

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Jordović Jelena

UTICAJ STABILNOG VIRUSOLOŠKOG  
ODGOVORA NA TOK I ISHOD BOLESTI KOD  
PACIJENATA SA TEŠKOM FIBROZOM ILI  
CIROZOM JETRE UZROKOVANOM  
HRONIČNOM HEPATITIS C VIRUSNOM  
INFEKCIJOM

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Jordović Jelena

IMPACT OF SUSTAINED VIROLOGICAL  
RESPONSE ON THE OUTCOME AND  
PROGNOSIS IN PATIENTS WITH SEVERE  
FIBROSIS AND CIRRHOSIS CAUSED BY  
CHRONIC HEPATITIS C INFECTION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Podaci o mentoru i članovima komisije:

**MENTOR:**

**Prof. dr Dragan Delić**, specijalista infektologije, subspecijalista gastroenterohepatologije, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**1. Prof. dr Jasmina Simonović Babić**, specijalista infektologije i interne medicine, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**2. Doc. dr Ksenija Bojović**, specijalista infektologije, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**3. Prof. dr Nataša Katanić**, specijalista infektologije, profesor Medicinskog fakulteta u Prištini, sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici

Datum odbrane:

## ZAHVALNICA

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, doajenu srpske hepatologije, profesoru dr Draganu Deliću, bez čije ideje, pomoći i podrške, ova disertacija ne bi nastala. Takođe sam veoma zahvalna docentkinji dr Kseniji Bojović i profesorki Jasmini Simonović-Babić, koje su mi nesebično pomogle u realizaciji teze.

Veliku pomoć u izradi ove teze, ali i značajan doprinos našim kliničkim saznanjima, dali su saradnici sa Instituta za molekularnu genetiku, na čelu sa uvaženom profesorkom Sonjom Pavlović, na čemu sam im neizmerno zahvalna.

Zahvaljujem se prijateljima na razumevanju i pomoći.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici.

UTICAJ STABILNOG VIRUSOLOŠKOG ODGOVORA NA TOK I ISHOD BOLESTI KOD  
PACIJENATA SA TEŠKOM FIBROZOM ILI CIROZOM JETRE UZROKOVANOM  
HRONIČNOM HEPATITIS C VIRUSNOM INFEKCIJOM

**SAŽETAK**

**UVOD:** Hepatitis C virus (HCV) je, globalno posmatrano, najčešći uzročnik hroničnog virusnog hepatitisa sa dugogodišnjim progresivnim tokom, varijabilnom kliničkom slikom i često nepredvidivim ishodom. Naša država spada u grupu zemalja sa intermedijernom zastupljenošću HCV infekcije, tj. prevalencijom od 0,19% među dobrovoljnim davaocima krvi i procenjenom prevalencijom od 1,13% na nivou Srbije. U našoj zemlji postoji višedecenijsko iskustvo u dijagnostici i lečenju pacijenata sa HCV infekcijom, ali osim kliničkih opservacija, nema objavljenih podataka o dugoročnom ishodu kod ovih pacijenata. U terapijskom i prognostičkom smislu najzahtevniju grupu predstavljaju pacijenti kod kojih se HCV infekcija otkrije u fazi uznapređovalog oštećenja jetre (fibroze ili ciroze), najčešće zbog višedecenijskog asimptomatskog toka bolesti, ali i zbog neadekvatnih mera skrininga, posebno u populacijama pod povećanim rizikom. U ovoj grupi pacijenata, čak i nakon terapijskog uspeha i postizanja nedetektibilne viremije (bez obzira na vrstu korišćenog terapijskog protokola), postoji rizik od nastanka nepovoljnih ishoda-uključujući virusološki i biohemijski relaps, dekompenzaciju jetre i pojave hepatocelularnog karcinoma (HCC). Višedecenijsko iskustvo u primeni kombinovane antivirusne terapije pegilovanim interferonom (PEG-IFN) i ribavirinom je pokazalo da postizanje stabilnog virusološkog odgovora (SVR) značajno redukuje morbiditet i mortalitet u grupi pacijenata sa teškim preterapijskim oštećenjem jetre. Pored toga, kliničke opservacije i literaturni podaci stranih autora govore u prilog potrebi za nastavkom praćenja ove grupe pacijenata i redovnim skriningom na HCC, čak i u slučaju održavanja nedetektibilne viremije i/ili regresije fibroze. Multikauzalna priroda, individualan tok bolesti i često nepredvidiv dugoročni ishod u ovoj grupi pacijenata, čak i nakon trajne supresije viremije, a u odsustvu preporuka o dužini praćenja i bilo kakvih publikovanih podataka u našoj zemlji, predmet su posebnog interesovanja autora i ove studije.

**CILJ:** Glavni cilj ovog istraživanja je bio da se ispita pouzdanost SVR, kao prediktora uspešnosti terapije i njegovog uticaja na tok i ishod hronične hepatitis C virusne infekcije, kod pacijenata sa preterapijskim teškim oštećenjem jetre. Posebno su analizirani prediktori efikasnosti kombinovane antivirusne terapije, kao i različitih dugoročnih ishoda-uključujući pojavu kasnog virusološkog i biohemijskog relapsa, progresije fibroze, nepovoljnih kliničkih ishoda i smrtnog ishoda.

**BOLESNICI I METODE:** Istraživanje je sprovedeno u formi prospektivne opservacione kohortne studije 325 pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom i preterapijskom teškom fibrozom ili cirozom jetre, koji su lečeni standardizovanim protokolom PEG-IFN i ribavirinom u periodu od 1. januara 2003. do 1. novembra 2011. godine. na odeljenju hepatologije II Klinike za infektivne i tropske bolesti u Beogradu, Kliničkog Centra Srbije. Nakon završetka terapije, pacijenti su praćeni ambulantno u ovoj ustanovi, a kraj perioda praćenja je bio decembar 2015.godine, smrtni ishod ili datum poslednjeg kontrolnog pregleda na koji se pacijent odazvao. Kriterijumi za uključivanje pacijenata u ovu studiju su bili: potvrđena hronična hepatitis C virusna infekcija uz povišene vrednosti enzima jetre, starost od 18 do 65 godina, preterapijski nalaz teške fibroze i ciroze (METAVIR>F2), kompletno sprovođenje protokola kombinovane antivirusne terapije PEG-IFN i ribavirinom uz saglasnost o učešću u ovoj studiji.

**REZULTATI:** U ispitivanoj grupi pacijenata sa preterapijskom teškom fibrozom i cirozom, ukupna stopa SVR je bila izuzetno visoka, i iznosila je 64,3% (nezavisno od genotipa). SVR je postignut kod 54,5% pacijenata sa genotip 1 (G1) HCV infekcijom i 80% sa non-G1 HCV infekcijom ( $p<0,001$ ), kao i kod 53,6% pacijenata sa preterapijskom cirozom. Prediktori postizanja SVR su bili; nedetektibilna viremija na kraju terapije-end treatment response-ETR (OR=7,235; 95%CI=3,480-15,042;  $p<0,001$ ), mlađa dob tj. starost<40 godina (OR=3,357; 95%CI=1,536-7,334;  $p=0,002$ ), infekcija non-G1 HCV (OR=3,005; 95%CI=1,601-5,640;  $p=0,001$ ) i odsustvo ciroze tj. niži METAVIR skor F2-F3 (OR=1,795; 95%CI=1,010-3,191;  $p=0,046$ ). Tokom perioda praćenja u grupi pacijenata sa postignutim SVR, zabeležena je detektibilna viremija kod 14 pacijenata (6,7%), koji su smatrani kasnim relapserima. Među kasnim relapserima najzastupljeniji su bili pacijenti sa preterapijskom cirozom, visokom bazalnom viremijom >800 000 IU/ml i nepovoljnim genotipom IL28B TTrs12979860. Jedini preterapijski faktor, koji je na nivou statističke značajnosti, imao negativnu korelaciju sa rizikom

od pojave kasnog virusološkog relapsa, je bio genotip CCrs12979860 (prisutan kod 82,1% kasnih relapsa sa  $\beta=-1.814$ , HR=0,520; 95%CI=0,278-0,979; p=0,013). Pacijenti sa kasnim virusološkim relapsom su češće imali i biohemijski relaps (57,1% vs.13,8% pacijenata sa stabilnim SVR, p<0,0001), ali bez statistički značajne korelacije (OR=1,389 za 95%CI=0,367-5,261; p=0,629). Procenjena progresija fibroze je dovedena u vezu sa prisustvom preterapijske ciroze ( $\beta=0,826$ , HR 2,285 za 95%CI=1,323-3,947; p=0,003) i G1 HCV infekcijom ( $\beta=0,435$ , HR=2,145; 95%CI=1,961-2,486; p=0,048). Nije pokazano da pojava kasnog virusološkog ili biohemijskog relapsa ima prediktorni značaj, kada je reč o progresiji fibroze (p>0,05). Tokom perioda praćenja, kod pacijenata koji su postigli SVR zabeležen je ukupno 21 neželjeni klinički ishod, i to kod 13 pacijenata (6,2%), dok kod 196 pacijenata (93,8%) nije bilo neželjenih kliničkih ishoda. Opservirani neželjeni klinički ishodi su bili dominantno pojava HCC (7 događaja, tj. trećina neželjenih ishoda), ali bez statistički značajne povezanosti sa virusološkim ishodom (p=0,414). Statistički značajni prediktori nastanka HCC bili su preterapijske vrednosti  $\alpha$ -fetoproteina- AFP ( $\beta=0,097$ ; HR=1,101; 95%CI=1,043-1,163; p=0,001), porast AFP tokom perioda praćenja ( $\beta= 3,215$ , HR=24,901; 95%CI=2,966-209,057; p=0,003) i pojava biohemijskog relapsa ( $\beta=1,649$ , HR=5,204; 95%CI=1,160-23,341; p=0,031). U celoj kohorti pacijenata zabeleženo je ukupno 24/325 smrtnih ishoda (7,4%), od čega je 79,2% bilo primarno hepatoloških uzroka smrti (p<0,001). Pacijenti sa terapijskim neuspehom su imali 3,3 puta veći rizik od smrtnog ishoda u odnosu na pacijente sa postignutim SVR (HR=3,3, za 95%CI=1,396-7,802; p=0,007). Takođe je pokazano da su prediktori smrtnog ishoda u celoj kohorti bili, pored terapijskog neuspeha, starost preko 40 godina ( $\beta=2,947$ , HR=0,053; 95%CI=0,004-0,648; p=0,043), komorbiditeti ( $\beta=0,824$ ; HR=2,279; 95%CI=1,011-5,144; p=0,047), preterapijska trombocitopenija ( $\beta=1,589$ , HR=0,204; 95%CI=0,047-0,897; p=0,035) i povišene vrednosti AFP ( $\beta=0,052$ , HR=1,054; 95%CI=1,001-1,109; p=0,045). U predikciji smrtnog ishoda pacijenata sa postignutim SVR, značajnu ulogu su imali pojava biohemijskog relapsa ( $\beta=2,112$ , HR=8,266 za 95%CI=2,062-33,131; p=0,003), pojava neželjenih kliničkih ishoda ( $\beta=3,487$ , HR=32,704; 95%CI=6,710-159,385; p<0,0001), dijagnoza HCC ( $\beta=2,685$ , HR=14,655; 95%CI= 3,896-55,127, p<0,0001) i porast vrednosti AFP ( $\beta=3,354$ , HR=28,618; 95%CI=3,417-239,697; p=0,002). Nije pokazan prediktivni značaj pojave kasnog virusološkog relapsa, niti progresije fibroze sa smrtnim ishodom (p>0,05).

**ZAKLJUČAK:** Postignut SVR i nakon dugogodišnjeg praćenja predstavlja pouzdan laboratorijski marker terapijskog uspeha tj. uspešne eliminacije HCV infekcije, koji je doveden u vezu sa redukcijom neželjenih kliničkih ishoda i smanjenjem mortaliteta. Kasni virusološki relaps je redak događaj, čiji je nezavisni prediktor non-CC genotip IL28B. Zbog postojanja rizika od nastanka neželjenih kliničkih ishoda i mogućnosti dalje redukcije mortaliteta u slučaju pravovremene dijagnostike HCC, opravdano je dugoročno praćenje pacijenata sa teškom fibrozom i cirozom i nakon postignutog SVR i uprkos dugogodišnjem održavanju nedetektibilne viremije.

**Ključne reči:** stabilan virusološki odgovor, kasni virusološki relaps, klinički ishod, hepatocelularni karcinom

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Epidemiologija

**UDK broj:**



# IMPACT OF SUSTAINED VIROLOGICAL RESPONSE ON THE OUTCOME AND PROGNOSIS IN PATIENTS WITH SEVERE FIBROSIS AND CIRRHOSIS CAUSED BY CHRONIC HEPATITIS C INFECTION

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** Hepatitis C virus (HCV) is the most common worldwide cause of chronic viral hepatitis with a long-term progression, variable clinical presentation and outcome. Serbia is a country with an intermediary prevalence of HCV infection, estimated around 0,19% among blood donors and approximately 1,13% in the general population of Serbia. In spite of two decades of diagnostic and therapeutic experiences with clinical observances, there are no published data concerning long-term prognosis and outcome in these patients. Patients with baseline liver fibrosis and cirrhosis present the most challenging group of patients, and are mostly underdiagnosed due to the asymptomatic nature of the disease and insufficient screening, especially in certain groups of patients. In this particular group, even after treatment success and HCV suppression, remains a risk of unfavourable outcomes including virological and biochemical relapse, adverse clinical outcomes and hepatocellular carcinoma (HCC). Although sustained virological response (SVR) undoubtedly reduces liver-related morbidity and mortality in patients with severe baseline liver damage, clinical observance and published data show that these patients need continuous monitoring and HCC screening in spite of HCV suppression and/or fibrosis regression.

**AIM:** Main purpose of this study was to examine reliability and durability of SVR, as a predictor of treatment success and long-term outcome in patients with HCV related severe baseline liver injury.

**PATIENTS AND METHODS:** A cohort study included 325 patients with HCV related severe baseline liver injury, who completed treatment protocol with pegylated interferon and ribavirin from January 2003. until November 2011. at the Hepatology department of the Clinic for Infectious And Tropical Diseases, Clinical Center of Serbia. After treatment completion, patients were followed and endpoints were December 2015, death outcome or the date of the last check-up. Inclusion criteria included: chronic hepatitis C infection with elevated liver enzymes, age

18-65 years, baseline severe fibrosis or cirrhosis (METAVIR>F2), a completion of treatment protocol and informed consent.

**RESULTS:** Rate of SVR was exceptionally high in patients with severe baseline liver damage, and was sustained in 64,3% (irrespective of HCV genotype); 54,5% in genotype 1 (G1) infection, 80% in non-G1 infection. Also, SVR was achieved in 53,6% of patients with baseline cirrhosis. Independent predictors of SVR included; end treatment response-ETR (OR=7,235; 95%CI=3,480-15,042;  $p<0,001$ ), age<40 years (OR=3,357; 95%CI=1,536-7,334;  $p=0,002$ ), non-G1 HCV infection (OR=3,005; 95%CI=1,601-5,640;  $p=0,001$ ) and lower METAVIR fibrosis score F2-F3 (OR=1,795; 95%CI=1,010-3,191;  $p=0,046$ ). During follow-up period, among patients who achieved SVR, detectable viraemia was observed in 14 patients (6,7%), who were considered late virological relapsers. Although among them patients with unfavourable IL28B TT rs12979860 genotype, baseline cirrhosis and high viraemia were predominant, the only statistically significant negative predictor of late virological relapse was presence of CCrs12979860 genotype (in 82,1% of late relapsers  $\beta=-1.814$ , HR=0,520; 95%CI=0,278-0,979; $p=0,013$ ). Biochemical relapse was more frequently observed in late relapsers (in 57,1% of patients, compared to 13,8% of patients with stable SVR,  $p<0,0001$ ), but without a statistically significant correlation (OR=1,389; 95%CI=0,367-5,261;  $p=0,629$ ). Fibrosis progression correlated with the presence of baseline cirrhosis ( $\beta=0,826$ ; HR=2,285; 95%CI=1,323-3,947;  $p=0,003$ ) and genotype 1 HCV infection ( $\beta=0,435$ ; HR=2,145; 95%CI=1,961-2,486;  $p=0,048$ ). Late virological relapse and biochemical relapse did not present significant predictors for fibrosis progression ( $p>0,05$ ). During follow-up period among patients with SVR, a total of 21 adverse outcomes were noted in 13 patients (6,2%), predominantly HCC (7 events), although there was no correlation with late virological relapse in these patients. Significant predictors of HCC occurrence were baseline  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) levels ( $\beta=0,097$ , HR=1,101; 95%CI=1,043-1,163;  $p=0,001$ ), elevation of AFP during follow-up period ( $\beta=3,215$ ; HR=24,901; 95%CI=2,966-209,057;  $p=0,003$ ) and biochemical relapse ( $\beta=1,649$ ; HR=5,204; 95%CI=1,160-23,341;  $p=0,031$ ). During follow-up period a total of 24 death outcomes (7,4%) were observed, mostly liver-related (79,2%). Patients with treatment failure had 3,3 times higher risk for death outcome, compared to patients who achieved SVR (HR=3,3; 95%CI=1,396-7,802;  $p=0,007$ ). In the whole study population, death outcome predictors were age>40 years ( $\beta=2,947$ ; HR=0,053; 95%CI=0,004-0,648;  $p=0,043$ ), comorbidities ( $\beta=0,824$ ; HR=2,279; 95%CI=1,011-5,144;

p=0,047), baseline thrombocytopenia ( $\beta=1,589$ ; HR=0,204; 95%CI=0,047-0,897; p=0,035) and AFP levels ( $\beta=0,052$ ; HR=1,054; 95%CI=1,001-1,109; p=0,045). Among patients who achieved SVR, significant mortality predictors were the occurrence of biochemical relapse ( $\beta=2,112$ ; HR=8,26; 95%CI 2,062-33,131;p=0,003), unfavourable clinical events ( $\beta=3,487$ ; HR=32,704; 95%CI=6,710-159,385; p<0,0001), diagnosis of HCC ( $\beta=2,685$ , HR=14,655; 95%CI=3,896-55,127; p<0,0001) and elevation of AFP ( $\beta=3,354$ , HR=28,618; 95%CI=3,417-239,697; p=0,002). Late virological relapse and progression of fibrosis did not significantly affect mortality in patients who achieved SVR (p>0,05).

