 15: 5761–5769
- [20] Chan H.L., Sung J.J.: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin. Liver Dis.*, 2006; 26: 153–161
- [21] Chattopadhyay S., Das B.C., Hussain Z., Kar P.: Hepatitis B virus genotypes in acute and fulminant hepatitis patients from north India using two different molecular genotyping approaches. *Hepatol. Res.*, 2006; 35: 79–82
- [22] Chemin I., Zoulim F.: Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 2009; 286: 52–59
- [23] Chou Y.C., Yu M.W., Wu C.F., Yang S.Y., Lin C.L., Liu C.J., Shih W.L., Chen P.J., Liaw Y.F., Chen C.J.: Temporal relationship between hepatitis B virus enhancer II/basal core promoter sequence variation and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2008; 57: 91–97
- [24] Chung T.W., Lee Y.C., Kim C.H.: Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J.*, 2004; 18: 1123–1125
- [25] Clayton R.F., Owsianka A., Patel A.H.: Evidence for structural differences in the S domain of L in comparison with S protein of hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.*, 2001; 82: 1533–1541
- [26] Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M.: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1970; 1: 695–698
- [27] De Falco S., Ruvo M., Verdoliva A., Scarallo A., Raimondo D., Raucci A., Fassina G.: N-terminal myristylation of HBV preS1 domain enhances receptor recognition. *J. Pept. Res.*, 2001; 57: 390–400
- [28] Delaney W.E. IV, Yang H., Westland C.E., Das K., Arnold E., Gibbs C.S., Miller M.D., Xiong S.: The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication *in vitro*. *J. Virol.*, 2003; 77: 11833–11841
- [29] Deterding K., Manns M.P., Wedemeyer H.: Does the presence of adefovir-resistant variants lead to failure of tenofovir monotherapy? *J. Hepatol.*, 2008; 49: 862–863
- [30] Dienstag J.L., Cianciara J., Karayalçin S., Kowdley K.V., Willems B., Plisek S., Woessner M., Gardner S., Schiff E.: Durability of serologic response after lamivudine treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2003; 37: 748–755
- [31] El Khouri M., dos Santos V.A.: Hepatitis B: epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo*, 2004; 59: 216–224
- [32] Engelke M., Mills K., Seitz S., Simon P., Gripon P., Schnölzer M., Urban S.: Characterization of a hepatitis B and hepatitis  $\delta$  virus receptor binding site. *Hepatology*, 2006; 43: 750–760
- [33] Enomoto M., Tamori A., Kohmoto M.T., Morikawa H., Habu D., Sakaguchi H., Takeda T., Seki S., Kawada N., Shiomi S., Nishiguchi S.: Mutational patterns of hepatitis B virus genome and clinical outcomes after emergence of drug-resistant variants during lamivudine therapy: analyses of the polymerase gene and full-length sequences. *J. Med. Virol.*, 2007; 79: 1664–1670
- [34] Enomoto M., Tamori A., Nishiguchi S.: Hepatitis B virus genotypes and response to antiviral therapy. *Clin. Lab.*, 2006; 52: 43–47
- [35] Fang Z.L., Sabin C.A., Dong B.Q., Ge L.Y., Wei S.C., Chen Q.Y., Fang K.X., Yang J.Y., Wang X.Y., Harrison T.J.: HBV A1762T, G1764A mutations are a valuable biomarker for identifying a subset of male HBsAg carriers at extremely high risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Am. J. Gastroenterol.*, 2008; 103: 2254–2262
- [36] Férier G., Kaptein S., Neyts J., De Clercq E.: Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infections: the past, the present and the future. *Rev. Med. Virol.*, 2008; 18: 19–34
- [37] Fung S.K., Chae H.B., Fontana R.J., Conjeevaram H., Marrero J., Oberhelman K., Hussain M., Lok A.S.: Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*, 2006; 44: 283–290
- [38] Funk M.L., Rosenberg D.M., Lok A.S.: World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J. Viral Hepat.*, 2002; 9: 52–61
- [39] Guo X., Jin Y., Qian G., Tu H.: Sequential accumulation of the mutations in core promoter of hepatitis B virus is associated with the development of hepatocellular carcinoma in Qidong, China. *J. Hepatol.*, 2008; 49: 718–725
