

# Ocena immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej u dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B leczonych interferonem alfa

## Immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha

IWONA MOZER-LISEWSKA <sup>1/</sup>, WOJCIECH SŁUŻEWSKI <sup>1/</sup>, MAGDALENA FILIPOWICZ <sup>1/</sup>,  
ARLETA KOWALA-PIASKOWSKA <sup>1/</sup>, MAGDALENA FIGLEROWICZ <sup>1/</sup>, MAGDALENA TRYBUS <sup>2/</sup>, JAN ŻEROMSKI <sup>2/</sup>

<sup>1/</sup>Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szpitalna 33/27, 60-572 Poznań

<sup>2/</sup>Katedra Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

Mechanizm działania interferonu- $\alpha$ , powszechnie stosowanego w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B (pzw-B) u dzieci, nie jest w pełni wyjaśniony, jednak uważa się, że jest to głównie efekt immunoregulacyjny. Celem badań było ilościowe określenie zmian w populacji limfocytów krwi obwodowej u dzieci z pzw-B leczonych IFN- $\alpha$ . Badaniem objęto 16 dzieci; IFN- $\alpha$  podawano w dawce 3 MU 3 razy w tygodniu, przez 20 tygodni. Subpopulacje limfocytów określano za pomocą cytofluorometrii przepływową.

Stwierdzono istotny wzrost ogólnej liczby limfocytów, limfocytów T (CD3+) i limfocytów B (CD19+) w trakcie i po zakończeniu leczenia, natomiast komórki NK w tym okresie wykazywały niewielki spadek, podobnie jak stosunek CD4/CD8. W ocenie komórek aktywowanych zauważono pewien wzrost ich wartości odsetkowych, zwłaszcza postaci wczesnych, ocenianych markerem CD69, ale bez cech znamienności. Dzieci o niskich wartościach aminotransferazy alaninowej (AlAT) miały z reguły większe, choć nieznamienne, ilości limfocytów i ich subpopulacji we krwi w porównaniu do dzieci z wysoką aktywnością tego enzymu.

Wyniki badań sugerują, że ocena immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej może być użyteczna w monitorowaniu skuteczności leczenia IFN- $\alpha$  u dzieci chorych na pzw-B.

*Alergia Astma Immunologia, 2002, 7(1), 44-48*

**Słowa kluczowe:** zakażenia HBV, dzieci, interferon- $\alpha$ , immunofenotyp, limfocyty

The mechanism of action of interferon alpha (IFN- $\alpha$ ), currently the most commonly used drug in the treatment of chronic HBV infection in children, is not fully elucidated, although it is believed that its effect is mainly immunoregulatory. The aim of this study was to determine in treated children the changes in total lymphocytes and their subpopulations. The study included 16 children; 3 MU of INF- $\alpha$  was administered 3 times a week, for 20 weeks. Lymphocyte subpopulations were assessed using flow cytometry.

The total number of lymphocytes, CD3+ T cells, and CD19+ B cells rose significantly during and at the end of IFN- $\alpha$  treatment compared to the values at the onset of therapy. CD4/CD8 cell ratio as well as NK cells have shown slight fall at the end of treatment, while activated cells (CD69+) rose modestly after termination of therapy. Children showing low values of AlAT activity had as a rule, higher counts of lymphocytes and their subsets than those with high values of the enzyme, albeit without significance.

The results of the study suggests that the evaluation of lymphocyte immunophenotype may be of value in monitoring IFN- $\alpha$  therapy of children with chronic hepatitis B.