**CONCLUSIONS:** SVR is a reliable and durable laboratory marker of treatment success and HCV elimination, with a significant impact on clinical adverse events reduction and improved survival. Late virological relapse is a rare event, with a non-CC genotype IL28B as an independent predictor. Because of the risks of adverse clinical outcomes and possibility of further mortality reduction, due to early HCC diagnosis, it is advisable to continue follow-up of patients with severe baseline liver injury beyond achieving SVR and even after years of viral suppression.

**Keywords:** sustained virological response, late virological relapse, clinical outcome, hepatocellular carcinoma

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Epidemiology

**UDC number:**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Virus hepatitisa C-biologija i kliničke implikacije.....	1
1.2. Varijabilnost HCV-mehanizmi i posledice.....	5
1.3. Epidemiologija HCV infekcije na globalnom i lokalnom nivou.....	8
1.3.1. Prevalencija- Evropa i naše okruženje.....	8
1.3.2. Putevi transmisije HCV infekcije-rizici i trendovi.....	10
1.4. Mehanizam HCV infekcije- patogeneza, osvrt na imunološke mehanizme i prirodni tok HCV infekcije.....	13
1.5. Terapijske opcije za lečenje hronične HCV infekcije-efikasnost terapijskih protokola i dugoročna prognoza .....	18
1.5.1. Raspoložive terapijske opcije za lečenje hronične HCV infekcije -istorijat, prediktori, efikasnost .....	18
1.5.2. Terapijski neuspeh u eri interferona i DAA, pitanje reinfekcije.....	22
1.5.3. Izlečenje i follow-up (virusološki i biohemijski ishodi, progresija fibroze i klinički ishod.....	24
1.6. Značaj genetskih faktora-razmatranja.....	26
1.6.1. Polimorfizmi IL28B gena.....	27
1.6.2. Polimorfizmi UGT1A1 gena.....	30
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	32
<b>3. BOLESNICI I METODE</b> .....	33
3.1. Dizajn studije.....	33
3.2. Dijagnostičke metode-kliničke i laboratorijske.....	34
3.3 Terapijski protokol.....	36
3.4 Period praćenja i ishodi.....	36
3.5 Statistička analiza.....	39
3.6. Etički aspekti studije.....	40
<b>4. REZULTATI</b> .....	41
4.1. Bazalne (preterapijske) karakteristike ispitanika.....	41
4.2. Efekat primene antivirusne terapije i ETR.....	43
4.3. Uspeh terapije i SVR.....	45
4.3.1. ETR i SVR.....	45
4.3.2. Preterapijske karakteristike i terapijski zavisni faktori kod pacijenata sa postignutim SVR.....	46
4.3.3. Nezavisni prediktori SVR.....	52
4.3.4. SVR i polimorfizmi UGT1A1 gena.....	53
4.4. Period praćenja.....	55
4.4.1. Virusološki ishod.....	55
4.4.2. Biohemijski ishod.....	58
4.4.3. Progresija fibroze.....	60
4.4.4. Klinički ishodi.....	63
4.4.5. Smrtni ishod.....	66
5.4.5.1. Cela kohorta.....	66
5.4.5.2. Pacijenti sa postignutim SVR.....	70

<b>5. DISKUSIJA</b> .....	72
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	102
<b>7. LITERATURA</b> .....	104

## UVOD

### 1.1. Virus hepatitisa C-biologija i kliničke implikacije

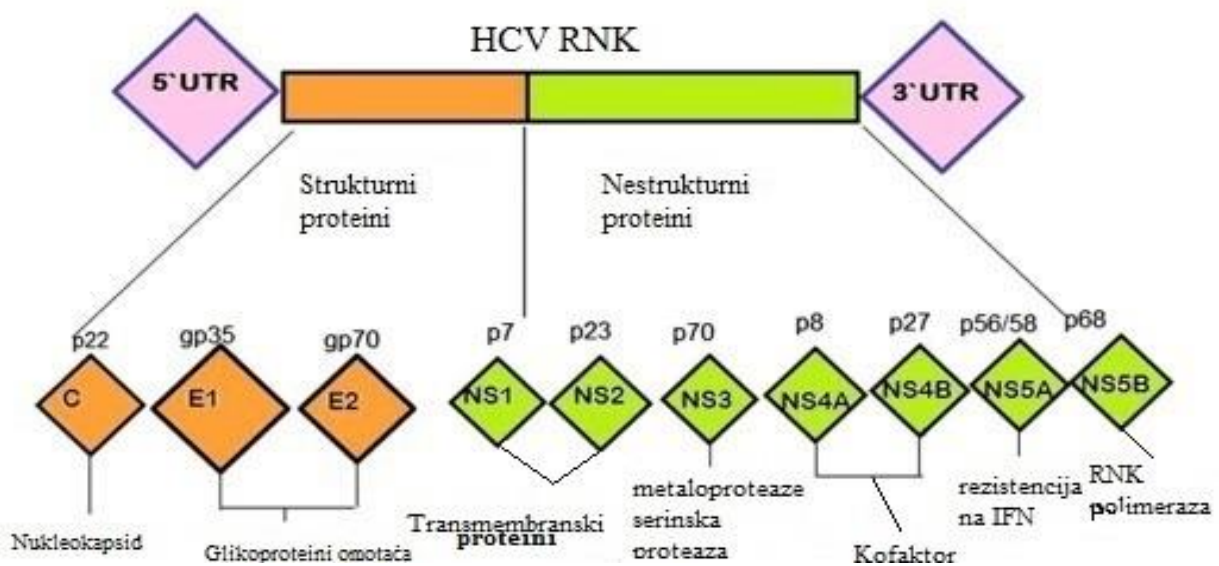
Istorijat otkrića hepatitis C virusa (HCV) i danas je poučan primer u medicini, da je evolucija znanja u našoj nauci živ, neprekidan i nikada dovršen proces. Nakon otkrića i izolacije virusa hepatitisa A i B, etiološki su razjašnjeni mnogobrojni slučajevi pacijenata sa akutno i hronično nastalim oštećenjem jetre. Međutim i dalje je postojao veliki procenat pacijenata sa akutnim i hroničnim hepatitisima, koji se nisu mogli svrstati u ove dve grupe (koji su klasifikovani i praćeni kao pacijenti sa non-A, non-B hepatitisom), naročito među osobama koje su primale transfuzije („posttransfuzijski hepatitis“). Tek je 1989. godine kloniran i sekvencioniran novi virus u biotehnološkoj kompaniji Chiron u Kaliforniji u saradnji sa Centrom za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for Disease Control and Prevention-CDC), koji je imenovan kao hepatitis C virus (HCV) [1]. Ovo epohalno otkriće novog virusa, za koji će se uskoro pokazati da je najčešći izazivač hroničnog virusnog hepatitisa i komplikacija, kao što su ciroza i hepatocelularni karcinom, omogućilo je u prvih nekoliko godina (u preterapijskoj eri) brzu proizvodnju komercijalnih testova za skrining krvnih derivata. Na taj način je HCV eliminisan u doniranim pulovima krvi, što je omogućilo da se spreči širenje HCV infekcije u grupi primalaca krvnih derivata i efektivno onemogući bar jedan način transmisije ovog patogena.

Dalja molekularna ispitivanja i kompletno sekvencioniranje genoma HCV je omogućilo bolje razumevanje patofiziologije ovog patogena i otkrivanje različitih genotipova, koji su objasnili i razlike u kliničkim manifestacijama-toku bolesti i terapijskom odgovoru (u terapijskoj eri). Filogenetske analize su takođe potvrdile činjenicu da je ovaj patogen bio prisutan i cirkulisao u proteklih nekoliko stotina godina u ljudskoj populaciji [2]. Ipak, sa sigurnošću se može proučavati tek od XX veka, kada i dolazi do njegove ekspanzije u epidemijskim razmerama, pri čemu se smatra da su najverovatniji izvori infekcije poreklom iz subsaharske Afrike i severoistočne Azije, gde se ujedno registruje i najveći stepen genetske heterogenosti HCV [2].

HCV je član familije *Flaviviridae* (rod *hepacivirus*) u kome su zastupljeni dominantno vektorski-prenosivi humani patogeni (zika, izazivači groznice West Nile, žute groznice, denge, japanskog encefalitisa). HCV je patogen samo za čoveka i šimpanze, a svi genotipovi virusa su, uprkos razlikama u sekvencama nukleotida, hepatotropni i patogeni [3].

Reč je o malom RNK virusu (oko 55 nm), koji sadrži jednolančanu pozitivno polarisanu RNK, dužine oko 9600 nukleotida, obavijenu dvostrukim (proteinskim i lipidnim) omotačem [3].

Virusna RNK se sastoji od tri različita regiona-dva kratka nekodirajuća (5'UTR-untranslated region i 3'UTR, koji su značajni u procesu translacije) i region koji kodira proteine—open reading frame (ORF), koji se sastoji od preko 9000 neukleotida ( **Slika 1.**) [3,4].



**Slika 1.** Struktura HCV RNK-uključujući nekodirajuće regione (5'UTR i 3'UTR) i kodirajuće regione (ORF) sa proteinima (preuzeto iz: Nouroz F, Nouroz S, Shaheen G, Mujtaba G, Mujtaba S. An overview on hepatitis C virus genotypes and its control. Egypt J Med Hum Genet. 2015; 85:291-298. [4])

Iako je čitav genom varijabilan, najvarijabilniji segment kodira proteine virusnog omotača (E1,E2). Najmanju varijabilnost ima 5'UTR region-koji se koristi za detekciju HCV genoma, bez obzira na genotip virusa. Deo ORF, koji se nastavlja na 5'UTR, kodira strukturne proteine (C protein, E1, E2).

Strukturni proteini-C (core) je virusni kapsidni protein, čija je uloga dovedena u vezu sa karcinogenezom i steatozom kod hronične hepatitis C virusne infekcije (HHC), dok su E1 i E2 glikoproteini virusnog omotača značajni u procesu ulaska HCV u ćeliju i perzistencije infekcije [3,5]. Upravo se u okviru E2 segmenta nalaze dva hipervarijabilna regiona (Hyper variable regions-HVR1 i HVR2) sa visokim procentom mutacija (i do 80% razlika u sekvencama aminokiselina između različitih viriona), što ih čini nepovoljnim antigenima za detekciju antitela u okviru seroloških testova i u direktnoj vezi sa perzistencijom virusa [3,5]. U nastavku 3'UTR kodiraju se nestrukturni proteini (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), koji imaju višestruke uloge u replikaciji RNK (od NS3-NS5B), uključujući uloge enzima-proteaza (metaloproteaza NS2, serinska proteaza i RNK helikaza- NS3) i kofaktora proteaza (NS4) [5].

Poznavanje raznolikosti gena HCV RNK ima i veliki praktični značaj, posebno kada su u pitanju geni za kodiranje nestrukturnih proteina (prvenstveno NS3 proteaze, NS5A proteina i NS5B polimeraze), s obzirom na veliki broj studija koje su pokazale povezanost njihovih mutacija sa terapijskim ishodom (prvenstveno pojavom odsustva rezonanzivnosti na interferon, ali i uticaja na ishod lečenja terapijskim protokolima bez interferona).

Nedvosmisleno je pokazano da mutacije NS5A regiona predstavljaju nezavisni prediktor stabilnog virusološkog odgovora eng. sustained virologic response (SVR) kod pacijenata lečenih interferonom, ali i direktno delujućim antivirusnim lekovima (Direct Acting Antivirals-DAA) [6]. Zato je poznavanje genoma HCV od velikog značaja, kako u bazičnim medicinskim naukama, proučavanju porekla i epidemiologije, patogeneze, ali i u kliničkoj svakodnevnicinaročito pitanju perzistencije HCV infekcije i pojave rezistencije na antivirusne lekove.

Proučavanje replikacije HCV, a samim time i patogeneze infekcije, je veoma dugo bilo otežano zbog nemogućnosti replikacije virusa u ćelijskim kulturama (tek od 2006. godine su pronađene odgovarajuće kulture *in vitro*) i nedostatka životinjskih modela za proučavanje



patogeneze (humani patogen, mada su zabeleženi uspešni ogledi *in vivo* infekcije šimpanzi i himeričnih uPA-SCID miševa sa transplantiranim humanim hepatocitima) [7,8].

Prvi i ključni korak predstavlja vezivanje za jedan ili više receptora na površini ćelije domaćina, potom endocitoza, a fuzijom omotača viriona sa ćelijskom membranom unosi se virusni nukleokapsid u citoplazmu inficirane ćelije. Nakon toga se u citoplazmi odigrava translacija virusnog genoma, kao i proizvodnja strukturnih i nestrukturnih proteina.

Neki od mnogobrojnih do sada otkrivenih receptora za HCV su CD81, scavenger receptor BI (SR-BI), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3 (L-SIGN), low-density lipoprotein receptor (LDL-R), klaudin 1 i okludin [9].

U kliničkom smislu, poznavanje receptora za vezivanje i ulazak HCV u ćeliju domaćina, objašnjava selektivnost na nivou ćelije (hepatotropizam) i selektivnosti na nivou vrste domaćina. Treba napomenuti da određeni receptivni faktori (uključujući i same receptore) za ulazak HCV postoje i u drugim ekstrahepatičnim tkivima. Međutim, neadekvatna ekspresija i/ili lokalizacija receptora u kombinaciji sa neodgovarajućim intraćelijskim uslovima ipak onemogućavaju ulazak i *in vivo* replikaciju HCV u drugim ćelijama [10].

U kliničkoj praksi se viđaju i mnogobrojne ekstrahepatičke manifestacije HHC-uključujući vaskulitise, neuropsihijatrijske i limfoproliferativne poremećaje [11-13]. Pokazano je da HCV *in vitro* može da uđe u ćelije humanog perifernog neuroblastoma (*SKNMC* linija) i epitelioma, ćelijske kulture adenokarcinoma (Caco-2), a virusna RNK je izolovana u limfocitima, monocitima i dendritičnim ćelijama [14-17].

Međutim uprkos ovim bazičnim molekularnim otkrićima, koja su u korelaciji sa kliničkim opservacijama, mnogi autori smatraju ovu temu kontroverznom, zbog čestih kontaminacija obdukcionih nalaza (pogotovo kada je u pitanju centralni nervi sistem) i nedostatka direktnih dokaza aktivne replikacije HCV RNK. Slični kontradiktorni dokazi postoje i kada je u pitanju hematopoetski sistem, jer je pokazano da HCV iz ćelijskih kultura može da adherira, ali ne i da uđe u bilo koju mononuklearnu ćeliju krvi [10,18].

Replikacija virusnog genoma se dešava u citoplazmi, preko intermedijerne sinteze negativno polarisane RNK, a progenotori viriona se potom formiraju u citoplazmatskim vezikulama, koje posle procesa maturacije, napuštaju pupljenjem i egzocitozom ćeliju domaćina [9].

Kako nema replikacije preko intermedijerne DNK, nema ni inkorporacije virusne nukleinske kiseline u genetski materijal domaćina, što predstavlja značajnu razliku u odnosu na patogenezu virusa humane imunodeficijencije (HIV). U procesu replikacije, pokazano je da veliki značaj imaju i faktori domaćina- kao što je sinteza lipoproteina domaćina neophodna za proizvodnju infektivnih viriona- ciklofilin A i mikro RNK- 122-u, interakciji sa regionima virusne RNK. Zbog toga je jedna od strategija pronalaska novih antivirusnih lekova imala za cilj i da inhibira ciklosporin A i mikro RNK-122 u cilju onemogućavanja virusne replikacije [3,19].

## **1.2.Varijabilnost HCV-mehanizmi i posledice**

Velika genetska varijabilnost HCV je posledica dva glavna mehanizma-nedostatka reparacije od strane RNK zavisne RNK polimeraze i velikog stepena virusne replikacije [20]. Defektna reparaciona sposobnost RNK polimeraze tokom transkripcije dovodi do zamene nukleotida uz izostanak aktivnosti 5' do 3' egzonukleaze, koja bi korigovala nastale greške [20]. HCV ima jedan od najvećih stepena mutacija (procenjena srednja frekvencija  $10^3$  baznih supstitucija po nukleotidu godišnje) među svim RNK virusima, uključujući i HIV.