- [40] Halfon P., Bourliere M., Pol S., Benhamou Y., Ouzan D., Rotily M., Khiri H., Renou C., Pénaranda G., Saadoun D., Thibault V., Serpaggi J., Varastet M., Tainturier M.H., Poynard T., Cacoub P.: Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J. Viral Hepat.*, 2006; 13: 329–335
- [41] He C., Nomura F., Itoga S., Isobe K., Nakai T.: Prevalence of vaccine-induced escape mutants of hepatitis B virus in the adult population in China: a prospective study in 176 restaurant employees. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2001; 16: 1373–1377
- [42] Hu J., Toft D.O., Seeger C.: Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J.*, 1997; 16: 59–68
- [43] Iavarone M., Trabut J.B., Delpuech O., Carnot F., Colombo M., Kremsdorff D., Bréchet C., Thiers V.: Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumour liver cells using laser capture microdissection. *J. Hepatol.*, 2003; 39: 253–261
- [44] Ito K., Tanaka Y., Orito E., Sugiyama M., Fujiwara K., Sugauchi F., Kato T., Tokita H., Izumi N., Kato M., Yuen M.F., Lai C.L., Gish R.G., Ueda R., Mizokami M.: T1653 mutation in the box  $\alpha$  increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2006; 42: 1–7



- [45] Jardi R., Rodriguez F., Buti M., Costa X., Valdes A., Allende H., Schaper M., Galimany R., Esteban R., Guardia J.: Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *J. Hepatol.*, 2004; 40: 507–514
- [46] Kay A., Zoulim F.: Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.*, 2007; 127: 164–176
- [47] Khan N., Guarnieri M., Ahn S.H., Li J., Zhou Y., Bang G., Kim K.H., Wands J.R., Tong S.: Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. *J. Virol.*, 2004; 78: 3262–3270
- [48] Kim H.J., Park J.H., Jee Y., Lee S.A., Kim H., Song B.C., Yang S., Lee M., Yoon J.H., Kim Y.J., Lee H.S., Hwang E.S., Kook Y.H., Kim B.J.: Hepatitis B virus X mutations occurring naturally associated with clinical severity of liver disease among Korean patients with chronic genotype C infection. *J. Med. Virol.*, 2008; 80: 1337–1343
- [49] Kondo J., Shimomura H., Fujioka S., Iwasaki Y., Takagi S., Ohnishi Y., Tsuji H., Sakaguchi K., Yamamoto K., Tsuji T.: Mutations in the hepatitis B virus preS2 region and abrogated receptor activity for polymerized human albumin. *Acta Med. Okayama*, 2002; 56: 193–198
- [50] Koschel M., Oed D., Gerelsaikhan T., Thomssen R., Bruss V.: Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J. Virol.*, 2000; 74: 1–7
- [51] Koyanagi T., Nakamura M., Sakai H., Sugimoto R., Enjoi M., Koto K., Iwamoto H., Kumazawa T., Mukaide M., Nawata H.: Analysis of HBs antigen negative variant of hepatitis B virus: unique substitutions, Glu129 to Asp and Gly145 to Ala in the surface antigen gene. *Med. Sci. Monit.*, 2000; 6: 1165–1169
- [52] Kreutz C.: Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses. *J. Cell. Mol. Med.*, 2002; 6: 113–143
- [53] Lada O., Benhamou Y., Cahour A., Katlama C., Poyndard T., Thibault V.: *In vitro* susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to adefovir and tenofovir. *Antivir. Ther.*, 2004; 9: 353–363
- [54] Lai C.L., Dienstag J., Schiff E., Leung N.W., Atkins M., Hunt C., Brown N., Woessner M., Boehme R., Condreay L.: Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin. Infect. Dis.*, 2003; 36: 687–696
- [55] Lampertico P.: Entecavir versus lamivudine for HBeAg positive and negative chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*, 2006; 45: 457–460
- [56] Lee C.H., Kim S.O., Byun K.S., Moon M.S., Kim E.O., Yeon J.E., Yoo W., Hong S.P.: Predominance of hepatitis B virus YMDD mutants is prognostic of viral DNA breakthrough. *Gastroenterology*, 2006; 130: 1144–1152
- [57] Lee J.O., Kwun H.J., Jung J.K., Choi K.H., Min D.S., Jang K.L.: Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1. *Oncogene*, 2005; 24: 6617–6625