*Alergia Astma Immunologia, 2002, 7(1), 44-48*

**Key words:** HBV infection, children, interferon alpha, immunophenotype, lymphocytes

Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B (pzw-B) u dzieci pozostaje wciąż trudnym problemem dla klinicysty, zarówno pod względem rokowania, jak i leczenia. Tłumaczy się to stale rosnącą liczbą dzieci wymagających hospitalizacji, bardzo kosztowną diagnostyką i dłu-

gotrwałą terapią, której skutki są często niezadowolające. Wynika to ze złożonej i nie do końca poznanej patogeny zakażenia HBV, a zwłaszcza z niejasnych interakcji pomiędzy antygenami wirusa i nie w pełni dojrzałym układem odpornościowym dziecka [1]. Ewolucja zakażenia

HBV w znacznym stopniu zależy od osobniczej reaktywności układu odpornościowego, która w najlepszym wypadku prowadzi do całkowitej eliminacji wirusa. Odpowiedź immunologiczna na liczne antygeny jest jednak różna i tylko u nielicznych chorych zakażenie kończy się samowyleczeniem [2]. Sytuacja jest jeszcze bardziej złożona w organizmie dziecka, gdyż poszczególne składowe odpowiedzi immunologicznej, pomimo ich obecności w ustroju, nie zawsze wykazują pełne współdziałanie czynnościowe [1]. Przyjętym obecnie postępowaniem w terapii zakażeń HBV u dzieci jest leczenie przy użyciu rekombinowanego preparatu interferonu alfa (IFN- $\alpha$ ). Mechanizm działania interferonów typu pierwszego polega na reaktywności, ale także immunomodulacyjnej w odniesieniu do komórek układu odpornościowego. Pomimo pojawienia się nowych leków przeciwwirusowych takich, jak analogi nukleozydowe, na przykład lamiwudyna, IFN- $\alpha$  pozostaje nadal lekiem z wyboru w terapii przewlekłych zapaleń wątroby typu B [3]. Zalety tego preparatu wynikają z jego fizjologicznego odpowiednika *in vivo*. Jak wiadomo, interferony hamują replikację wirusów, aktywują liczne geny, w tym geny warunkujące syntezę białek enzymatycznych o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym i immunomodulacyjnym [4]. Z drugiej strony, nieznane są przyczyny, dlaczego około 50% leczonych dzieci nie odpowiada na terapię ocenianą serokonwersją HBeAg do anti-HBe, czy też eliminacją HBV-DNA [5,6]. Można przypuszczać, że dodatni wynik działania leczniczego IFN- $\alpha$  jest wynikiem aktywacji układu limfocytów. Wiadomo na przykład, że u przewlekłych nosicieli wirusa, zakażonych okołoporodowo, limfocyty T CD 4 Th2 wykazują przewagę w stosunku do subpopulacji Th1, a komórki CD8+ znamionuje niska aktywność [7,8]. Zastosowanie cytometrii przepływowej pozwala na ilościowe określenie poszczególnych subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej i zapewnia porównywalność wyników [9]. Charakterystyka immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej jest jedną z możliwości oceny stanu odpornościowego ustroju w pzw-B [10].

Celem pracy była ocena immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej u dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B poddanych leczeniu preparatem rekombinowanego IFN- $\alpha$  w 3 przedziałach czasowych – przed, w czasie leczenia i po jego zakończeniu.

## PACJENCI I METODY

### Pacjenci

Analizie poddano 16 dzieci (3 dziewczynki i 13 chłopców) w wieku od 3 do 14 lat (średnia wieku 8,7 lat). U wszystkich badanych dzieci stwierdzono antygenem HBs i HBe trwającą dłużej niż 4 lata. W badaniu patomorfologicznym bioptatu wątroby stwierdzono przewlekłe ak-

tywne zapalenie wątroby (*hepatitis chronica activa* – HCA) u 10 dzieci, a przewlekłe przetrwałe zapalenie wątroby (*hepatitis chronica persistens* – HCP) u 6 dzieci.

### Metody

Wszystkim dzieciom podawano IFN- $\alpha$  podskórnie lub domięśniowo w dawce 3 MU 3 razy w tygodniu przez 20 tygodni, według przyjętego w Polsce schematu leczenia [6], po uzyskaniu zgody przez Komisję Etyczną przy Akademii Medycznej w Poznaniu. Badania wykonano przed włączeniem leczenia, po 10 tygodniach leczenia i po 20 tygodniach, czyli po zakończeniu kuracji IFN- $\alpha$ . U wszystkich dzieci profil serologiczny (HBsAg, HBeAg, HBeAb, HBsAb) oceniany był sekwencyjnie – badania wykonano metodą ELISA przy użyciu zestawów Organon – Teknika.