Pored toga, veoma intenzivna replikacija, sa virusnim poluživotom od par sati (uz produkciju i klirens od oko  $10^{12}$  viriona dnevno), u kombinaciji sa već pomenutom defektnom reparacijom ima posledičnu akumulaciju mutacija u okviru jednog domaćina i pojavu velikog broja tzv. kvazispecijesa virusa [21-23].

Mutacije, koje se akumuliraju tokom replikacije, mogu biti „neme“ (supstitucija nukleotida bez uticaja na redosled aminokiselina i strukturu virusnog proteina) i nesinonimne (koje rezultiraju izmenama u strukturi proteina ili ponekad čak i letalne –sa posledičnom proizvodnjom defektnog viriona) [20].

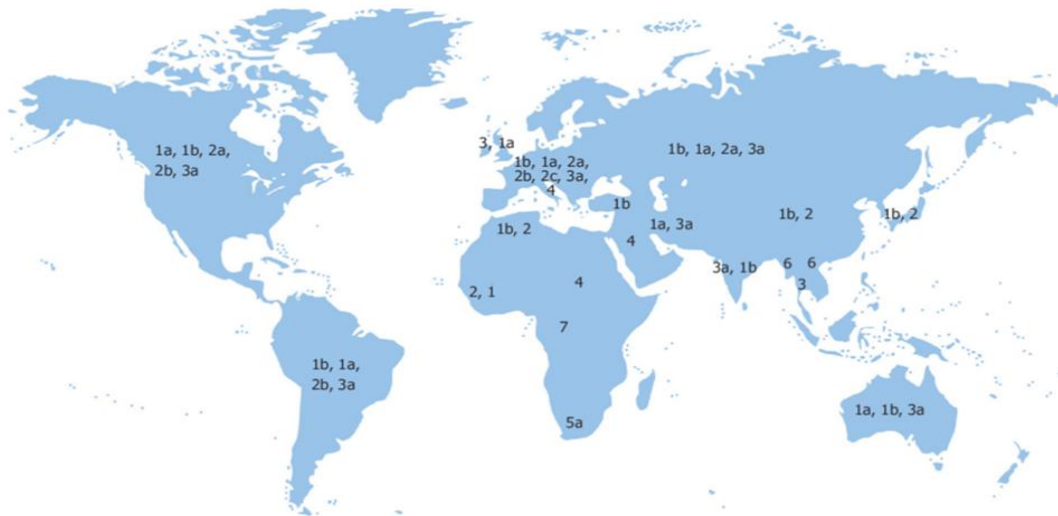
Prilikom analize genoma HCV (**Slika 1.**), već je pomenuto da su najstabilniji i najmanje varijabilni regioni 5'UTR (genetsko preklapanje različitih specijesa i do 90%), 3' UTR i region koji kodira nukleokapsid (genetsko preklapanje 81-88% sekvenci), a najvarijabilniji regioni koji kodiraju proteine omotača E1 and E2 (razlike u sekvencama hipervarijabilnih regiona E2 i preko 50%) [3-5].

Neprestana pojava mutacija i selekcija evoluciono prilagodljivijih mutanata (tzv. visok fitness) je uzrokovala dva fenomena sa velikim značajem u kliničkoj praksi- pojavom već pomenutih kvazispecijesa tj. različitih populacija virusa u okviru jednog domaćina, kao i pojavom selektovanih varijanti virusa (virusni genotipovi) u određenim geografski ili epidemiološki definisanim populacijama.

Klinički značaj kvazispecijesa je višestruk u patogenezi HCV infekcije. Prisustvo varijabilnih tipova virusa omogućava perzistenciju i hronicitet infekcije mehanizmima imunološkog izbegavanja. Takođe je pokazano, da je prisustvo kvazispecijesa u vezi sa nastankom rezistencije na antivirusne lekove i da za sada onemogućava pronalazak efikasne vakcine [5,24].

Praćenje evolucije HCV genotipova nam daje višestruke dragocene informacije o poreklu, promenama koje je ovaj virus doživljavao i o putevima transmisije infekcije. Genotipizacija virusa je danas jedan od prvih koraka u dijagnostici HCV infekcije, koja opredeljuje vrstu i dužinu trajanja terapijskog protokola i predstavlja prediktor terapijske efikasnosti [5]. Sekvencioniranjem različitih izolata HCV, širom sveta je identifikovano 7 glavnih genotipova (razlike u redosledu nukleotida među genotipovima se kreću od 31%-34%, a u redosledu aminokiselina od oko 30%) i veliki broj subgenotipova (više od 74, koji se razlikuju po redosledu nukleotida od 20%-23%) [5].

Globalna distribucija genotipova (**Slika 2.**) HCV ima veliki epidemiološki značaj, jer je specifična za određene populacije, u zavisnosti od geografske distribucije i dominantnog načina prenosa, što omogućava uvid u praćenje porekla i načina širenja infekcije [5].



**Slika 2.** Globalna distribucija HCV genotipova (preuzeto iz: Taherkhani R, Farshadpour F. Global Elimination of Hepatitis C Virus Infection: Progresses and the Remaining Challenges. World J Hepatol. 2017; 9(33):1239-1252 [25])

Širom sveta najčešće su zastupljeni tzv. epidemijski subtipovi (genotipovi 1a, 1b, 2a, i 3a), prevalentni u razvijenim zemljama, koji su uneti u populaciju i rašireni posredstvom transfuzija kontaminiranih krvnih produkata i upotrebom injekcionih narkotika [26-28]. Genotip 1 je globalno najzastupljeniji, sa prevalencijom subtipa 1a u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i Australiji, dok je u Japanu subtip 1b prisutan čak kod 73% obolelih [29-31]. Genotip 2 ima veliku globalnu zastupljenost u sličnim regijama, kao i genotip 1. Među mlađim pacijentima, a naročito u populaciji intravenskih korisnika narkotika (persons who inject drugs-PWID) najzastupljeniji je genotip 3 [31,32]. Genotip 4 je dominantan u zemljama severne i centralne Afrike, dok su genotipovi 5 i 6 (tzv. endemski genotipovi) lokalno distribuirani (Južna Afrika i Hong Kong). Svojevremeno veliki diskurs je vođen oko klasifikacije dodatnih genotipova HCV koji su otkriveni u drugim delovima sveta, ali su naknadno novopredloženi genotipovi od 7-11 razvrstani u 7 osnovnih genotipova [33]. Kod određenog broja pacijenata viđa se kombinacija više genotipova (tzv. mešoviti genotipovi), sa varijabilnom zastupljenošću od 5%-25,3% i visokom prevalencijom u populaciji PWID [34-36].

U kliničkoj praksi, pravilna identifikacija genotipa je, kao što je već pomenuto, jedna od osnovnih dijagnostičkih koraka u evaluaciji HCV infekcije. Kod terapijski naivnih pacijenata, genotip predstavlja značajan prediktor prirodnog toka infekcije i brzine napredovanja bolesti. U terapijskom smislu, genotipizacija je ključna za odabir vrste i dužine primene antivirusne terapije, sa značajnim efektom na ishod lečenja. Poseban problem predstavlja lečenje pacijenata, kod kojih genotipizacijom nije identifikovana infekcija mešovitim genotipom, zbog primene neodgovarajućeg protokola i pojave čestog virusološkog relapsa [36].

U našoj zemlji postoji ograničen broj populacionih studija koje su na većim uzorcima ispitivale zastupljenost genotipova HCV. U seriji od 416 pacijenata lečenih u tercijernoj zdravstvenoj ustanovi od HHC, pokazano je da je najzastupljeniji HCV genotip 1 (63%), sa znatno manjom prevalencijom ostalih genotipova (genotip 3 kod 19,7%, genotip 2 kod 6,7% i genotip 4 kod 4,6% pacijenata). Mešovita infekcija sa dva ili tri genotipa je pokazana kod 6% pacijenata [5].

### **1.3. Epidemiologija HCV infekcije na globalnom i lokalnom nivou**

#### **1.3.1 Prevalencija- Evropa i naše okruženje**

Prema izveštaju Svetske Zdravstvene Organizacije (World Health Organization- WHO), 2015. godine je bilo oko 71 milion osoba inficiranih HCV, sa globalnom prevalencijom od oko 1% [37]. Najveća prevalencija HCV je zabeležena u regiji Istočnog Mediterana (2,3%) i na nivou čitave Evrope (1,5%). Kada su u pitanju osobe sa HIV infekcijom, kod oko 2,3 miliona (od ukupno procenjenih 36,7 miliona) je detektovano prisustvo anti-HCV antitela tj. konstatovane su serološke naznake HCV infekcije [37].

Najveće procenjene prevalencije su uglavnom u zemljama Afrike i Azije ( Egipat čak i do 22%, Pakistan 2,4-6,5%, Kina oko 3,2%, Indonezija 2,1%), pri čemu su u pitanju seroprevalencije kod dobrovoljnih davalaca krvi, koje su samo aproksimacija realnog stanja u opštoj populaciji [5,38].

U zemljama našeg okruženja, kao što su Bugarska, Bosna i Hercegovina, Hrvatska, Makedonija, prevalencija HCV infekcije se kreće od 0,7 (Češka) do 1,4% (Slovačka).

Procenjena prevalencija u Srbiji, prema Mitroviću i saradnicima, je oko 1,13%, dok je prevalencija anti-HCV pozitivnosti među dobrovoljnim davaocima krvi 0,19%, što nas svrstava u grupu pomenutih zemalja, sa intermedijernom prevalencijom HCV infekcije [37-39]. Kada je reč o istočnoj Evropi i bivšim zemljama Sovjetskog Saveza, iako su podaci veoma nepouzdana, procenjene prevalencije se kreću čak i do 4,5% u Moldaviji, sa prevalencijom viremičnih od skoro 70% [37].

Predominantan genotip u našoj sredini i zemljama istočnog bloka, je genotip 1 (oko 70%), potom genotip 3 (između 15-21%), dok su ostali genotipovi znatno ređe zastupljeni [40]. Razlozi za ovako visoku prevalenciju u odnosu na zemlje zapadne Evrope i SAD, su mnogobrojni, ali pošto je većinom reč o zemljama u razvoju, sa ograničenom dostupnošću skrininga na HCV i primene antivirusne terapije, jasno je da je realna incidencija zapravo mnogo viša od procenjene. U zemljama istočnog bloka, pored nepovoljnih migracijskih tokova, činjenica je da postoji i ekstremna stigmatizacija u populaciji zatvorenika, PWID, komercijalnih seksualnih radnika i homoseksualaca (men who have sex with men- MSM), a bez nacionalne strategije za eliminaciju HCV infekcije. Nedostupnost anonimnog testiranja, programa zamene sterilnih igala, supstitucione terapije, visoka prevalencija koinfekcije (hepatitis B virusna infekcija-HBV i HIV) kao i nepovoljne socijalne okolnosti, omogućavaju da se fokus HCV infekcije kontinuirano održava. Plan WHO za globalnu eliminaciju HCV infekcije do 2030. godine upravo i podrazumeva aktivni skrining, ubranu i svima dostupnu djagnostiku i sveobuhvatno lečenje pacijenata sa HCV infekcijom, bez obzira na populacionu grupu [40]. Zapravo ova strategija definiše eliminaciju, kao smanjenje broja *de novo* stečenih HCV infekcija od bar 80%, uz redukciju HCV-izazvanog mortaliteta od bar 65%. Klinička iskustva i epidemiologija sasvim podržavaju ovakvu mogućnost, posebno u eri novih terapijskih protokola (DAA), gde je uspešnost terapije i preko 95% [41].

### 1.3.2 Putevi transmisije HCV infekcije-rizici i trendovi

Dominantan način transmisije HCV infekcije je preko krvi i krvnih derivata osobe sa detektibilnom viremijom, bez obzira da li je u pitanju akutna ili hronična HCV infekcija [5]. Rizik za infekciju je najveći nakon uboda igle kontaminirane viremičnom krvlju i kreće se od 0-10%, pri čemu na verovatnoću transmisije utiču i mnogi drugi faktori [42]. Poređenja radi, rizik za HBV infekciju nakon sličnog događaja, a bez primene postekspozicione profilakse (PEP), iznosi 6-30% [43]. Ključni faktori, koji utiču na rizik od infekcije, su veličina inokuluma, izgled instrumenta tj. igle (najveći rizik je prilikom uboda iglom sa lumenom i iznosi oko 6,1%), broj uboda (npr. u populaciji PWID rizik za infekciju raste za oko 10% godišnje, zbog „staža“ i repetitivnih inokulacija, velike prokuženosti čitave populacije HCV infekcijom i „deljenja“ pribora), koinfekcije (HBV ili HIV) [5,44].

Iz svega navedenog, jasno je da je najveći rizik za HCV infekciju u grupi PWID, a rizik se povećava sa boravkom u zatvoru, beskućništvom, koinfekcijama. Postoje mnogobrojne procene o prevalenciji PWID u opštoj populaciji. U SAD se procenjuje da PWID čine oko 2,6% od ukupnog stanovništva starijih od 13 godina u 2011. godini, sa prevalencijom HCV infekcije od 126 na 100 000 PWID [45]. U Evropi je situacija slična, pri čemu je studija Hahné i saradnika (u koju su bili uključeni aktivni PWID i osobe koje su nekada u životu pripadale ovoj populaciji) pokazala da je procenjena prevalencija u proseku 50 puta veća kod PWID, u odnosu na opštu populaciju [46]. Podaci EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction) iz 13 zemalja Evrope, pokazuju prevalenciju anti-HCV antitela u populaciji PWID od 15% do 84%, od čega je šest zemalja imalo prevalenciju i preko 50% [47]. U našoj zemlji procenjen broj PWID iz 2017. godine je oko 20 500, uz aproksimativnu prevalenciju anti-HCV pozitivnih iz 2014. godine između 60-80% (ukupno oko 14 000 osoba) [48,49]. Nažalost, ovako ozbiljnu i nepovoljnu epidemiološku situaciju dodatno komplikuje činjenica da u Srbiji ne postoje programi zamene igala i špriceva, kao i da su kod nas programi opioidne supstitucione terapije (OST) sa veoma malim obuhvatom od svega 10% [48]. Ograničena dostupnost testiranja i savetovanja u specijalizovanim centrima, stigmatizacija, inkarceracija i koinfekcije, čine ovu grupu izuzetno vulnerabilnom u našoj sredini.

Osim injekcione upotrebe, inhalaciona upotreba narkotika takođe nosi rizik od HCV infekcije, zbog „ušmrkivanja“ narkotika zajedničkom cevčicom ili savijenom novčanicom, preko

oštećene nosne sluznice [50]. Širom sveta prevalencija HCV infekcije kod korisnika inhalacionih narkotika se kreće od 2% to 38%, pri čemu su podaci iz zemalja Južne Amerike (inače svetskog epicentra za uzgoj, proizvodnju i distribuciju kokaina) najimpresivniji [51-53]. U nekoliko studija u Brazilu je procenjena prevalencija od 5,8% do 36,2% HCV infekcije uz dominaciju genotipa 1, kod korisnika inhalacionih narkotika (uglavnom kokaina) [52].

Kada su u pitanju transfuzije kao rizik, retrospektivne studije iz 1960 tih i 1970 tih godina su pokazale da je gotovo 25% primalaca derivata krvi u SAD inficirano HCV. Zbog toga postoje preporuke za testiranje svih primalaca krvi (koji su primali derivate zaključno sa 90tim godinama) na HCV infekciju [53-55]. Na svu sreću transfuzije krvi i krvnih derivata (uključujući i svežu smrznutu plazmu i kriporecitat), su danas marginalizovan put transmisije HCV infekcije, zahvaljujući otkriću standardizovanih testova za skrining pulova krvi (serološki testovi su dostupni od 1990. godine) i implementaciji veoma striktnih metoda detekcije. Aktuelni rizik od posttransfuzijske infekcije HCV u SAD je 1 u milion (0,0001%) transfuzijskih jedinica, slično kao i u ostalim razvijenim zemljama [55]. Najveći rizik za posttransfuzijsku HCV infekciju je u grupi osoba sa hemofilijom, kod kojih se primenjuju i preparati dobijeni iz velikog broja krvnih jedinica različitih davalaca (faktori koagulacije VIII i IX), pa je pre 90 tih godina HCV infekcija (a često i koinfekcije HBV i HIV) bile gotovo neizbežne u ovoj grupi. Zaključno sa 1993. godinom, u registrima SAD je konstatovana prevalencija HCV infekcije od 89%, nakon upotrebe kontaminiranih faktora koagulacije, kod bolesnika sa različitim urođenim koagulopatijama [56]. Mnogobrojni domaći autori na nacionalnom nivou su davali različite procene prevalencije HCV infekcije kod osoba sa hemofilijom i to od 38,7% pa do 68% [57-59]. Prema podacima Nacionalnog Registra urođenih koagulopatija Republike Srbije, prevalencija HCV infekcije kod pacijenata sa hemofilijama, koji su testirani na prisustvo anti-HCV antitela, iznosi 37,54% [60]. Međutim upotreba savremenih i sofisticiranih testova za detekciju HCV RNK, ali i promena terapijskih protokola (upotreba rekombinantnih faktora koagulacije), su dramatično smanjili rizik od HCV infekcije, zbog čega u podacima pomenutog Nacionalnog Registra postoji samo jedna osoba sa HCV infekcijom, mlađa od 18 godina [60].