- [58] Lee J.Y., Locarnini S.: Hepatitis B virus: pathogenesis, viral intermediates, and viral replication. *Clin. Liver Dis.*, 2004; 8: 301–320
- [59] Levine S., Hernandez D., Yamanaka G., Zhang S., Rose R., Weinheimer S., Colonna R.J.: Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002; 46: 2525–2532
- [60] Lindh M., Horal P., Dhillon A.P., Furuta Y., Norrkans G.: Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology*, 1996; 24: 494–501
- [61] Liu S., Zhang H., Gu C., Yin J., He Y., Xie J., Cao G.: Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009; 101: 1066–1082
- [62] Locarnini S., Mason W.S.: Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *J. Hepatol.*, 2006; 44: 422–431
- [63] Lok A.S., Heathcote E.J., Hoofnagle J.H.: Management of hepatitis B: 2000 – summary of a workshop. *Gastroenterology*, 2001; 120: 1828–1853
- [64] Marcellin P., Bonino F., Lau G.K., Farci P., Yurdaydin C., Piratvisuth T., Jin R., Gurel S., Lu Z.M., Wu J., Popescu M., Hadziyannis S., Peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative Chronic Hepatitis B Study Group. Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alfa-2a. *Gastroenterology*, 2009; 136: 2169–2179
- [65] Marcellin P., Heathcote E.J., Buti M., Gane E., de Man R.A., Krastev Z., Germanidis G., Lee S.S., Flisiak R., Kaita K., Manns M., Kotzlev I., Tchernev K., Buggisch P., Weiler F., Kuras O.O., Shiffman M.L., Trinh H., Washington M.K., Sorbel J., Anderson J., Snow-Lampart A., Mondou E., Quinn J., Rousseau F.: Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359: 2442–2455
- [66] Marion P.L., Oshiro L.S., Regnery D.C., Scullard G.H., Robinson W.S.: A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980; 77: 2941–2945
- [67] Mathet V.L., Feld M., Espinola L., Sánchez D.O., Ruiz V., Mandó O., Carballal G., Quarleri J.F., D’Mello F., Howard C.R., Oubiña J.R.: Hepatitis B virus S gene mutants in a patient with chronic active hepatitis with circulating Anti-HBs antibodies. *J. Med. Virol.*, 2003; 69: 18–26
- [68] McGlynn K.A., Tsao L., Hsing A.W., Devesa S.S., Fraumeni J.F. Jr: International trends and patterns of primary liver cancer. *Int. J. Cancer*, 2001; 94: 290–296
- [69] Melegari M., Wolf S.K., Schneider R.J.: Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J. Virol.*, 2005; 79: 9810–9820
- [70] Michalak T.I., Mulrooney P.M., Coffin C.S.: Low doses of hepadnavirus induce infection of the lymphatic system that does not engage the liver. *J. Virol.*, 2004; 78: 1730–1738
- [71] Moolla N., Kew M., Arbuthnot P.: Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J. Viral Hepat.*, 2002; 9: 323–331
- [72] Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K., Robertson B.H., Locarnini S., Magnus L.O.: Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 2004; 47: 289–309
- [73] Norton P.A., Reis H.M., Prince S., Larkin J., Pan J., Liu J., Gong Q., Zhu M., Feitelson M.A.: Activation of fibronectin gene expression by hepatitis B virus X antigen. *J. Viral Hepat.*, 2004; 11: 332–341
- [74] Ogata N., Fujii K., Takigawa S., Nomoto M., Ichida T., Asakura H.: Novel patterns of amino acid mutations in the hepatitis B virus polymerase in association with resistance to lamivudine therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B. *J. Med. Virol.*, 1999; 59: 270–276
- [75] Ono S.K., Kato N., Shiratori Y., Kato J., Goto T., Schinazi R.F., Carrilho F.J., Omata M.: The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J. Clin. Invest.*, 2001; 107: 449–455
- [76] Pai S.B., Bozdayi A.M., Pai R.B., Beker T., Sarioglu M., Turkyilmaz A.R., Grier J., Yurdaydin C., Schinazi R.F.: Emergence of a novel mutation in the FLLA region of hepatitis B virus during lamivudine therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005; 49: 2618–2624
- [77] Pardo M., Bartolomé J., Carreno V.: Current therapy of chronic hepatitis B. *Arch. Med. Res.*, 2007; 38: 661–677