W trakcie leczenia oceniano aktywność aminotransferazy alaninowej (AlAT), wykorzystując optymalizowaną metodą kinetyczną (U/l) i przyjmując jako normę wartość 40 U/l.

### Ocena immunofenotypu limfocytów

Krew żylną (1-2 ml) pobierano strzykawką zawierającą EDTA. Limfocyty krwi obwodowej i ich subpopulacje w badanej grupie dzieci oznaczano metodą cytometrii przepływowej przy użyciu przyrządu FACScan firmy Becton Dickinson (BD). Do 100  $\mu$ l krwi pełnej dodawano 5  $\mu$ l znakowanych przeciwciał, inkubowano 15 minut w ciemni, płukano buforowaną solą fizjologiczną pH 7,6 (PBS), a następnie poddawano lizie krwinki czerwone płynem lizującym (BD). Po kolejnym płukaniu wykonywano akwizycję komórek w cytometrze przepływowym, zbierając 5000 komórek z danej próbki. Stosowano przeciwciała monoklonalne przeciwko antygenom różnicowania limfocytów wchodzące w skład zestawu IMK-plus (BD), znakowane fluoresceiną (FITC) i fikoerytryną (PE). Oceniano limfocyty T: CD3+, CD4+, CD8+, limfocyty B: CD19+, komórki NK: CD56+, CD16+, a także u części chorych komórki aktywowane (CD25+ i CD69+). Zestawy użytych znakowanych przeciwciał oraz ich źródło podano w tabeli I. Określano początkowo wartości odsetkowe poszczególnych subpopulacji, a następnie, znając liczbę leukocytów w  $\text{mm}^3$ , obliczano liczbowe wartości bezwzględne tych komórek.

Bezwzględna ilość limfocytów w subpopulacji obliczano z całkowitej liczby limfocytów (WBC) oraz z wartości odsetkowych, ocenianych za pomocą cytometrii przepływowej, po wybramkowaniu głównych subpopulacji leukocytów (rozproszenie boczne – *side scatter* i przednie – *forward scatter* oraz komórki CD45+ vs. CD14+: Leukogate).

Stosowano program Cellquest do analizy subpopulacji komórek. Do obliczeń statystycznych wykorzystano test t-Studenta.

Tabela I. Zastosowane przeciwciała monoklonalne

Swoistość	Źródło
IgG1 FITC/IgG2a PE (kontrola)	Becton Dickinson (BD)
Anty CD45 FITC/CD14 PE (Leukogate)	BD
Anty CD3 FITC/CD19 PE	BD
Anty CD4 FITC/CD8 PE	BD
Anty CD3 FITC/HLA-DR PE	BD
Anty CD3 FITC/CD16/CD56 PE	BD
Anty CD25 FITC	DAKO
Anty CD69 FITC	DAKO

## WYNIKI

Z 16 chorych dzieci leczonych IFN- $\alpha$  pięcioro wyeliminowało antygen HBe z wytworzeniem swoistych przeciwciał bezpośrednio po zakończeniu 20 tygodniowej terapii, natomiast utraty antygeny HBs nie stwierdzono u żadnego dziecka w ciągu całego okresu obserwacji. W kolejnych badaniach kontrolnych przeprowadzonych w okresie 2 lat od zakończonego leczenia wykazano eliminację antygeny HBe u sześciorga dzieci z wytworzeniem przeciwciał anty-HBe. Zestawienie wyników badań serologicznych ilustruje tabela II. Z ogólnej liczby 11 dzieci, które wyeliminowały antygen Hbe, u 10 z nich w badaniu morfologicznym biopłatów wątroby stwierdzono zapalenie aktywne wątroby, a u jednego dziecka przelekłe przetrwałe zapalenie wątroby (HCP).