Posebna grupa osoba, kod kojih i dalje postoji izražen rizik od HCV infekcije, su pacijenti na hemodijalizi. Pre 90tih godina je rizik od HCV infekcije bio značajno veći (naročito pre početka primene rekombinantnog humanog eritropoetina), kada su često ordinirane i



kontaminirane transfuzije krvi, mada je prisustvo HCV RNK dokazano i na dijaliznoj membrani i u ultrafiltratu, pa je zapravo reč o nozokomijalnoj infekciji [5]. Prevalencija HCV infekcije varira u zavisnosti od autora, od 5%-60%, pri čemu je poslednjih godina upotreba rekombinantnog eritropoetina dovela do značajne redukcije rizika [61-64]. Opisan je trend pada prevalencije u mnogim Evropskim centrima, npr. u Španiji sa 24% tokom 1992. godine na 9,2% u 2002. god., u Belgiji (13,5% u 1991. godini na 6,8% u 2000. godini), Francuskoj (redukcija sa 42% na 30%), Italiji (redukcija sa 27% na 16%) [64,65].

Rizik za vertikalnu transmisiju HCV infekcije se veoma razlikuje među publikovanim rezultatima, ali je u proseku procenjen na oko 2%, u zavisnosti od određenih kofaktora (npr. neprepoznata HIV koinfekcija povećava ovaj rizik na gotovo 45%) [66-68]. Najveća do sada metaanaliza, koja je uključila oko 77 studija u periodu od 1992. do 2000. godine, pokazala je rizik za vertikalnu HCV transmisiju od 1,7% [69]. Rezultati ove studije su jasno identifikovali faktore rizika za vertikalnu transmisiju, kao što su koinfekcije (HBV i HIV), određene obstetrijske procedure (npr. amniocenteza) i prolongirana ruptura membrana tokom porođaja, ali su nekonkluzivni po pitanju uticaja viremije, genotipa, načina porođaja i dojenja [69].

Što se tiče transmisije HCV seksualnim putem, postoje veoma kontradiktorni podaci među različitim autorima, ali im je zajedničko da se prevalencije HCV infekcije među diskordantnim monogamnim heteroseksualnim parovima (koji nemaju koinfekcije HIV ili HBV) kreću oko 1,2% do 2% [70,71]. U velikoj prospektivnoj studiji (the HCV Partners Study) praćeno je 500 parova i pored pomenute niske prevalencije od 1,2%, pokazana je i maksimalna incidencija HCV infekcije od 7,2 na 10 000 osoba-godina, uz maksimalni rizik po seksualnom kontaktu 1 na 380 000 [70]. Dodatni rizik za prenos HCV infekcije ovim putem, predstavljaju homoseksualni odnosi u MSM populaciji, koinfekcije (koinfekcija HIV povećava rizik od transmisije HCV 2,2 puta) i repetitivni nezaštićeni odnosi naročito u populaciji komercijalnih seksualnih radnika [5,72].

Ipak, najveći rizik za HCV infekciju, je u grupi transplantiranih bolesnika koji su dobili organ HCV pozitivnog donora. Posttransplantaciona infekcija se javlja u veoma visokom broju bolesnika, mada se rezultati različitih studija takođe razlikuju- kreću se od u rasponu od 29%-100% transplanitiranih [73-75].

Kod velikog broja osoba koje su anti-HCV pozitivne, način sticanja infekcije ostaje nepoznat. Taj se procenat kreće od 20%-50% (u našoj sredini oko 30%), ali je moguće da je ipak reč o nekim drugim načinima prenosa –jatrogeno upotrebom nesterilnog medicinskog materijala, tatoo, pirsing, nesterilne procedure u narodnoj medicini (obrezivanje, bratimljenje sa „razmenom krvi“), kozmetičke procedure [5,76]. Pokazano je da rizik od HCV infekcije znatno viši i kod osoba koje su hospitalizovane duže od 10 dana u hepatološkim jedinicima, kao i kod osoba koje prekomerno konzumiraju alkohol. U nekoliko studija je pokazana visoka prevalencija HCV infekcije kod osoba koje zloupotrebljavaju alkohol, čak i u odsustvu drugih faktora rizika, uz povećan rizik za bržu progresiju HCV infekcije i pojavu hepatocelularnog karcinoma (HCC), ali i umanjenu efikasnost terapijskih protokola baziranih na interferonu [77-79].

#### **1.4. Mehanizam HCV infekcije- patogeneza, osvrt na imunološke mehanizme i prirodni tok HCV infekcije**

Paradoksalno, mnogi autori ističu da je akutna HCV infekcija „hronični“ problem, upravo zbog određenih karakteristika, koje otežavaju njeno prepoznavanje. Osobenost akutne HCV infekcije je da evolviru u dužem vremenskom periodu (koji se kreće u dijapazonu od 2 i 26 nedelja nakon transmisije uzročnika, u proseku 7-8 nedelja), kao i da se simptomatski manifestna bolest javlja u veoma niskom procentu inficiranih (15-25%) [5,80].

Klinička slika, kod pacijenata sa simptomatskom HCV infekcijom, je često nespecifična, i ne razlikuje se od kliničkih manifestacija koje se viđaju kod drugih uzročnika virusnih hepatitisa, ali i niza akutnih infektivnih oboljenja. U kliničkoj praksi se pacijenti žale na različite tegobe-malaksalost, bolove u mišićima i zglobovima, mučninu, povraćanje, nelagodnost ispod desnog rebarnog luka, subfebrilnost, kao i promene u boji sluznica, kože, mokraće i stolice [81].

Ipak najčešći simptom, koji upravo i navede pacijente da se jave na pregled, je žutilo kože i sluznica (u jednoj manjoj studiji od 51 pacijenata sa simptomatskom akutnom HCV infekcijom, zastupljenost ovih simptoma je bila 68%), kome najčešće prethode pojava tamnijeg urina i svetlije prebojenosti stolice (39% pacijenata u pomenutoj studiji) [82]. Iako je i kod simptomatskih pacijenata akutna HCV infekcija uglavnom blaga, samoograničavajuća (u

proseku se tegobe povlače posle 2-12 nedelja) bolest, zabeleženi su veoma retki slučajevi fulminantnog hepatitisa, koji se mogu videti češće kod hronične HBV koinfekcije [81,83].

Virusološka potvrda akutne HCV infekcije uključuje novonastalu detektibilnu HCV RNK u serumu (uz prethodno dokumentovanu negativnu serologiju i nedetektibilnu HCV RNK), praćenu prisustvom antitela (anti-HCV) u periodu od oko 12 nedelja [5,81,84,85]. Od osnovnih laboratorijskih parametara, čiji se poremećaji viđaju kod akutne HCV infekcije, najčešće se registruju povišene vrednosti enzima jetre (aminotransferaze, dominantno porast alanin aminotransferaze-ALT, prosečno oko 1000 IU/ml) i hiperbilirubinemija [85].

U kliničkoj praksi, skoro 2/3 pacijenata ima asimptomatski tok bolesti (zbog čega se i ne javljaju lekaru na pregled), najčešće bez nekog jasnog i konkretnog inokulacionog akcidenta. Takođe ukoliko ne postoji dokumentovana ranija recentna negativna serologija i nedetektibilna HCV RNK, nije moguće isključiti prethodno prisutnu i neprepoznatu hroničnu HCV infekciju. U slučaju egzacerbacije hronične HCV infekcije, pacijenti mogu takođe imati navedene subjektivne tegobe, uz pozitivne serološke i molekularne testove, kao i povišene vrednosti enzima jetre, holestaze, bilirubina.

U našoj svakodnevnoj praksi, a u odsustvu jasnih dijagnostičkih kriterijuma za diferenciranje ova dva entiteta, nekada se u obzir uzimaju anamnestički podaci o rizičnim faktorima za infekciju, trendovi virusoloških i biohemijskih parametara (kod akutne HCV infekcije prvo se detektuju fluktuirajuće vrednosti HCV RNK unutar 2 nedelje od inokulacije, a porast vrednosti aminotrasferaza prethodi serokonverziji tj. pojavi anti-HCV antitela), prisustvo fibroze (kod hronične HCV infekcije).

Razlikovanje akutne od hronične infekcije je značajno u kliničkoj praksi, jer je potrebno identifikovati pacijente sa akutnom HCV infekcijom koji nisu spontano eliminisali HCV, kako bi se sprovela antivirusna terapija. Terapijski protokoli su znatno drugačiji, komplikovaniji i manje efikasni u fazi hronične HCV infekcije. Iako je efikasnost antivirusne terapije nedvosmisleno visoka kod pacijenata sa akutnom HCV infekcijom (u jednoj metaanalizi od 1075 pacijenata koji su započeli terapiju interferonom nakon 12 nedelja od postavljanja dijagnoze, postignuta je nedetektibilna viremija kod 80%), u zemljama gde su široko raspoložive nove terapijske opcije (DAA), preporuke su ipak da se pacijenti prate tokom 6 meseci (za slučaj da dođe do spontane

eliminacije virusa), a zatim sprovedu terapijski protokoli peroralnim režimima po kriterijumima za lečenje hronične HCV infekcije [86,87].

Osnovna specifičnost HCV je sposobnost da kod najvećeg broja inficiranih i imunokompetentnih osoba, izazove hroničnu (kod 55%-85% bolesnika) klinički asimptomatsku infekciju, a koja progresivno oštećuje tkivo jetre i dovodi do komplikacija, kao što su dekompenzovana ciroza i HCC [5]. Iako mehanizam perzistiranja infekcije nije u potpunosti razjašnjen, izvesno je da pored faktora koji se odnose na samog uzročnika (genotip, viremija, stepen mutacija), faktori domaćina (pol, starost, raniji kontakt sa HCV i upotreba interferona, koinfekcije, imunološki mehanizmi) i sredine, predstavljaju značajne prediktore spontane eliminacije/perzistencije HCV infekcije [85].

Poslednjih decenija, veliki broj istraživanja je usmeren na otkrivanje kompleksnih imunoloških mehanizama domaćina, koji omogućavaju spontanu eliminaciju HCV nakon akutne infekcije. U svetlu novih otkrića, pronađeni su značajni dokazi o ulozi urođenog imunog odgovora, regulisani posredstvom interferona tip I koji pored indukcije CD8 T-ćelijskih epitopa aktiviraju ekspresiju preko 300 gena sa antivirusnim dejstvom i produkuju RNK specifičnu deaminazu, GTPaze, RNK zavisnu protein kinazu, stvarajući pogodnu antivirusnu sredinu. Pored toga, pokazan je značaj adaptivnih mehanizama (posredstvom citokinima aktiviranih NK ćelija, koji aktiviraju mehanizme sinteze antitela usmerenih protiv više proteina HCV) domaćina u kada je reč o perzistenciji i spontanoj eliminaciji HCV infekcije [88,89].

Uprkos velikom napretku molekularne virusologije i imunologije, egzaktni mehanizmi progresije bolesti kod hronične HCV infekcije, koji dovode do fibroze, ciroze i HCC, su i dalje nedovoljno razjašnjeni. Zato je u kliničkoj praksi, veoma otežana precizna prognoza toka bolesti, kao i predikcija brzine progresije i/ili pojave komplikacija. Otežavajuća okolnost u problematici hronične HCV infekcije (a što je takođe slučaj i kod drugih koinfekcija-HBV i HIV) je činjenica da većina pacijenata ima višedecenijski asimptomatski tok bolesti, a znatno ređe uz nespecifične simptome (kod oko 25% pacijenata tegobe u smislu malaksalosti, nelagodnosti ispod desnog rebarnog luka), što često dovodi do „kasne“ dijagnostike i to u terminalnim fazama bolesti, kada je izgubljeno dragoceno vreme u terapijskom smislu [5].

Histološki posmatrano, evolucija hronične HCV infekcije se manifestuje kontinuiranom i progresivnom nekroinflamacijom-isprva infiltracijom limfocita i plazma ćelija u portnim

prostorima, interlobularnim ž. putevima, a potom periportalim oštećenjem, pri čemu je nekroza hepatocita praćena formiranjem regenerativnih nodula [5,90]. Kontinuirana inflamacija dovodi do fibrogeneze, a regenerativni noduli u kombinaciji sa centro-centralnom bridging fibrozom narušavaju tkivnu arhitektoniku i rezultiraju nastankom ciroze. Iako je histopatološki pregled tkiva jetre, dobijen biopsijom tkiva, i dalje zlatni standard u dijagnostici, opisane promene, iako karakteristične u patogenezi hroničnog virusnog hepatitisa (bez etiološke specifičnosti), nisu patognomonične, a viđaju se i varijacije nalaza u zavisnosti od delova tkiva koji se pregledaju [5].

Iako je teško preciznije odrediti evolutivni tok kod svakog pacijenta, postoji značajan broj studija i višedecenijsko kliničko iskustvo, koji ukazuju na mnogobrojne prediktore progresije fibroze, kao što su pol, starost (u momentu sticanja HCV infekcije), rizik za infekciju (posttransfuzijski hepatitis C ima npr. najbrži razvoj ciroze, najverovatnije zbog velikog inokuluma i ponavljanih ekspozicija), infekcija genotipom 1b, dugoročna imunosupresija (HIV infekcija, transplantacije), koinfekcija (HBV i HIV), komorbiditeti ( dijabetes melitus tip II, nealkoholni steatohepatitis), druga konkomitantna oboljenja jetre, prekomerno konzumiranje alkohola [5,91].

Pored ovih poznatih epidemioloških i demografskih prediktora, poslednjih decenija, pokazan je značaj genetskih faktora, koji mogu da predisponiraju određen broj pacijenata za progresiju fibroze. Reč je o prisustvu različitih polimorfizama gena (u lokusima angiotenzinogena, TGF- $\beta$ , gena koji kodira sintezu mikrozomalne hidrolaze, monocitnih hemotaktičkih faktora), za koje je pokazano da su u korelaciji sa težim stepenom fibroze jetre [91].

Kod oko 20% terapijski naivnih pacijenata, progresija fibroze rezultira razvojem ciroze, u veoma varijabilnom vremenskom periodu, u proseku 20-30 godina [91,92]. U stadijumu ciroze oko četvrtina pacijenata razvija terminalnu bolest jetre (end stage liver disease-ESLD)-dekompenzaciju ciroze, a godišnji rizik od nastanka hepatocelularnog karcinoma (HCC) iznosi 1%-5% [92,93].

Ono što je sasvim izvesno je da su pacijenti sa uznapredovalim oštećenjem jetre, naročito u momentu „kasnog“ otkrivanja hronične HCV infekcije, pod najvećim rizikom od nastanka

komplikacija i progresije bolesti, što ih čini apsolutnim prioritetom za što ranije sprovođenje antivirusne terapije i skrininga na HCC.

Značajan broj studija ukazuje na direktne mehanizme karcinogeneze, ali i indirektne posredstvom hronične hepatičke inflamacije, koju indukuje HCV. Činjenica je da kod izvesnog broja pacijenata rizik od nastanka HCC perzistira uprkos izlečenju HCV infekcije, govori u prilog uticaju i genetskih faktora domaćina u patogenezi HCC. Do sada je pokazano da se više genetskih mutacija ili polimorfizama u različitim lokusima (MICA/HCP5, LEPR and IFNL3) može dovesti u vezu sa nastankom HCC, nezavisno od ishoda lečenja/vrste primenjenog terapijskog protokola za HCV infekciju [94].

U eri novih terapijskih opcija, gde se postiže stabilan virusološki odgovor (SVR) kod više od 90% pacijenata, još uvek je nejasno da li se rizik od nastanka HCC razlikuje u zavisnosti od primenjenog terapijskog protokola-DAA u odnosu na režime zasnovane na interferonu. Određeni autori, a na osnovu otkrića u oblasti hemoprevencije, sugerišu upotrebu modulatora signalnih puteva interferona, EGF, mTOR, retinoid X receptora  $\alpha$ -, kao dodatne opcije za hemoprevenciju HCC, uprkos postignutom SVR [94].

Svi pomenuti rezultati i višedecenijsko kliničko iskustvo u dijagnostici i lečenju pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom, u našoj sredini su rezultirali određenim smernicama, kojih se pridržavamo u praćenju terapijski naivnih i terapijski iskusnih pacijenata, naročito kada se uzmu u obzir kompleksne interakcije višestrukih faktora za progresiju oštećenja jetre i nemogućnost precizne vremenske predikcije individualnog toka bolesti.