- [78] Parekh S., Zoulim F., Ahn S.H., Tsai A., Li J., Kawai S., Khan N., Trépo C., Wands J., Tong S.: Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J. Virol.*, 2003; 77: 6601–6612
- [79] Pastor R., Habersetzer F., Fafi-Kremer S., Doffoel M., Baumert T.F., Gut J.P., Stoll-Keller F., Schvoerer E.: Hepatitis B virus mutations potentially conferring adefovir/tenofovir resistance in treatment-naïve patients. *World J. Gastroenterol.*, 2009; 15: 753–755
- [80] Piekarowicz A.: Podstawy wirusologii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004
- [81] Pult I., Chouard T., Wieland S., Klemenz R., Yaniv M., Blum H.E.: A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology*, 1997; 25: 1507–1515
- [82] Qi X., Snow A., Thibault V.: Long-term incidence of adefovir dipivoxil resistance in chronic hepatitis B patients after 144 weeks of therapy (abstract). *J. Hepatol.*, 2004; 40: 20
- [83] Raimondi S., Maisonneuve P., Bruno S., Mondelli M.U.: Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype? *J. Hepatol.*, 2010; 52: 441–449
- [84] Revill P., Locarnini S.: HBV variants: clinical significance and public health implications. *Hep. B Annual*, 2005; 2: 74–92
- [85] Robinson W.S., Miller R.H., Marion P.L.: Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication. *Hepatology*, 1987; 7(Suppl.1): 64S–73S
- [86] Schaefer S.: Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 14–21
- [87] Schildgen O., Sirma H., Funk A., Olotu C., Wend U.C., Hartmann H., Helm M., Rockstroh J.K., Willems W.R., Will H., Gerlich W.H.: Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N. Engl. J. Med.*, 2006; 354: 1807–1812
- [88] Schlüter V., Rabe C., Meyer M., Koshy R., Caselmann W.H.: Intracellular accumulation of middle hepatitis B surface protein activates gene transcription. *Dig. Dis.*, 2001; 19: 352–363

- [89] Schories M., Peters T., Rasenack J.: Isolation, characterization and biological significance of hepatitis B virus mutants from serum of a patient with immunologically negative HBV infection. *J. Hepatol.*, 2000; 33: 799–811
- [90] Schultz U., Grgacic E., Nassal M.: Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection. *Adv. Virus Res.*, 2004; 63: 1–70
- [91] Seeger C., Mason W.S.: Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000; 64: 51–68
- [92] Sidorkiewicz M.: CCC DNA – intermediate replication form of HBV genome. *Postępy Biochem.*, 2001; 47: 2–9
- [93] Sidorkiewicz M., Płucienniczak A.: Białka powierzchniowe i rdzeniowe HBV i ich rola w rozwoju zapalenia wątroby typu B. *Postępy Biochem.*, 1994; 40: 143–149
- [94] Slusarczyk J., Białkowska J., Bucholc B., Wiatrzyk A., Górska P., Jabłkowski M.: HBV genotypes among patients with chronic hepatitis B in the area of central Poland. *Przegl. Epidemiol.*, 2006; 60: 555–561
- [95] Summers J., Smolec J.M., Snyder R.: A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 4533–4537
- [96] Sung J.J., Tsui S.K., Tse C.H., Ng E.Y., Leung K.S., Lee K.H., Mok T.S., Bartholomeusz A., Au T.C., Tsoi K.K., Locarnini S., Chan H.L.: Genotype-specific genomic markers associated with primary hepatomas, based on complete genomic sequencing of hepatitis B virus. *J. Virol.*, 2008; 82: 3604–3611
- [97] Tabor E.J.: Infections by hepatitis B surface antigen gene mutants in Europe and North America. *J. Med. Virol.*, 2006; 78(Suppl.1): S43–S47
- [98] Tacke F., Manns M.P., Trautwein C.: Influence of mutations in the hepatitis B virus genome on virus replication and drug resistance – implications for novel antiviral strategies. *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11: 2667–2677
- [99] Tai P.C., Suk F.M., Gerlich W.H., Neurath A.R., Shih C.: Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology*, 2002; 292: 44–58
- [100] Tenney D.J., Levine S.M., Rose R.E., Walsh A.W., Weinheimer S.P., Discotto L., Plym M., Pokornowski K., Yu C.F., Angus P., Ayres A., Bartholomeusz A., Sievert W., Thompson G., Warner N., Locarnini S., Colonna R.J.: Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 3498–3507