W badanej grupie stwierdzono istotne różnice w bezwzględnej liczbie limfocytów we krwi obwodowej w okresie prowadzonego leczenia IFN- $\alpha$ . Wartości średnie całkowitej liczby limfocytów krwi obwodowej były istotnie wyższe po zakończeniu leczenia w stosunku do wartości wyjściowych ( $p < 0,05$ ). Stwierdzono także znamienne różnice między liczbą limfocytów oznaczoną w trakcie leczenia po 10 tygodniach w porównaniu z wartościami po 20 tygodniach leczenia ( $p < 0,01$ ) na korzyść tych ostatnich.

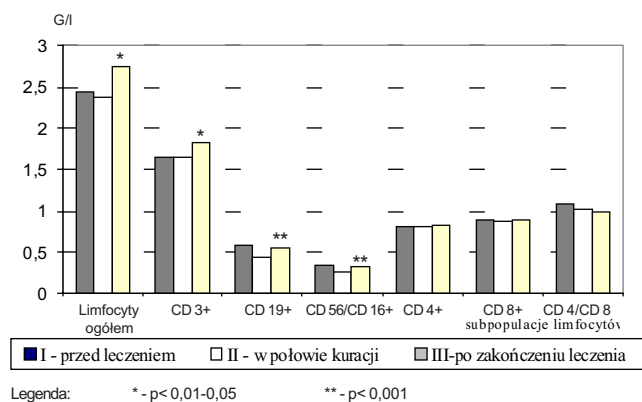
Tabela II. Podział dzieci z uwzględnieniem sekwencyjnej oceny profilu serologicznego oraz wyniku badania patomorfologicznego biopłatu wątroby (n=16)

Histologia	Profil serolog.	Przed leczeniem	Po 10 tyg.	Po 20 tyg.	Po 2 latach
		(liczba dzieci)			
HCA (n=10)	HBs Ag+	10	10	10	10
	HBeAg+	10	6	6	0
	HBeAb+	0	0	4	10
HCP (n=6)	HBsAg+	6	6	6	6
	HBeAg+	6	5	5	5
	HBeAb+	0	0	1	1

W ocenie subpopulacji limfocytów T CD3+ stwierdzono także istotny wzrost wartości bezwzględnych tych komórek w trakcie leczenia ( $p < 0,05$ ) i po jego zakończeniu ( $p < 0,05$ ).

W obrębie limfocytów B (CD19+) stwierdzono także istotny wzrost ich wartości bezwzględnych po zakończeniu leczenia ( $p < 0,05$ ). Jednakże zauważono, że w trakcie leczenia, po 10 tygodniach terapii IFN- $\alpha$ , nastąpił spadek liczby tych komórek w stosunku do wartości po zakończeniu leczenia ( $p < 0,001$ ).

W analizie komórek NK (naturalni zabójcy) (CD16+, CD56+) zauważono spadek liczby komórek w połowie kuracji ( $p < 0,001$ ). W końcu leczenia liczba komórek NK wzrosła, ale nie uzyskała wartości wyjściowych. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic wartości bezwzględnych subpopulacji limfocytów T CD4+ i CD8+. Zauważono jedynie pewien spadek stosunku komórek CD4/CD8, ale bez znamienności statystycznej. Wyniki przedstawiono w formie wykresu (ryc. 1).



Ryc. 1. Średnie wartości bezwzględne limfocytów i ich subpopulacji we krwi obwodowej u dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B (pzw-B) przed leczeniem, w połowie kuracji i po zakończeniu leczenia rekombinowanym preparatem interferonu alfa (IFN- $\alpha$ )

W analizie komórek aktywowanych, ze względu na brak norm i niepełne dane, oceniano jedynie wartości odsetkowe komórek i obliczano średnie arytmetyczne. Istnieją co prawda dane dotyczące składu odsetkowego subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u dzieci w populacji polskiej, ale nie obejmują one komórek aktywowanych [11]. W prowadzonych badaniach stwierdzono wzrost odsetka komórek o cechach głównie wczesnej aktywacji, wykrywanych przeciwciałem anty CD69 (tab. III).