## **1.5. Terapijske opcije za lečenje hronične HCV infekcije-efikasnost terapijskih protokola i dugoročna prognoza**

### **1.5.1. Raspoložive terapijske opcije za lečenje hronične HCV infekcije-istorijat, prediktori i efikasnost**

Farmakoterapijska otkrića u ovoj sferi su uvek pratila u stopu nova saznanja vezana za biologiju virusa, imunologiju i epidemiologiju HCV infekcije [95]. Prvi korak u lečenju HCV infekcije, bio je primena monoterapije interferonom (IFN), koji je u SAD i zapadnoevropskim zemljama primenjivan još 80tih godina (pre otkrića samog uzročnika tzv. „posttransfuzijskog“ hepatitisa) za lečenje non-A non-B hepatitisa. Pokazano je da IFN poseduje višestruki terapijski efekat- antivirusno dejstvo (ovaj efekat je korišćen i za lečenje HBV infekcije), imunomodulacija (zbog čega je korišćen i u terapiji relapsirajuće-remitentne multiple skleroze) i antiproliferativni efekat (ovaj efekat je korišćen i u lečenju određenih tumora- Hairy Cell Leukemije, melanoma, folikularnog limfoma i Kaposi sarkoma kod pacijenata sa AIDS-om) [5,96,97]. U našoj sredini primenjivan je počevši od sredine 90tih godina, ali uz veoma nisku efikasnost, mnoštvo neželjenih efekata i problematičnu komplikansu [5].

Od 1997. godine u Srbiji je licenciran pegilovani IFN- $\alpha$  (PEG-IFN), čija je jednostavnija primena i poboljšana efikasnost, isprva monoterapijski, a potom u okviru dualnog režima (u kombinaciji sa ribavirinom), značajno promenila sudbinu pacijenata sa hroničnim hepatitisom C.

U eri kombinovane antivirusne terapije tj. dualnog terapijskog režima, glavni cilj terapijskog protokola je supresija HCV infekcije sa postizanjem nedetektibilne viremije. Na taj način se dugoročno redukuju/zaustavljaju nekroinflamacija u tkivu jetre, fibrogeneza, umanjuju/eliminiraju ekstrahepatičke manifestacije, preveniraju pozne komplikacije (dekompenzacija ciroze, HCC), uz smanjenje mortaliteta vezanog za jetru [5,98,99].

U terapijskim protokolima postoji nekoliko povoljnih terapijskih ishoda, koji ukazuju na efikasnost primenjene terapije; prvenstveno postizanje SVR (tj. nedetektibilna HCV RNK 6 meseci nakon završetka terapije). Monitoring virusološkog odgovora tokom primene terapije može ukazati na ishod lečenja, između ostalog veoma rani virusološki odgovor (Rapid virologic response-RVR, tj. nedetektibilna HCV RNK nakon 4. nedelje terapije), rani virusološki odgovor

(partial Early virologic response-parcijalni EVR, tj. redukcija  $\geq 2 \log(10)$  HCV RNK, ili kompletni EVR- nedetektibilna HCV RNK na kraju 12. nedelje terapije), odgovor na kraju terapije (End of treatment response ETR- nedetektibilna HCV RNK na kraju terapije) [5]. U našoj svakodnevnoj kliničkoj praksi, kao i u drugim zemljama sa nižim prihodima, postoje znatna ograničenja u dostupnosti molekularnih virusoloških testova, pa se neke od ovih tačaka praćenja (endpoints) ne mogu ni realizovati. U takvim situacijama se koriste dostupne biohemijske analize (parametri krvne slike, hepatogram), uz neinvazivne imaging metode (Fibroscan) u adjuvantnoj proceni efikasnosti terapije.

Najpouzdaniji pokazatelj efikasnosti terapije je SVR, koji je doveden u vezu sa dugoročnim održavanjem nedetektibilne viremije u oko 99% pacijenata, uz značajno smanjenje mortaliteta (kako opšteg, tako i vezanog za jetru) [98,99,100]. Na postizanje SVR kod dualnog terapijskog režima (PEG-IFN i ribavirin), značajnog uticaja imaju prediktori vezani za sam virus (genotip, bazalna viremija), pacijenta (starost, bazalni stepen oštećenja jetre, genetski polimorfizmi prvenstveno IL28B, komorbiditeti kao što su insulinska rezistencija, viši BMI) i same terapije (komplijansa, održavanje preporučenih doza IFN i ribavirina, dodatak proteaznih inhibitora kod pacijenata sa genotip 1 infekcijom). Najveća efikasnost je registrovana kod pacijenata sa genotip 2, 3 i 6 infekcijom (SVR i do 80%) uz nisku bazalnu (preterapijsku) viremiju (HCV RNK < 800 000 IU/mL), dok su najniže stope SVR zabeležene kod pacijenata sa genotip 1 infekcijom (40-50%) [5,101-103]. Postoje značajni dokazi, koji govore u prilog individualnim rasnim razlikama u postizanju SVR, pri čemu su najniže stope SVR zabeležene kod pacijenata negroidne rase (kako zbog veće zastupljenosti genotipa 1, nepovoljnijeg profila IL28B polimorfizma i razlike u farmakokinetici ribavirina) u odnosu na pacijente bele rase, dok su kod pacijenata u Aziji zabeležene najviše stope SVR u odnosu na druge kontinente [104-107]. U mnogobrojnim prospektivnim studijama je pokazano da su najznačajniji pozitivni prediktori SVR, pored gore pomenutih, i mlađa dob prilikom otpočinjanja terapije, niži stepen fibroze (naročito odsustvo ciroze), niži bazalni nivo triglicerida i HDL, viši preterapijski nivo LDL, upotreba statina, odsustvo steatoze jetre, nivoi vitamina A, D i B12 [5,108-112].

Iako je pegilacijom interferona dobijen protokol sa značajno boljim sigurnosnim profilom, ipak se tokom primene ovog dualnog terapijskog režima konstatuje mnoštvo neželjenih efekata. U kliničkoj praksi ovo može značajno uticati na komplijansu pacijenata, inicirati



redukciju doze lekova i može negativno uticati na ishod lečenja tj. smanjiti stope SVR (prediktori SVR vezani za samu terapiju) [113]. U jednoj velikoj kohortnoj studiji, pokazan je značaj adherencije, jer su pacijenti koji su bili manje komplijantni i primili 80% predviđenog terapijskog protokola imali i značajno niže stope SVR (48%). Pokazano je da je u slučaju prekida terapije SVR iznosio svega 12%, a u grupi pacijenata kod kojih je nastavljena terapija, uprkos redukcijama doze, SVR je iznosio 65% [114].

Rezultati ovakvih studija uz višedecenijsko kliničko iskustvo, koje potvrđuje značaj adherencije pacijenata, su za poslednju deceniju značajno unapredili u našoj sredini faktore vezane za samu primenu terapije. Formirane su interne smernice za praćenje pacijenata, omogućeno finansiranje terapije od strane fonda za Zdravstveno osiguranje Srbije i uveden decentralizovani sistem lečenja u Srbiji, sa mogućnošću primene antivirusne terapije u četiri Kliničko bolnička Centra u Srbiji (KBC Niš, KBC Kragujevac, KBC Vojvodina i KC Srbije).

Publikovani rezultati, koji se odnose na postizanje SVR u našoj sredini su uglavnom ograničeni na relativno male uzorke pacijenata. U studiji sprovedenoj 2012. godine u kojoj je učestvovalo 387 terapijski naivnih pacijenata sa HHC iz opšte populacije lečenih u KC Srbije, stope SVR su bile izuzetno visoke i kretale se za genotip 1 infekciju 60,7%, genotip 3- 87,8%, uz ukupnu genotip-nezavisnu stopu SVR od 70,5% [115]. Grupa autora iz KC Kragujevac je 2013. godine na uzorku od 81 pacijenata opisala još više stope SVR, i to 87% za pacijente sa genotipom 1 i 4, kao i 86% za genotip 2 i 3 infekciju [116]. Što se tiče dostupnih podataka u specijalnim populacijama pacijenata, raspoloživi su rezultati manje studije iz 2016. godine od 32 pacijenata iz zatvorske sredine, kod kojih su takođe postignute visoke stope SVR od 53,8% za genotip 1 infekciju, zatim SVR od 73,3% kod genotip 3 i 66,6% kod genotip 4 infekcije, što je takođe komparabilno sa rezultatima iz opšte populacije [117]. Takođe su 2013. godine publikovani i rezultati efikasnosti terapije za pacijente iz populacije PWID u studiji od 100. bolesnika, sa ukupnim postignutim stopama SVR od 67,7%, (SVR za genotip 1 i 4 je bio 63,3%, za genotip 2 i 3 je postignut SVR od 86,6%), bez razlike u efikasnosti u odnosu na kontrolnu grupu pacijenata, koji nisu bili PWID [118].

Tokom 2010. godine je u SAD i zapadno evropskim zemljama (a kod nas uz veoma ograničen broj bolesnika od 2012. godine) registrovan i tzv. trojni režim, dodavanjem još jednog leka iz grupe proteaznih inhibitora (boceprevir i telaprevir) dualnom režimu. Time je povećana

efikasnost terapije kod pacijenata sa genotip 1 infekcijom (kod terapijski naivnih boceprevir i do 66%, telaprevir i do 79%, a kod tzv. nonrespondera tj. pacijenata koji su doživeli terapijski neuspeh sa do tada raspoloživim protokolima lečenja- boceprevir do 66%, telaprevir i do 86%). [119]. Trojni režimi zapravo predstavljaju prvi pokušaj uvođenja direktno delujućih antivirusnih lekova (direct acting antivirals-DAA) u do tada raspoložive režime, čime se značajno uticalo na stopu SVR, ali je pojava mnogobrojnih neželjenih efekata ovog režima (sa prvom generacijom proteaznih inhibitora) značajno ograničila njegovu upotrebu.

Naša iskustva sa trojnim režimom su veoma ograničena. U našoj zemlji su publikovani rezultati jedne manje pilot studije iz 2015. godine sa 20. pacijenata (uključeni su i terapijski naivni i terapijski iskusni pacijenti) sa genotip 1 infekcijom i teškom fibrozom/cirozom, koji su lečeni tripl režimom sa boceprevirom, a kod kojih je postignut SVR u 55% slučajeva, ali sa diskutabilnim profilom podnošljivosti [120].

Kulminacija nove terapijske ere se dogodila 2013. godine u SAD, kada je federalna agencija za lekove (FDA) odobrila prvu kombinaciju dva DAA u jednoj tableti (kombinacija sofosbuvir/ledipasvir). Na taj način je revolucionarizovana komfornost i efikasnost terapije. Dužina lečenja je od 12-24 nedelja (u zavisnosti od genotipa, stepena fibroze/ciroze i prethodnih terapijskih neuspeha) uz postizanje SVR kod više od 95% pacijenata, veliki komfor i minimalne neželjene efekte [121]. Do sada su registrovane četiri klase direktno delujućih antivirusnih lekova, u zavisnosti od cilja delovanja- NS3/4A inhibitori (već pomenuti boceprevir, telaprevir, asunaprevir, paritaprevir, glecaprevir, grazoprevir, simeprevir), NS5A inhibitori (daclatasvir, ledipasvir, velpatasvir, pibrentasvir, ombitasvir i elbasvir), inhibitori NS5B nukleotida (sofosbuvir) i nenukleozidni inhibitori polimeraze (dasabuvir) [122].

U našoj zemlji je tokom 2016. godine registrovano više kombinacija DAA uključujući sofosbuvir/ledipasvir, grazoprevir/elbasvir, i tzv. 3D režim (paritaprevir sa busterom ritonavirovom, NS5A inhibitor- ombitasvir i NS5B inhibitorom polimeraze –dasabuvirom). Nažalost, zbog visokih troškova, je upotreba ovih protokola ograničena na veoma mali broj pacijenata godišnje na nivou cele zemlje i rezervisana za najteže bolesnike (uglavnom terapijski iskusne), kod kojih je ujedno i stopa SVR najniža.

Prva iskustva u primeni DAA u Srbiji su publikovana 2018. godine, tj. prikaz slučaja pacijenta sa terminalnom bolesti bubrega na programu hemodijalize, terapijski iskusan (relaps

nakon primene interferona) i sa genotip 1 HCV infekcijom bez fibroze, a koji je uspešno lečen 3D režimom, uz nedetektibilnu viremiju 12 nedelja nakon završetka terapije [123]. Druga multicentrična studija, čiji su rezultati publikovani 2019. godine, prikazala je podatke iz realnog života o efikasnosti i bezbednosti 3D režima u kombinaciji sa ribavirinom, kod 21 pacijenata (dominantno terapijski-iskusnih) sa genotip 1 infekcijom, od kojih je 43% imalo METAVIR skor>3. U ovoj studiji, Simonović i autori su prikazali efikasnost pomenutog režima uz postizanje SVR kod 95,4% i minimalne neželjene efekte kod 14% pacijenata [124].

Osim ovog prikaza slučaja, nema drugih publikovanih podataka u literaturi, a vezano za upotrebu DAA u Srbiji. Trenutno u našoj zemlji su i dalje za većinu pacijenata raspoloživi samo režimi zasnovani na interferonu, dok su DAA dostupni veoma ograničenom broju, uglavnom terapijski iskusnih pacijenata.

### **1.5.2. Terapijski neuspeh u eri interferona i DAA, pitanje reinfekcije**

Cilj antivirusne terapije je postizanje stabilnog virusološkog odgovora (SVR) tj. nedetektibilna HCV RNK u krvi 24. nedelje nakon završetka terapije, što praktično znači eliminaciju HCV iz krvi. U kliničkoj praksi se postizanje SVR često izjednačava sa pojmom eradikacije HCV infekcije, naročito u određenim grupama pacijenata (pacijenti sa HCV non-G1 infekcijom, niskom bazalnom viremijom, odsustvom fibroze) [5,101-103]. Najveća efikasnost je registrovana kod pacijenata sa genotip 2, 3 i 6 infekcijom (SVR i do 80%) uz nisku bazalnu (preterapijsku) viremiju (HCV RNK<800 000 IU/mL), dok su najniže stope SVR zabeležene kod pacijenata sa genotip 1 infekcijom (40-50%) [5,101-103].

Međutim najveći izazov u svakodnevnoj kliničkoj praksi, predstavljaju situacije koje se smatraju terapijskim neuspehom: pacijenti kod kojih se ne beleži redukcija HCV RNK nakon 12 nedelja lečenja, tzv. *non responderi* (pacijenti koji ne postižu nedetektibilnu viremiju tokom čitave terapije i ETR), tzv. rani relapseri (pacijenti koji postignu ETR, ali ne i SVR) i tzv. pozni relapseri (pacijenti koji postignu SVR, ali u toku perioda praćenja dolazi do ponovne pojave detektibilne HCV RNK u odsustvu reinfekcije). Kod svih pacijenata sa refraktarnom HCV infekcijom, od velikog je značaja da se pokuša sa retreatmanom (terapijske opcije su različite u zavisnosti od samog pacijenta) i ostvari SVR, jer je terapijski neuspeh dugoročno doveden u

vezu sa progresijom bolesti, nastankom komplikacija i povećanim mortalitetom. U ovoj grupi pacijenata se tokom perioda praćenja često javlja i potreba za alternativnim terapijskim opcijama, uključujući transplantaciju jetre, pogotovo u slučaju dekompenzacije ciroze. Iskustva savremenih transplantacionih centara u SAD i zapadnoj Evropi pokazuju da je transplantacija jetre povezana sa značajnim komplikacijama, kao što su ograničena raspoloživost organa, gotovo 100% verovatnoća (kod pacijenata sa detektibilnom viremijom) posttransplantacione re infekcije grafta uz nepovoljnu dugoročnu prognozu i kompromitovan kvalitet života. U našoj zemlji su iskustva sa ovim vidom lečenja veoma ograničena. Prva transplantacija jetre je sprovedena u Srbiji, još 1995. godine, ali nema publikacija o daljem progresu, broju izvedenih intervencija, niti bilo kakvom praćenju transplantiranih pacijenata [125]. Iako je došlo do promena zakonske regulative pitanja donorstva organa, naša zemlja nije član grupe Eurotransplant International Organization, pa nema ni pouzdanog dugoročnog planiranja po pitanju transplantacija jetre, pogotovo u grupi pacijenata sa HCV infekcijom.

Poseban problem u terapijskom i epidemiološkom smislu, predstavljaju pacijenti kod kojih dođe do reinfekcije (ponovne infekcije, drugim sojem HCV, a nakon uspešno sprovedene antivirusne terapije). Iako se u eri DAA eliminacija HCV infekcije sprovede i do 95% pacijenata, zbog odsustva protektivnog imuniteta (HCV u biološkom smislu nema latentne forme replikacije, za razliku od HIV) pacijenti se mogu ponovo inficirati novim sojem HCV, uprkos prethodno sprovedenom uspešnom lečenju. Nakon reinfekcije, pacijenti su ponovo u riziku od nastanka nepovoljnih ishoda i omogućavaju dalju transmisiju virusa, što značajno otežava mogućnost globalne eradikacije HCV infekcije, a u odsustvu efikasne vakcine [121,126]. Posebno ugrožene populacije, pod rizikom od reinfekcije su PWID (0-5 slučajeva na 100 osoba-godina, mada stope reinfekcije mogu dostići i 10% na godišnjem nivou) i MSM (kod osoba sa HIV koinfekcijom stope reinfekcije dostižu 15–25%, mada su zabeležene i visoke stope kod HIV negativnih) populacije [127].