- [101] Tong S., Kim K.H., Chante C., Wands J., Li J.: Hepatitis B virus e antigen variants. *Int. J. Med. Sci.*, 2005; 2: 2–7
- [102] Torresi J., Earnest-Silveira L., Deliyannis G., Edgton K., Zhuang H., Locarnini S.A., Fyfe J., Sozzi T., Jackson D.C.: Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology*, 2002; 293: 305–313
- [103] van Regenmortel M.H., Mayo M.A., Fauquet C.M., Maniloff J.: Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch. Virol.*, 2000; 145: 2227–2232
- [104] Wagner M., Alt M., Hofschneider P.H., Renner M.: A novel negative cis-regulatory element on the hepatitis B virus S-(+)-strand. *J. Gen. Virol.*, 1999; 80: 2673–2683
- [105] Wai C.T., Chu C.J., Hussain M., Lok A.S.: HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology*, 2002; 36: 1425–1430
- [106] Wai C.T., Lok A.S.: Treatment of hepatitis B. *J. Gastroenterol.*, 2002; 37: 771–778
- [107] Wei Y., Tiollais P.: Molecular biology of hepatitis B virus. *Clin. Liver Dis.*, 1999; 3: 189–219
- [108] Weinberger K.M., Zoulek G., Bauer T., Böhm S., Jilg W.: A novel deletion mutant of hepatitis B virus surface antigen. *J. Med. Virol.*, 1999; 58: 105–110
- [109] Westland C.E., Yang H., Delaney W.E. IV, Wulfsohn M., Lama N., Gibbs C.S., Miller M.D., Fry J., Brosgart C.L., Schiff E.R., Xiong S.: Activity of adefovir dipivoxil against all patterns of lamivudine-resistant hepatitis B viruses in patients. *J. Viral Hepat.*, 2005; 12: 67–73
- [110] Xu Z., Bruss V., Yen T.S.: Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. *J. Virol.*, 1997; 71: 5487–5494
- [111] Yang H.I., Yeh S.H., Chen P.J., Iloeje U.H., Jen C.L., Su J., Wang L.Y., Lu S.N., You S.L., Chen D.S., Liaw Y.F., Chen C.J., REVEAL-HBV Study Group: Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2008; 100: 1134–1143
- [112] Yang J., Ding X., Zhang Y., Bo X., Zhang M., Wang S.: Fibronectin is essential for hepatitis B virus propagation *in vitro*: may be a potential cellular target? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 344: 757–764
- [113] Yeon J.E., Yoo W., Hong S.P., Chang Y.J., Yu S.K., Kim J.H., Seo Y.S., Chung H.J., Moon M.S., Kim S.O., Byun K.S., Lee C.H.: Resistance to adefovir dipivoxil in lamivudine resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil. *Gut*, 2006; 55: 1488–1495
- [114] Yuan J.M., Ambinder A., Fan Y., Gao Y.T., Yu M.C., Groopman J.D.: Prospective evaluation of hepatitis B 1762(T)/1764(A) mutations on hepatocellular carcinoma development in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009; 18: 590–594
- [115] Yuen M.F., Tanaka Y., Shinkai N., Poon R.T., But D.Y., Fong D.Y., Fung J., Wong D.K., Yuen J.C., Mizokami M., Lai C.L.: Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/C, specific mutations of enhancer II/core promoter/precore regions and HBV DNA levels. *Gut*, 2008; 57: 98–102
- [116] Zaborowski P., Cianciara J.: Wirusowe zapalenia wątroby: problemy postępowania. *Terapia*, 2000; 5: 4–10
- [117] Zalewska M., Domagała M., Simon K., Gładysz A.: Hepatitis B virus genotypes and the response to lamivudine therapy. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2005; 114: 1190–1199
- [118] Zeuzem S., de Man R.A., Honkoop P., Roth W.K., Schalm S.W., Schmidt J.M.: Dynamics of hepatitis B virus infection *in vivo*. *J. Hepatol.*, 1997; 27: 431–436
- [119] Zhang Y.Y., Summers J.: Enrichment of a precore-minus mutant of duck hepatitis B virus in experimental mixed infections. *J. Virol.*, 1999; 73: 3616–3622
- [120] Zoulim F.: Virology of Hepatitis B. Pattern and molecular epidemiology of hepatitis B virus genotypes circulating in Pakistan. Elsevier, Paris, 2004
- [121] Zoulim F., Trépo C.: Drug therapy for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and influence of hepatitis B virus polymerase mutations on the outcome of therapy. *J. Hepatol.*, 1998; 29: 151–168

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