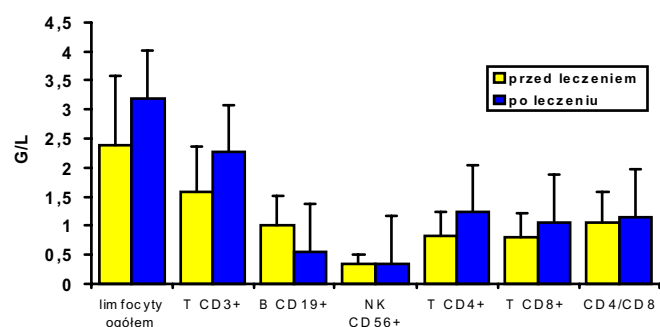
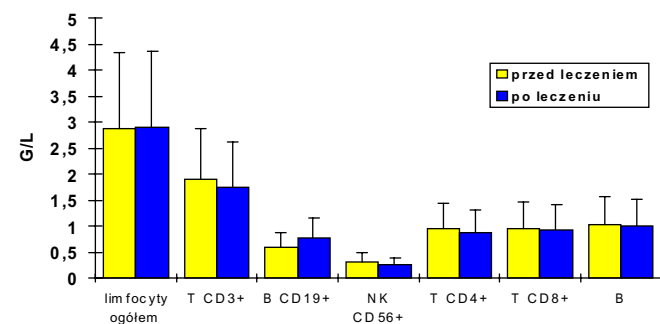
Porównano także wartości bezwzględne limfocytów i ich subpopulacji u dzieci z niskimi wartościami aktywności aminotransferazy alaninowej (AlAT) tzn. 40 -100 U/l z grupą dzieci, u których stwierdzono wysokie wartości tego enzymu ( $> 100$  U/l) (rys. 2 i 3).

W grupie dzieci z niskimi wartościami AlAT ogólna liczba limfocytów, limfocyty T CD3+, a także subpopulacja



Tabela III. Wartości średnie komórek aktywowanych we krwi dzieci leczonych IFN- $\alpha$ 

Czas badania	Liczba badanych	Średnia dla anty CD25	Średnia dla anty CD69
Przed leczeniem	N=16	X=9,56	X=4,5
Po 10 tyg. leczenia	N=14	X=10,0	X=8,57
Po 20 tyg. leczenia	N=7	nb	X=8,43

Ryc. 2. Średnie wartości bezwzględne i odchylenia standardowe limfocytów krwi obwodowej i ich subpopulacji u dzieci z pzw-B wykazujących niską (40-100 U/l) aktywność aminotransferazy alaninowej (ALAT) przed i po leczeniu IFN- $\alpha$ .Ryc. 3. Średnie wartości bezwzględne i odchylenia standardowe limfocytów krwi obwodowej i ich subpopulacji u dzieci z pzw-B wykazujących wysoką (>100 U/l) aktywność ALAT przed i po leczeniu IFN- $\alpha$ .

komórek CD4+ były wyższe po zakończeniu leczenia IFN- $\alpha$ , ale zjawisko to nie miało cech znamienności statystycznej (ryc. 2).

## DYSKUSJA

Wyniki tej pracy sugerują, że terapia IFN- $\alpha$  stosowana powszechnie u dzieci chorych na przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B, powoduje istotne zmiany w obrębie limfocytów i ich subpopulacji we krwi obwodowej.

Dotyczy to wszystkich głównych subpopulacji, jak limfocyty T, limfocyty B, a także komórki NK. Pomimo stosunkowo niewielkiej liczby leczonych dzieci istotnym w przeprowadzonych badaniach było obliczenie wartości bezwzględnych ocenianych komórek, co znacznie podniosło wiarygodność uzyskanych danych. Wydaje się, że