### **1.5.3 Izlečenje i follow-up (virusološki i biohemijski ishodi, progresija fibroze, klinički ishod)**

Do sada je mnoštvo studija pokazalo da postizanje SVR značajno redukuje pojavu hepatičkih i ekstrahepatičkih komplikacija, mortalitet, utiče pozitivno na bubrežnu funkciju (što je od velikog značaja za pacijente na hemodijalizi i sa transplantiranim bubregom) i kardiocirkulatorni sistem [5].

Iako je značaj postizanja SVR neosporan, postavlja se pitanje njegove održivosti, naročito u pojedinim grupama pacijenata i pojave tzv. kasnog virusološkog relapsa. Nekolicina autora sa dugogodišnjim follow-up pacijenata, koji su postigli SVR nakon terapije interferonom, je dala podatke od bar 0,8% kasnog virusološkog relapsa (detektibilne viremije nakon postignutog SVR) nakon petogodišnjeg perioda praćenja [128]. Ipak, detaljnijom analizom raspoloživih publikovanih podataka, dolazi se do veoma širokog dijapazona publikovanih stopa kasnog virusološkog relapsa-koje se, iako niske, kreću u intervalu od 0%-9% [128-131]. Na osnovu toga, može se zaključiti da postoje značajna ograničenja, koja otežavaju interpretaciju ovih podataka- pre svega mali broj ispitanika u studijama, follow-up period kraći od 5 godina, heterogene populacije (pacijenti sa različitim stepenom preterapijskog oštećenja jetre i različitim genotipovima HCV), upotreba nedovoljno sofisticiranih molekularnih testova [129,130]. Takođe, postoji veoma mali broj studija u kojima su rađene i molekularne filogenetske analize, kako bi se isključila mogućnost reinfekcije ili okultne infekcije. Simmons i autori u svojoj meta-analizi, ukazuju na održivost nedetektibilne viremije nakon postignute SVR kod čak 99% pacijenata tokom petogodišnjeg praćenja, pri čemu je zaključeno da je najveći rizik od ponovne pojave detektibilne viremije povezan sa reinfekcijom, a ne kasnim relapsom, i to sa stopama od 0,95%, 10,67% i 15,02% u nisko-rizičnoj, populaciji sa srednjim rizikom i populaciji sa visokim rizikom za reinfekciju [131].

Naše kliničke opservacije u vezi sa pacijentima sa kasnim virusološkim relapsom su slične, kao i do sada publikovani slučajevi/serije slučajeva stranih autora. Uglavnom je reč o pacijentima bez subjektivnih tegoba, kod kojih je dijagnostikovana detektibilna viremija, najčešće tokom višegodišnjeg praćenja i novonastale povišene aktivnosti enzima jetre. Lu i autori su u svojoj studiji predložili hipotezu da kod ovakvih pacijenata postignut SVR predstavlja supresiju virusne replikacije, pre nego eradikaciju HCV infekcije [129]. U našoj zemlji do sada

nisu rađene bilo kakve studije praćenja, niti procene dugoročnog ishoda nakon postignutog SVR, a kako Srbija nije uključena u programe epidemiološkog monitoringa HCV infekcije, ne postoje ni publikovani rezultati po ovom pitanju.

Kao mogući prediktori kasnog virusološkog relapsa u literaturi se navode imunosupresija (najčešće kod HIV koinfekcije), visoka bazalna viremija i određeni nepovoljni genotipovi IL28B, što govori u prilog pomenutoj hipotezi o supresiji HCV bez prave eradikacije [131,132]. Što se tiče problema kasnog virusološkog relapsa, a kod pacijenata lečenih protokolima bez interferona, do sada postoji nekoliko pojedinačnih prikaza slučajeva, koji se uglavnom dovode u vezu sa prisustvom rezistentnih mutanata HCV [133]. Značaj virusoloških mutacija je neosporan prilikom primene DAA, kako je pokazano i da su mutacije NS5A i NS3 nezavisni prediktori SVR, za razliku od do sada dobro proučenih (nivo HCV RNK, stepen fibroze i polimorfizmi IL28B) prediktora iz ere interferona [133-135].

Kada je u pitanju praćenje biohemijskih parametara, većina pacijenata sa SVR pored virusološkog, ostvari i biohemijski uspeh (tj. normalizaciju vrednosti enzima jetre- aspartat aminotransferaze-AST, alanin aminotransferaze-ALT i bilirubina), osim u slučaju prisustva nekog drugog komorbiditeta [128,136]. Marugan i saradnici su u svojoj follow-up studiji od 153 pacijenata sa SVR potvrdili održavanje urednih vrednosti hepatograma kod 99% pacijenata i tokom perioda praćenja (čak i kod pacijenta koji je dobio HCC), osim u slučaju pacijentkinje, koja je zbog fibromijalgije uzimala visoke doze nesteroidnih antiinflamatornih lekova [128].

Postoje značajni dokazi da su pacijenti sa preterapijskom teškom fibrozom ili cirozom i dalje pod rizikom od nastanka komplikacija i neželjenih kliničkih ishoda, čak i u slučaju postizanja SVR i/ili regresije fibroze/ciroze [137-139]. Naše kliničko iskustvo u praćenju pacijenata sa bazalnim teškim oštećenjem jetre, je takođe pokazalo da uprkos uspešnoj antivirusnoj terapiji i/ili održavanju nedetektibilne viremije godinama nakon SVR, postoji rizik od komplikacija, naročito nastanka HCC. Zbog toga je značajno identifikovati i pratiti ovu specifičnu grupu pacijenata. Pored toga, strani autori su pokazali da određeni komorbiditeti, kao što su dijabetes melitus tip 2, gojaznost, nealkoholni steatohepatitis (NASH) i visoke vrednosti gama-glutamil transferaze (GGT), predstavljaju faktore rizika za progresiju fibroze i nastanak HCC u ovoj grupi pacijenata [136,137]. Naše kliničke opservacije i publikovani rezultati drugih autora, vezanih za ovu specifičnu grupu pacijenata, doveli su do toga da se u našoj matičnoj

ustanovi sprovodi politika višedecenijskog praćenja pacijenata sa preterapijskom teškom fibrozom/cirozom, bez obzira na ishod lečenja i viremiju. Dugogodišnje praćenje je u našim uslovima često otežano zbog tehničkih problema, kao što su neraspoloživost virusoloških testova, decentralizacija medicinskih usluga, nedostatak/odlaganje imaging dijagnostike i ograničene dostupnosti neinvazivne dijagnostike (Fibroscan). Iako nema preciznih preporuka, interesantno je da su rezultati jedne kohortne studije u Škotskoj pokazali da je neželjeni morbiditet vezano za jetru kod pacijenata sa postignutim SVR najčešće u vezi sa drugim, komorbiditetima i alkoholizmom, zbog čega autori sugerišu praćenje pacijenata i nakon uspešnog završetka antivirusne terapije [138]. Smernice relevantnih hepatoloških institucija u svetu, takođe sugerišu periodični skrining na HCC u ovoj grupi pacijenata, uz neodređenu dužinu praćenja (najverovatnije doživotno) i nakon postignutog SVR [87].

## **1.6. Značaj genetskih faktora-razmatranja**

Tokom višedecenijske prakse u radu sa pacijentima sa HCV infekcijom, kliničari se sreću sa situacijama i poteškoćama po pitanju dijagnostike, terapije i neizvesne prognoze, kod izvesnog broja pacijenata. Nekada se ove individualne osobenosti, naročito po pitanju kliničkog toka bolesti i farmakoterapije, teško mogu objasniti poznatim i do sada publikovanim prediktorima/faktorima rizika. Zahvaljujući veoma opsežnom skriningu čitavog ljudskog genoma (genome-wide association study- GWAS), otkriveno je mnoštvo genetskih varijacija (single nucleotide polymorphisms-SNP), koje su kasnije dovedene u vezu sa određenim bolestima, a potom i identifikovani kao farmakoterapijski/farmakogenetski i prognostički prediktori.

Kada je u pitanju HCV infekcija, najveći broj polimorfizama, koji je analiziran kao mogući prediktor ishoda bolesti i terapije, se odnosi na gene čiji su produkti vezani za imunološki sistem, metabolizam i lipide [140]. U patogenezi HCV infekcije, najznačajniji su polimorfizmi gena, koji su dovedeni u vezu sa prirodnim tokom HCV infekcije, koji kodiraju za interleukin 28B (IL28B), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), apolipoprotein B (APOB), interleukin-10 (IL-10), interferon gama inducibilni protein 10 (IP10), natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) [140]. Naročito su impresivni dokazi o „povoljnim“ genotipovima IL28B (

rs12979860 CC, rs8099917 TT i ss469415590DG) i polimorfizam KIR (KIR3DS1), koji su dovedeni u jasnu vezu sa spontanom eliminacijom HCV infekcije kod terapijski naivnih pacijenata [141,142]. Revolucionarno otkriće novih farmakogenetskih markera u eri primene pegilovanog interferona i ribavirina, predstavljaju polimorfizmi dva gena- IL28B (genotip CC rs12979860, koji je doveden u vezu sa postizanjem SVR kod genotip 1 HCV infekcije) i inozin trifosfataza (ITPA- jasna povezanost između SNP rs6051702 i nastanka ribavirinom-indukovane hemolize kod pacijenata sa genotip 1 infekcijom) [143-145]. Iako postoje značajni dokazi o povoljnim SNP-ovima, kada je u pitanju spontana eliminacija HCV i terapijski ishod, manje je jasna situacija kada su u pitanju genetski prediktori, koji bi se mogli dovesti u vezu sa progresijom fibroze/nastanka ciroze ili nastanka HCC, zbog veoma kompleksnih interakcija između uzročnika, domaćina i faktora sredine. Postoji značajan broj studija, koje su dovele u vezu polimorfizme u domenu patatin-like (PNPLA3 polimorfizmi rs738409, rs2896019) sa nastankom steatoze jetre (najzastupljenija kod pacijenata sa genotip 3 infekcijom) i progresijom fibroze [146-148]. Kada su u pitanju drugi polimorfizmi- kao što je npr. prisustvo rs1800795 G alela na lokusu za interleukin-6 (IL-6), određeni SNP-ovi na genu za kanaboidni receptor 2 (CB2), postoje vrlo kontradiktorni rezultati različitih studija, koji mogu govoriti u prilog njihovoj povezanosti sa višim stepenom nekroinflamacije kod pacijenata sa HCV infekcijom [148-150]. Postoje takođe i kontradiktorni rezultati vezani za određene polimorfizme IL28B (rs12979860 T alel) u kombinaciji sa prisustvom još jednog SNP-a toll-like receptora 2 (TLP2 rs111200466 del varijanta), kao mogućih prediktora progresije bolesti i kliničkog ishoda [151].

### **1.6.1. Polimorfizmi IL28B gena**

Gen IL28B (ili u skorije vreme preimenovan u Interferon Lambda 3- IFL3) se nalazi na 19. hromozomu (19q13), i kodira nastanak tip III interferona tj IL28B. Citokin IL28B, koji zajedno sa IL-29 i IL-28A, ima snažno antivirusno dejstvo, indukuje ekspresiju interferon stimulišućih gena (posredstvom JAK/STAT signalnog puta) i molekule MHC I klase [152]. Ono što je posebno interesantno, je da postoji selektivnost u dejstvu ovog citokina, zbog prisustva receptora na hepatocitima (dok npr. epitelne ćelije, endotel, B i T ćelije uopšte ne reaguju na njegovo dejstvo), kao i povećana ekspresija gena, čak i nakon rezolucije virusne infekcije [152].



IL28B pored antivirusnog, ima i imunomodulatorsko (regulacijom ekspresije antigena MHC I klase) kao i antitumorsko dejstvo [152,153].

Zahvaljujući rezultatima GWAS, 2009. godine su identifikovani najznačajniji polimorfizmi gena za IL28B- rs12979860, rs12980275 i rs8099917, odgovorni za nastanak više genotipova, čije prisustvo ima nedvosmisleni uticaj na eliminaciju HCV infekcije (kako spontano kod terapijski naivnih, tako i povoljan terapijski ishod nakon primene interferona) [154-157]. Izdvojeni su „poželjniji“ genotipovi CCrs12979860 (koji je doveden u vezu sa spontanom eliminacijom HCV infekcije i predstavlja nezavisni prediktor SVR tokom terapije interferonom kod infekcije genotipom 1 HCV) i genotip rs8099917 TT- sa značajno većom verovatnoćom spontane eliminacije HCV kod terapijski naivnih pacijenata [155,157].

Iako je rs12979860 C alel najzastupljeniji širom sveta, postoje značajne razlike u njegovoj geografskoj distribuciji- od najnižih 38% u Africi, 50-85% Evropi i do 100% u Aziji. Razlike u distribuciji ovog alela se u kliničkom smislu ogledaju kroz specifičnosti i razlike u toku i terapijskom ishodu HCV infekcije kod različitih etničkih grupa [158]. Prevalencija „poželjnog“ genotipa CC rs12979860 takođe je različita- između 44-49% u Evropi, čak i do 78% kod osoba iz Istočne Azije, što objašnjava izuzetno visoke stope SVR prilikom primene interferona, naročito u odnosu na ostale delove sveta [159,160].

Do sada jedini publikovani podaci u našoj populaciji, vezano uticaj polimorfizama IL28B na terapijski ishod, su iz 2013. godine (Lazarevic i saradnici), koji su pokazali zastupljenost CCrs12979860 genotipa od 24,5% u populaciji od 106 pacijenata sa genotip 1 HCV infekcijom. Nakon sprovedene kombinovane antivirusne terapije PEG-IFN i ribavirinom, CC rs12979860 genotip je evidentiran kod 33,9% pacijenata koji su postigli SVR [161]. Slične rezultate je zabeležila grupa autora iz Hrvatske (Grgić i saradnici) analizom 595 terapijski naivnih pacijenata sa HCV i genotip 1 infekcijom, pri čemu je najzastupljeniji genotip bio CT rs12979860 (56,3 %), dok je povoljniji CC rs12979860 bio prisutan kod 29,1%, a genotip TT rs12979860 kod 14,6% pacijenata [162].

Pored mnoštva dokaza o značaju CC genotipa kao nezavisnog prediktora SVR kod genotip 1 infekcije, pokazano je da postoje i tzv. „nonresponder“ genotipovi- TT rs12979860 i CT rs12979860 SNP, kod kojih je zabeležen odložen pad viremije i niže stope SVR tokom primene protokola baziranog na interferonu [155]. Lazarević i saradnici su u svojoj studiji

pokazali da je kod pacijenata sa povoljnim genotipovima (CC rs12979860 ili AA rs12980275) postojala 3,5 puta tj. 3 puta veća verovatnoća postizanja SVR prilikom primene interferonskog režima, a već pomenuti nepovoljni genotipovi TT rs12979860 kao i GG rs8099917 su pokazani kao prediktori terapijskog neuspeha [161].

Kada su u pitanju terapijski režimi bez interferona, u eri DAA, postoje značajna ograničenja u kliničkom značaju genotipizacije IL28B. Rezultati INFORM i SOUND C2 studije ipak ukazuju na značaj CC genotipa u predikciji ranog virusološkog odgovora (svi pacijenti sa ovim povoljnim genotipom imaju pad  $>1$  log HCV RNK, čime je moguće i skraćenje terapije uz značajno smanjenje troškova lečenja), orijentaciju kod pacijenata sa akutnom HCV infekcijom (za pacijente sa CC genotipom se savetuje odlaganje bilo kakvih terapijskih intervencija) i moguća predikcija progresije fibroze [163,164].

Iako postoje nedvosmisleni dokazi o značaju pojedinih SNPova IL28B po pitanju spontane i terapijske eliminacije HCV infekcije, veoma je teško doneti definitivne zaključke o mogućem uticaju ovih mutacija na konačni ishod HCV infekcije. Postoje veoma kontradiktorni rezultati, koji se tiču moguće uloge genotipova IL28B kao prediktora progresije fibroze i pojave poznih komplikacija. Konfliktni rezultati, vezano za prisustvo CCrs12979860 genotipa, koji ukazuju na korelaciju sa višom aktivnošću ALT i fibrozom (Nouredin i saradnici), dok drugi autori ukazuju na povezanost ovog genotipa sa nižim stepenom nekroinflamacije i pojavom ciroze (Falleti i saradnici) [165,166]. Di Marco i saradnici su u svojoj studiji pokazali da osim non-CCrs12979860 genotipova, starost pacijenata i prisustvo non-TTrs8099917 genotipova imaju značajnu korelaciju sa težim stepenom fibroze, a u jednoj velikoj multietničkoj kohortnoj studiji (Fabricio-Silva et al.) pokazano je da CTrs12979860 genotip i mlađa dob predstavljaju negativne prediktore nekrinflatorne aktivnosti [167,168]. U našoj sredini osim pomenute studije Lazarević i saradnika i genotipizacije IL28B do momenta postizanja SVR, nema publikovanih rezultata o značaju genotipova IL28B kao mogućih prediktora progresije fibroze, kasnog virusološkog relapsa i kliničkog ishoda, a nakon SVR.