leczenie IFN- $\alpha$  nie tylko znamienne podnosi liczbę limfocytów w ustroju dziecka zakażonym wirusem HBV, ale także powoduje aktywację tych komórek, co niewątpliwie ma swoje znaczenie w poprawie stanu klinicznego i wyników badań serologicznych. Warto zwrócić uwagę, że w wyniku terapii IFN- $\alpha$  łącznie 11/16 leczonych dzieci wyeliminowało antygen HBe, co stanowi blisko 69% badanych. Co więcej, u większości chorych wykazano eliminację tego antygenu dopiero po 2 latach od zakończenia leczenia. Może to świadczyć o długotrwałym wpływie terapii IFN- $\alpha$  na zdolność układu odpornościowego do reakcji na zakażenie wirusowe. Nie można jednak wykluczyć przypadków spontanicznej serokonwersji, niezależnej od zastosowanego leczenia. Według danych z piśmiennictwa krajowego częstość spontanicznej serokonwersji HBe do anty-HBe u dzieci waha się od 14-21% [12]. Jeszcze rzadziej stwierdza się eliminację antygenu HBs z powstawaniem przeciwciał anti-HBs, którą, podobnie jak u dorosłych, wynosi od 0,25 do 2% [1,13]. W naszym materiale u żadnego dziecka nie stwierdziliśmy utraty antygenu HBs, nawet po 2-letniej obserwacji.

Działanie interferonów typu I ( $\alpha$  i  $\beta$ ) w procesie zapalnym jest złożone. Z jednej strony hamują one proliferację komórek, ale jednocześnie mają działanie zapobiegające śmierci komórek na drodze apoptozy [14]. Może to tłumaczyć ograniczoną skuteczność tego modulatora immunologicznego w omawianej chorobie [15].

Istotnym badaniem przed podjęciem leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu B IFN- $\alpha$  jest ocena patomorfologiczna biopsji wątroby [16]. W badaniach własnych u 10 dzieci rozpoznano przewlekłe aktywne zapalenie wątroby (HCA), podczas, gdy przewlekłe przetrwałe zapalenie wątroby (HCP) stwierdzono u 6 dzieci. W grupie dzieci z rozpoznaniem HCA wszystkie dzieci wyeliminowały antygen HBe z wytworzeniem przeciwciał anti-HBe, natomiast z grupy chorych z HCP tylko jedno dziecko okazało się HBe ujemne po 2 latach obserwacji. Podobne obserwacje, dotyczące wyższego odsetka serokonwersji w układzie HBe/anty-HBe po terapii IFN- $\alpha$ , poczynili Bortolotti i Thomas [3,17]. Inni autorzy natomiast nie uzyskali takich zależności [18,19].

Powszechnie uważa się, że wyjściowa wysoka aktywność ALAT jest czynnikiem rokowniczo korzystnym w leczeniu zakażeń HBV interferonem- $\alpha$  [20,21]. Z tego względu podzielono badaną grupę dzieci na te, u których stwierdzono niską oraz wysoką aktywność tego enzymu w surowicy. Przyjętym kryterium były przedziały aktywności od 40 do 100 U/l – uznane jako niskie i powyżej 100 U/l – traktowane jako wysokie. Prześledzono wartości bezwzględne limfocytów i ich subpopulacji w obu powyższych podgrupach dzieci. Wbrew oczekiwaniom zauważono niewielki, statystycznie nieznamienny wzrost ogólnej liczby limfocytów, a także komórek CD3+ i CD4+ u dzieci z niską aktywnością ALAT. Być może, aktywność tego enzymu nie ma większego wpływu na immuno-

fenotyp limfocytów we krwi w przebiegu terapii IFN- $\alpha$ . Zagadnienie to wymaga badań na większej grupie chorych z okresem obserwacji.

Z punktu widzenia patogenetycznego, należy uznać terapię IFN- $\alpha$  u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B jako interwencję o charakterze immunore-

gulacyjnym [22,23]. Jak wynika z wyżej podanych rozważań, wpływ immunoregulacyjny IFN- $\alpha$  dotyczy w pierwszym rzędzie układu limfocytów. Stąd wydaje się, że monitorowanie wartości bezwzględnych limfocytów i ich subpopulacji w trakcie leczenia IFN- $\alpha$  jest nie tylko wskazane, ale chyba konieczne.

### Piśmiennictwo

1. Bortolotti F. Chronic viral hepatitis in childhood. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 1996; 10: 185-206.
2. Juszczyk J. Wirusowe zapalenia wątroby. PZWL, Warszawa 1999; 141-149.
3. Bortolotti F, Jara P, Barbera C, Gregorio GV i wsp. Long term effect of alpha interferon in children with chronic hepatitis B. *Gut* 2000; 46: 715-118.
4. Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferon (IFN-alpha/beta) in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol* 1998; 10: 383-390.
5. Sokal EM, Conjeevaram HS, Roberts EA i wsp. Interferon alpha therapy for chronic hepatitis in children: a multinational randomized trial. *Gastroenterol* 1998; 114: 988-995.
6. Woynarowski M, Socha J. Wyniki leczenia interferonem alfa dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B. Doświadczenia ośrodków polskich z lat 1990-1997. *Ped Pol* 1998; 73, 10: 1031-1041.
7. Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 157-169.
8. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-1745.
9. Żeromski J, Dworacki G. Ocena immunofenotypu komórek limfoidalnych przy pomocy cytometrii przepływowej – uwagi praktyczne i zastosowania kliniczne. *Centr-Europ J Immunol* 1996; 21 (Suppl 2), S99-S106.
10. Sing G, Butterworth L, Chen X, Bryant A, Cooksley G. Composition of peripheral blood lymphocyte populations during different stages of chronic infection with hepatitis B virus. *J Viral Hepatit* 1998; 5: 83-93.
11. Zeman K, Fornalczyk-Wachowska E, Pokoca L i wsp. Skład odsetkowy podstawowych subpopulacji limfocytów oraz komórek NK we krwi obwodowej populacji polskiej. *Centr-Eur J Immunol* 1996; 21 (Suppl 2), S107- S113.
12. Nałęcz A, Woynarowski M, Pawłowska J i wsp. Historia naturalna przewlekłego zapalenia wątroby typu B. *Ped Pol* 1992; 67 (Supl) 55-61.
13. Vetencourt R, Vetencourt M, De Armas J. Longitudinal follow-up study of 64 children chronically infected with hepatitis B virus. *Gen* 1995; 49: 227-232.
14. Akbar AN, Lord JM, Salmon M. IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ : a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunol Today* 2000; 21: 337-342.
15. Maini MK, Bertolotti A. How can the cellular immune response control hepatitis B virus replication? *J Viral Res* 2000; 7: 321-326.
16. Woźniewicz B. Patomorfologia zapalenia wątroby typu HBV. *Ped Pol* 1992; 67 (Supl 1-2), 19-24.
17. Thomas HC, Karayiannis P, Brook G. Treatment of hepatitis B virus infection with interferon. *J Hepatol* 1991 13 (Suppl) S4-S7.
18. Perillo RP. The management of chronic hepatitis B. *Am J Med* 1994; 22: 34-39.
19. Vajro P, Migliaro F, Fotanella A i wsp. Interferon: a meta – analysis of published studies in pediatric chronic hepatitis B. *Acta Gastro-Enterolog Belg* 1998; 61: 219-223.
20. Zaborowski P. Interferon alfa w zapaleniach wątroby. w: Cytokiny. Zastosowanie kliniczne, wyd. W Jędrzejczak i M Podolak –Dawidziak, Volumed, Wrocław 1997; 127-154.
21. Burczyńska B, Madaliński K, Pawłowska I i wsp. The value of quantitative measurement of HBeAg before interferon – alpha treatment of chronic hepatitis B in children. *J Hepatol* 1994; 21, 1097-1102.
22. Wysocki J, Służewski W, Kowala-Piaskowska A. Interferon alfa (IFN-alfa) w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu B u dzieci. *Ped Pol* 1995; 70: 407-411.
23. Juszczyk J. Przewlekłe wirusowe zapalenia wątroby: terapia na przełomie wieków. *Pol Arch Med Wewn* 2001; 105: 415-417.