### 1.6.2. Polimorfizmi UGT1A1 gena

UGT1A1 gen se nalazi na 2. hromozomu i deo je velikog lokusa koji kodira za nekoliko enzima iz grupe uridin difosfoglukuronozil transferaze (UGT), koje vrše glukoronidaciju lipofilnih molekula (bilirubina, nekih lekova, hormona i reaktivnih metabolita) u hidrofилne, koji se potom eliminišu putem mokraće [169]. Ovi enzimi takođe spadaju i u indirektnе antioksidanse, zahvaljujući sposobnosti metabolisanja određenih ksenobiotika i mutagena [169,170]. Izmene na nivou UGT1A1 gena i insercija timin-adenin (TA) sekvenci u regiji promotera smanjuje transkripciju ovog gena za 67-82%, što ima za posledicu redukovanu aktivnost enzima za 20-30% [171]. Ove genetske varijacije su najčešći uzrok blage nasledne nekonjugovane hiperbilirubinemije- Gilbertovog sindroma (GS), koji se dovodi u vezu sa prisustvom *UGT1A1*\*28 genotipa (osobe sa GS su homozigoti sa 2 *UGT1A1*\*28 alela, poseduju 7/7 genotip) [172]. Nova istraživanja u oblasti farmakogenetike su pokazala i da određeni polimorfizmi ovog gena predstavljaju rizik za nastanak/terapijski neuspeh kod kolorektalnog karcinoma i Ca dojke (zbog smanjene detoksikacije karcinogena). Takođe je pokazano da mogu biti prediktori neželjenih reakcija tokom primene određenih lekova (atazanavir, irinotekan, belinostat), kao i mogući prognostički markeri hepatitis B virusne infekcije i nastanka HCC [171,173-175]. Zbog rizika od neadekvatnog metabolizma pomenutih lekova (naročito antineoplastičnih koji se često koriste u onkologiji) i mnoštva neželjenih efekata, postoje preporuke za farmakogenomskim testiranjem koje se sprovode u svakodnevnoj kliničkoj praksi [176].

Populacione studije su do sada pokazale da je zastupljenost *UGT1A1*\*28 alela veoma raznolika širom sveta, pri čemu je najređi u Aziji (oko 16%), a najzastupljeniji u Africi (43%) i Evropi (39%) [177]. Postoje podaci o zastupljenosti ovog alela i u našoj okolini- Vuković i saradnici su 2018. godine publikovali prve rezultate dobijene analizom 100 zdravih osoba, gde je zastupljenost *UGT1A1*\*28 polimorfizma bila 16%, slično rezultatima autora iz Makedonije (12,5%), Italije (16,7%) i Slovenije (13,6%) [178].

Međutim, postoji veoma ograničen broj studija koje su se bavile pitanjem zastupljenosti različitih genotipova *UGT1A1* i njihovog mogućeg uticaja kod pacijenata sa HHC. Samo dve multietničke studije daju podatke o zastupljenosti *UGT1A1*\*28 polimorfizma kod 15,7% (Urbanek i saradnici) odnosno 10,4% (Souza i saradnici) pacijenata sa HCV infekcijom

[171,179]. Zanimljivo je da postoje i publikovani i rezultati, koji ukazuju na korelaciju između prisustva ovog polimorfizma sa nivoom bilirubina i feritina (koji se smatra i indikatorom hepatičke nekoinflamacije), ali bez korelacije sa bazalnom viremijom i stepenom fibroze, kod terapijski iskusnih pacijenata [171,179,180].

*UGT1A1*\*28 polimorfizam ima nesumnjiv farmakogenetski značaj za pacijente sa HCV infekcijom, jer se na početku primene terapije ribavirinom može pojaviti klinički značajna hiperbilirubinemija, pa se na taj način genotipizacijom može doneti i odluka o nastavku primene ribavirina i isključiti ribavirinom indukovana hemoliza. Pored toga, pacijenti sa *UGT1A1* polimorfizmom mogu imati i precenjene prognostičke skorove koji se odnose na stepen oštećenja jetre (Child-Pugh and Model for End Stage Liver Disease-MELD) zbog povišenih vrednosti bilirubina, koje ulaze u kalkulaciju ovih skorova [181,182].

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U ovom istraživanju, definisano je više ciljeva:

1. Analiza pouzdanosti SVR kao prediktora terapijskog uspeha, toka i ishoda hronične hepatitis C virusne infekcije, kod pacijenata sa preterapijskim teškim oštećenjem jetre (teška fibroza i ciroza jetre).
2. Identifikovanje novih prediktora uspešnosti kombinovane antivirusne terapije, toka bolesti i ishoda kod pacijenata sa teškom fibrozom i cirozom jetre.
3. Procena učestalosti težih formi bolesti-teške fibroze i ciroze jetre, toka i ishoda lečenja na odeljenju hepatologije, Klinike za infektivne i tropske bolesti, Kliničkog Centra Srbije u periodu od 2003. godine do 2015. godine.

### 3. BOLESNICI I METODE

#### 3.1. Dizajn studije

Istraživanje je sprovedeno u formi prospektivne opservacione kohortne studije, kako bi se analizom dobijenih podataka mogle proveriti radne hipoteze i ostvariti ciljevi istraživanja. Kohortu ispitanika je činilo 325 pacijenata sa hroničnom hepatitis C virusnom infekcijom i patohistološki potvrđenom teškom fibrozom ili cirozom jetre, koji su lečeni standardizovanim protokolom PEG-IFN i ribavirinom u periodu od 1. januara 2003. do 1. novembra 2011. godine. na odeljenju hepatologije II Klinike za infektivne i tropske bolesti u Beogradu, Kliničkog Centra Srbije (KCS) i koji su ispunili sve kriterijume za uključivanje u ovo istraživanje. Nakon završetka terapije, pacijenti su praćeni ambulantno u ovoj ustanovi, a kraj perioda praćenja je bio decembar 2015.godine, smrtni ishod ili datum poslednjeg kontrolnog pregleda na koji se pacijent odazvao. Odeljenje hepatologije II KCS je odeljenje tercijernog zdravstvenog tipa, u kome je u ispitivanom periodu lečeno najviše bolesnika sa HCV infekcijom i to oko 1/3 od svih bolesnika iz cele Srbije.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u ovu studiju su bili: potvrđena hronična hepatitis C virusna infekcija uz povišene vrednosti enzima jetre, starost od 18 do 65 godina, preterapijski nalaz teške fibroze i ciroze (METAVIR >F2), kompletno sprovođenje protokola kombinovane antivirusne terapije uz saglasnost o učešću u ovoj studiji. Hronična hepatitis C virusna infekcija (HHC) je definisana kao infekcija koja traje duže od 6 meseci, praćena promenljivom aktivnošću serumskih transaminaza, prisustvom detektibilne HCV RNK u krvi i histopatološkim promenama u jetri [5]. Preterapijski patohistološki nalaz teške fibroze i ciroze (koji je definisan kao skor po METAVIR-u >2, i to METAVIR F2-prisustvo bridging fibroze, METAVIR F3-prisustvo brojnih promena bridging fibroze, METAVIR 4-ciroza) dobijen je perkutanom biopsijom jetre kod 308 pacijenata bez kontraindikacija za ovu intervenciju. Kod 17 pacijenata korišćena je neinvazivna metoda elastografije jetre (Fibroscan), zbog kontraindikacija za biopsiju jetre, na osnovu koje je procenom stišljivosti tkiva jetre procenjeno i prisustvo fibroze, kao i inkluzivni METAVIR skor>2. Kombinovana antivirusna terapija je podrazumevala primenu

protokola lečenja različite dužine (u zavisnosti od genotipa HCV) sa određenim doznim razlikama pegilovanim interferonom  $\alpha$ -2a i  $\alpha$ -2b uz ribavirin.

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja su bili: starost manja od 18 i veća od 65 godina, pacijenti sa lakšim stepenom oštećenja jetre (METAVIR<F2 tj. odsustvo fibroze), pacijenti kod kojih je prekinuta primena antivirusne terapije iz bilo kog razloga, pacijenti sa HIV i/ili HBV koinfekcijom, teški komorbiditeti jetre (hemohromatoza, Wilsonova bolest, autoimuni hepatitis, primarna bilijarna ciroza), dekompenzovana ciroza jetre, HCC, endokrinopatije (hipo/hipertireoza), aktivna upotreba psihoaktivnih supstanci i alkoholnih pića, trudnoća, teška psihijatrijska oboljenja (psihoza, depresija), epilepsija, neutropenija ( $<1500/\text{mm}^3$ ) i trombocitopenija ( $<50\ 000/\text{mm}^3$ ).

### **3.2. Dijagnostičke metode-kliničke i laboratorijske**

Hepatitis C virusna infekcija je detektovana kod pacijenata prisustvom anti-HCV antitela (ELISA testovima u parnim uzorcima), a potom su pacijenti retestirani na prisustvo virusne nukleinske kiseline PCR metodom (Kvantitativni PCR HCV RNK Cobas Amplicor HCV Test version 2.0, Roche Diagnostics, Menheim, osetljivosti: 50 IU/ml) nakon perioda praćenja od najmanje 6 meseci (preterapijski), kako bi se ispunio kriterijum o hronicitetu HCV infekcije i pokazala aktivna replikacija HCV. Nakon ispunjenja kriterijuma o hronicitetu HCV infekcije, kod pacijenata sa detektibilnom viremijom i povišenim vrednostima enzima jetre je rađena i genotipizacija HCV (Linear Array HCV genotyping test, Roche Diagnostics). Kod pacijenata sa detektibilnom viremijom nakon postignutog SVR (kasni virusološki relaps) je ponovljena genotipizacija HCV, koja je mečovana sa preterapijskom, kako bi se isključila mogućnost reinfekcije. Virusološke analize (inicijalna serologija i PCR dijagnostika pre, posle terapije i tokom perioda praćenja) je rađena u virusološkoj laboratoriji, službe za mikrobiologiju, Kliničkog Centra Srbije i u virusološkoj laboratoriji Instituta za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

U cilju inicijalne (preterapijske) procene oštećenja jetre, korišćene su neinvazivne (EHOsonografija abdomena i elastografija jetre ®Fibroscan) i invazivne dijagnostičke metode (sprovedena je kod ukupno 308 pacijenata bez kontraindikacija za perkutanu slepu aspiracionu

biopsiju jetre uz fiksaciju, kalupljenje u parafinu i bojenja na Institutu za patologiju, Medicinskog Fakulteta u Beogradu). Za histološku procenu težine oštećenja jetre tj. stepena fibroze, korišćen je METAVIR skor, a za klinički značajnu fibrozu smatran je skor >F2. Kod bolesnika sa cirozom jetre, dopunski je rađena i ezofagogastroduodenoskopija, radi procene prisustva variksa jednjaka. Tokom perioda praćenja, a u cilju procene regresije/progresije fibroze jetre, kod pacijenata su korišćene isključivo neinvazivne metode (elastografija jetre), a rebiopsije nisu rađene iz etičkih razloga.

Kod svih pacijenata je u više navrata (inicijalno, pre i tokom primene terapije, tokom perioda praćenja) rađena kompletna hematološka (pregled krvne slike sa leukocitarnom formulom) i biohemijska obrada-uključujući parametre jetrine funkcije (enzimi jetre-alanin aminotrasferaza-ALT, aspartat aminotrasferaza-AST,  $\gamma$ -glutamilttransferaza-GGT, ukupni i direktni bilirubin), holestaze (alkalna fosfataza-AF) i sintetske funkcije jetre (serumski nivo albumina, protrombinsko vreme-PT). Pored toga analizirani su parametri bubrežne funkcije (urea, kreatinin), elektroliti (natrijum, kalijum), lipidi (holesterol-Cho, trigliceridi-TG), glikemija, feritin, imunološke analize (antinuklearna antitela-ANA, antiglatkomišićna At (AGMA), antimitohondrijalna At (AMA) i At na antigen jetre, bubrega i mišića (anti-LKM 1), tumorski markeri  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), hormoni štitaste žlezde - T3, T4, TSH i antimikrozomalna At (antiTPO). Sve navedene hematološke i biohemijske analize su sprovedene u Službi za biohemiju, Kliničkog Centra Srbije.

Tokom čitave studije pacijenti su bili redovno praćeni ambulantno, uključujući anamnezu, fizikalni pregled, kontrolne hematološke, biohemijske i virusološke testove, kao i neinvazivne imaging metode EHOsonografiju i već pomenutu elastografiju jetre.

Podaci o rizicima za HCV infekciju su dobijeni iz medicinske dokumentacije (ambulantni kartoni i istorije bolesti). Trajanje infekcije je procenjivano kao vremenski period od najverovatnijeg momenta infekcije (ukoliko je postojao anamnestički podatak o potencijalnom riziku) i/ili detekcije anti-HCV pozitivnosti, do momenta kada je započeta primena antivirusne terapije. U kliničkoj praksi, ovaj vremenski period je predstavljao aproksimirano vreme tokom kojeg je pacijent bio bez antivirusne terapije tj. terapijski naivan.



Molekularna genetička dijagnostika (detekcija genotipova IL28B i genotipova UGT1A1) je sprovedena kod 42 pacijenata, na Institutu za molekularnu genetiku i genetski inženjering, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti, čiji su uzorci krvi analizirani za biogenetske markere su bili bele rase, srpskog porekla. Genomska DNK je ekstrahovana iz uzoraka periferne krvi (QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), a detekcija tri SNP-a u blizini IL28B gena (rs12979860, rs12980275 and rs8099917) je sprovedena upotrebom sekvencnih specifičnih primera (SSP-PCR), već postojećom opisanom metodologijom [183]. Broj TA ponavljanja u UGT1A1 promoteru je određivan izmenjenom metodologijom, u odnosu na ranije opisane [184]. Amplifikacija je sprovedena u ukupnoj zapremini od 25 µl, a reakcioni miks je sadržao 20 pmol svakog prajmera, 50-100 ng genomske DNK, 200 µmol/l svakog dNTP (Fermentas, ON, Canada), 1x PCR reakcionog pufera (Qiagen), 1x Q rastvora (Qiagen), 2.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U HotStar DNK polimeraze (Qiagen). Inicijalna aktivacija DNK polimeraze je bila na 95°C tokom 15 min, potom 35 ciklusa 30 sekundne denaturacije na 95°C, 30 sekundi na 63°C, i 30 sekundi elongacije na 72°C, sa konačnim periodom ekstenzije od 7 minuta na 72°C. PCR fragmenti su vizuelizovani na 2% agar gelu i konačno analizirani 15% akrilamid elektroforezom sa srebro-nitratom [184].

### **3.3 Terapijski protokol**

Svi pacijenti su lečeni kombinovanom antivirusnom terapijom PEG-IFN (pegilovani interferon  $\alpha$ -2a u dozi 180 µg ili pegilovani interferon  $\alpha$ -2b u dozi 1,5 µg/kg telesne težine/nedeljno) uz ribavirin (doza od 1000 mg dnevno za pacijente sa <75 kg, ili 1200 mg dnevno >75 kg) u trajanju od 24 nedelje za genotipove 2 i 3, kao i 48 nedelja za genotipove 1 i 4.

### **3.4 Period praćenja i ishodi**

U cilju inicijalne procene uspešnosti lečenja analiziran je virusološki odgovor na kraju terapije (End of Treatment Response-ETR), koji je definisan kao odsustvo detektibilne HCV RNK nakon završetka terapije (nakon 24. nedelje terapije za pacijente sa genotip 2 i 3 infekcijom, tj. nakon 48 nedelja terapije za pacijente sa genotip 1 i 4 infekcijom). Pacijenti kod

kojih je nalaz HCV RNK PCR bio negativan (nedetektibilna HCV RNK) po završetku terapije su smatrani za respondere, a pacijenti kod kojih je bila prisutna detektibilna HCV RNK su smatrani za non-respondere.

Kao definitivan marker efikasnosti terapije, analizirano je postizanje stabilnog virusološkog odgovora (sustained virologic response- SVR) tj. negativan HCV RNK PCR (nedetektibilna viremija) 6 meseci nakon završene antivirusne terapije. Kod pacijenata koji su postigli SVR primenjena terapija je bila uspešna, a pacijenti koji nisu postigli SVR su kategorisani kao pacijenti sa terapijskim neuspehom.

U periodu praćenja, analizirano je više ishoda:

1. Virusološki ishod kod pacijenata koji su postigli SVR-pri čemu su pacijenti klasifikovani u dve kategorije:

-pacijenti sa postignutim stabilnim SVR (nedetektibilna viremija tj. negativan HCV RNK PCR tokom perioda praćenja kod pacijenata koji su postigli SVR)

-pacijenti sa kasnim virusološkim relapsom (pacijenti kod kojih je tokom perioda praćenja detektovana HCV RNK u krvi, uprkos postignutom SVR, i kod kojih je ponovljano određivanje genotipa HCV odgovaralo preterapijskom).

U cilju evaluacije virusološkog ishoda i dugotrajnosti SVR, svi pacijenti koji su postigli SVR (n=209) su bar jednom retestirani na prisustvo HCV RNK u krvi, a kod pacijenata koji su imali detektibilnu viremiju, rađena su dva uzastopna retestiranja, uz ponovno određivanje genotipa HCV.

2. Biohemijski ishod kod pacijenata koji su postigli SVR, pri čemu su pacijenti klasifikovani u dve kategorije:

-pacijenti sa povoljnim biohemijskim ishodom/biohemijska remisija (pacijenti kod kojih su se nakon postignutog biohemijskog i virusološkog uspeha u periodu praćenja održavale normalne vrednosti serumskih transaminaza)

-pacijenti sa nepovoljnim biohemijski ishodom/biohemijski relaps (pacijenti kod kojih je tokom perioda praćenja registrovan skok vrednosti i perzistiranje povišene aktivnosti serumskih

transaminaza uprkos postignutog biohemijškog i virusološkog terapijskog uspeha u bar 2 uzastopna merenja)

3. Procena progresije fibroze u grupi pacijenata koji sa ostvarenim SVR sa različitim virusološkim (stabilan SVR i virusološki relaps) i biohemijškim (povoljan i nepovoljan biohemijški ishod), pri čemu su pacijenti klasifikovani u tri kategorije:

-pacijenti sa progresijom fibroze/ciroze (porast METAVIR fibroza skora u odnosu na preterapijske vrednosti, procenjeno Fibroscan-om)

-pacijenti sa stacionarnim nalazom fibroze/ciroze u odnosu na preterapijski (fibroza METAVIR skor neizmenjen tokom perioda praćenja)

-pacijenti sa regresijom fibroze/ciroze (redukcija u fibroza skor METAVIR tokom perioda praćenja, a u odnosu na preterapijski skor)

4. Neželjeni klinički ishod tj. pojava komplikacija vezanih za jetrinu funkciju tokom perioda praćenja, u grupi pacijenata sa postignutim SVR (uključujući pacijente sa različitim virusološkim i biohemijškim ishodima) i terapijskim neuspehom, pri čemu su pacijenti klasifikovani u dve kategorije:

-pacijenti bez razvoja komplikacija

-pacijenti sa komplikacijama- dekompenzacija jetrine funkcije (pojava ascitesa, ikterusa, spontanog bakterijskog peritonitisa, krvarenja iz variksa jednjaka i nastanak hepatičke encefalopatije) i/ili nastanak HCC.

Dekompenzacija ciroze je definisana kao epizoda ultrazvučno verifikovane *de novo* pojave intraabdominalne slobodne tečnosti (ascitesa), nastanak spontanog bakterijskog peritonitisa (potvrđenog mikrobiološkom izolacijom kulture ascitesa ili hemokulture), krvarenja iz variksa jednjaka, vidljivog ikterusa (obično sa vrednostima ukupnog bilirubina  $>35 \mu\text{mol/L}$ ), hepatičke encefalopatije (pojava različitih poremećaja/ izmena stanja svesti, intelektualni deficit ili promene u ponašanju kod pacijenata sa bolestima jetre, a nakon isključenja neurološke i psihijatrijske patologije).

Dijagnoza HCC je postavljena na osnovu pojave fokalnih lezija viđenih na ultrazvuku, uz potvrdu kompjuterskom tomografijom ili metodom nuklearne magnetne rezonance (NMR) uz prisustvo značajno povišenih vrednosti tumorskog markera AFP i/ili patohistološkim pregledom bioptiranih fokalnih promena (kod pacijenata koji su operativno zbrinuti).

5. smrtni ishod, pri čemu je on definisan kao smrtni ishod vezan za jetrinu funkciju (uzrok smrti dekompenzacija jetrine funkcije, HCC ili varicealno krvarenje) i opšti (nevezanog za jetrinu funkciju- npr. uzrok smrti kardiovaskularni incident, ekstrahepatički malignitet itd). Smrtni ishod u periodu praćenja je registrovan u celoj kohorti, tj. među pacijentima sa SVR (uključujući analizu prema virusološkom, biohemijskom, kliničkom ishodu i progresiji fibroze) i pacijentima koji su doživeli terapijski neuspeh.

### **3.5 Statistička analiza**

U statističkoj obradi podataka bili su korišćeni metodi deskriptivne (aritmetička sredina, medijana, standardna devijacija, procenat, interkvartilni opseg) i analitičke statistike. U zavisnosti od varijabiliteta podataka, od analitičkih testova su korišćeni parametarski (Studentov t- test sa Fisherovom korekcijom i ANOVA) i neparametarski ( $\chi^2$  test, Kruskal-Wallis test).

Za analizu značajnosti prediktivnih faktora (u delu analitike koji se odnosi na momenat postizanja SVR) i u cilju smanjenja konfaundiranja, korišćene su metode univarijantne logističke analize (uz prikaz koeficijenta korelacije  $\beta$ , odnosa šansi-engleski odds ratio tj. OR u intervalu poverenja- confidence interval CI od 95%) uz proveru statističke značajnosti na nivou od  $p < 0,05$ , a potom multivarijantna logistička regresija.

Za parametre koji su analizirani tokom perioda praćenja-uključujući virusološki, biohemijski, klinički ishod i preživljavanje-korišćene su metode vremenski zavisne regresije tj. Coxove regresione analize (uz prikaz koeficijenta korelacije  $\beta$ , količnika rizika-hazard ratio tj. HR u pomenutom intervalu poverenja), a za ilustraciju razlika u preživljavanju između dve grupe pacijenata, u zavisnosti od terapijskog ishoda, je korišćena Kaplan Maier krivulja.

Statistička značajnost testova je procenjivana na nivou 0,05 (statistički značajna razlika). Navedena statistička obrada podataka je realizovana pomoću programskog statističkog paketa SPSS verzije 17.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY, USA).

### **3.6. Etički aspekti studije**

Izvođenje studije je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu 29/IX-8 od 21.09.2016.godine. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa postulatima Helsinške deklaracije.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Bazalne (preterapijske) karakteristike ispitanika

U posmatranom vremenskom periodu, praćeno je i analizirano ukupno 325 pacijenata sa hroničnom hepatitis C infekcijom, koji su ispunili kriterijume za uključivanje u studiju (prethodno objašnjeni u poglavlju Bolesnici i Metode).

U **Tabeli 1.** su prikazane osnovne preterapijske (pre početka primene terapijskog protokola PEG-IFN i ribavirina) karakteristike bolesnika, uključujući relevantne demografske, epidemiološke, kliničke, patohistološke i virusološke varijable. Prosečna starost pacijenata je bila 48 godina (medijana), u intervalu od 20-65 godina, pri čemu je najviše pacijenata pripadalo starosnoj kategoriji od 45-54 godina (n=111, tj. 34,2%, p<0,001). Takođe je uočena i predominacija pacijenata starosti  $\geq 40$  godina (n=228, tj. 70,2%) u odnosu na 97 pacijenata (29,8%) mlađih od 40. godina (p<0,001). Nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti polova (p=0,202) u ispitivanoj kohorti. Rizici za HCV infekciju su se takođe značajno razlikovali u ispitivanoj populaciji, pri čemu je kod najvećeg broja pacijenata rizik bio nepoznat (n=115, tj. 35,4%) ili je bila u pitanju primena transfuzije (n=104, tj. 32%). Dužina trajanja infekcije je bila od 6 meseci do najviše 18 godina kod jednog pacijenta, a u proseku je iznosila 3,5 godine.

Nakon sprovedene patohistološke dijagnostike kod ukupno 308 ispitanika (kod 17 bolesnika su postojale kontraindikacije za sprovođenje slepe aspiracione biopsije jetre), najveći broj pacijenata je imao fibroza skor 2 po METAVIR-u (n=152, tj. 49,4%). U ispitivanoj grupi pacijenata je gotovo trećina (n=97 tj. 31,5%) imala cirozu jetre, tj. fibroza skor 4 po METAVIR-u (p<0,001).

Genotipizacija HCV je pokazala da je dominantni genotip u ispitivanoj populaciji bio genotip 1 (n=200, tj. 61,5% ispitanika), a najmanje zastupljen genotip 5 (n=4, tj. 1,2%) (p<0,001).

Bazalna viremija od  $\geq 800\ 000$  IU/ml je uočena kod 54,7% ispitanika, sa prosečnom  $\log_{10}$  HCV RNK od  $5,96 \pm 0,66$ , ali bez statistički značajne dominacije pacijenata sa visokom bazalnom viremijom (p=0,091).

**Tabela 1.** Preterapijske epidemiološke, kliničke, patohistološke i virusološke karakteristike pacijenata

<b>Varijable</b>	<b>cela kohorta</b>	<b>p</b>
<b>Pol (n,%)</b>		
Muški	174 (53,5%)	0,202
Ženski	151 (46,5%)	
<b>Starost (<math>\bar{x}\pm SD</math>) godina</b>	45,5±11,2	
<b>Starosne kategorije, godine (n,%)</b>		
16-24	13 (4%)	<0,001
25-34	55 (16,9%)	
35-44	70 (21,5%)	
45-54	111 (34,2%)	
55-65	76 (23,4%)	
<b>Put sticanja HCV infekcije, n (%)</b>		
PWID	59 (18,2%)	<0,001
transfuzije	104 (32%)	
operacije/intervencije	37 (11,4%)	
profesionalna ekspaniranost	10 (3,1%)	
nepoznati	115 (35,3%)	
<b>Dužina trajanja infekcije, godine (<math>\bar{x}\pm SD</math>)</b>	3,5±3,9	
<b>Stepen fibroze jetre, n (%)<sup>1</sup></b>		
METAVIR 2	152 (49,4%)	<0,001
METAVIR 3	59 (19,2%)	
METAVIR 4	97 (31,5%)	
<b>Genotip HCV, n (%)</b>		
G1	200 (61,5%)	<0,001
G2	14 (4,3%)	
G3	89 (27,4%)	
G4	13 (4%)	
G5	4 (1,3%)	
mešoviti	5 (1,5%)	
<b>Bazalna viremija (IU/ml)<sup>2</sup></b>		
log <sub>10</sub> HCV RNK ( $\bar{x}\pm SD$ )	5,9±0,6	
≥800 000 IU/ml HCV RNK, n (%)	173 (54,7%)	0,091
<800 000 IU/ml HCV RNK, n (%)	143 (45,3%)	

<sup>1</sup> slepa aspiraciona biopsija jetre je bila kontraindikovana kod 17 pacijenata, pa je ukupan broj pacijenata kod kojih je METAVIR skor bio poznat n=308

<sup>2</sup> iako je bazalna viremija određivana kod svih pacijenata i svakako bila detektibilna (zahvaljujući čemu je sprovedena i genotipizacija HCV RNK), kod nekolicine pacijenata (n=9) nisu mogli biti pronađeni rezultati preterapijskog PCR u raspoloživoj medicinskoj dokumentaciji, pa je analizirano ukupno 316 preterapijskih nalaza HCV RNK PCR

#### 4.2. Efekat primene antivirusne terapije i ETR

Tokom primene antivirusne terapije najčešći neželjeni efekti (**Tabela 2.**) su bili konstitucionalni (flu-like sindrom, zamorljivost, mučnina, dijarea, alopecija), lokalne reakcije na mestu aplikovanja interferona, neuropsihijatrijski (depresija, nesanica) i hematološki (citopenije) poremećaji.

**Tabela 2.** Najčešće zabeleženi neželjeni efekti primene kombinovane antivirusne terapije PEG-IFN i ribavirinom

PEG-IFN	n (%)	ribavirin	n (%)
Flu-like sindrom <sup>1</sup>	205 (63,1%)	anemija <sup>4</sup>	115 (35,4%)
lokalne reakcije	183 (56,3%)	mučnina	91 (28%)
zamor	159 (48,9%)		
trombocitopenija <sup>2</sup>	98 (30,2%)		
depresija	71 (21,8%)		
neutropenija <sup>3</sup>	52 (16%)		
dijarea	29 (8,9%)		
nesanica	20 (6,2%)		
alopecija	10 (3,1%)		

<sup>1</sup> Flu-like sindrom podrazumeva grupu znakova (povišena tel. temperatura) i konstitucionalnih tegoba (bolovi u mišićima, zglobovima, glavobolja, jeza, drhtavica)

<sup>2</sup> apsolutni broj trombocita < 100 000/μL

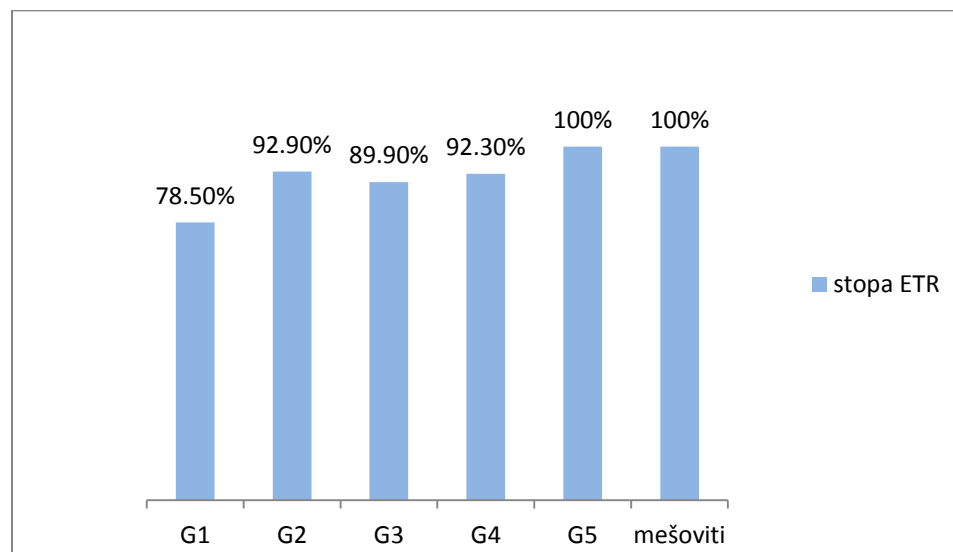


<sup>3</sup> apsolutni broj neutrofila < 500 ćelija/mm<sup>3</sup>

<sup>4</sup> koncentracija hemoglobina <100 g/L

Kod 35 pacijenata (10,7%) načinjeni su kratkotrajni prekidi u primeni antivirusne terapije zbog pojave neželjenih efekata, i to po jedan prekid kod 21 (6,5%) pacijenta, dva i tri prekida kod po 6 bolesnika (1,9%) i čak 6 prekida kod jednog bolesnika (0,3%). Zbog pojave neželjenih efekata je kod većeg broja pacijenata kratkotrajno primenjena i redukovana doza PEG-IFN tj. kod 230 pacijenata (70,7%), dok je kod 70 pacijenata (21,5%) redukovana doza ribavirina. Ove redukcije doza lekova su sprovedene uglavnom na samom početku terapije, tj. u prvih 8 nedelja terapije (70%). Prekidi terapije su bili kratkotrajni i bez efekta na postizanje ETR ( $p=0,568$ ), a nakon rezolucije neželjenih događaja, antivirusna terapija je nastavljena i kompletirana prema već opisanom protokolu.

Nakon završene antivirusne terapije, ETR je postignut kod 271 pacijenata (83,4%), dok je 54 pacijenata (16,6%) imalo detektibilnu viremiju (non-responderi). Biohemijski odgovor tj. normalizacija vrednosti serumskih transaminaza, na kraju terapije, je ostvaren kod 251 pacijenta (77,2%).



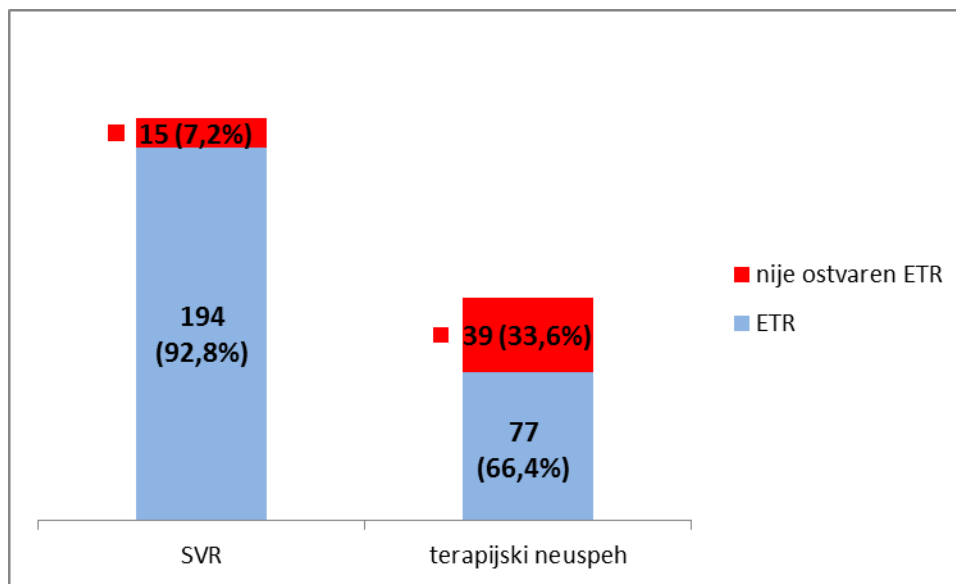
**Grafikon 1.** Stope ostvarenog ETR u zavisnosti od genotipa HCV

Stopa postizanja ETR nije se značajno razlikovala u zavisnosti od genotipa HCV infekcije (**Grafikon 1.**) ( $p=0,087$ ), a kretala se od najniže 78,5% kod genotip 1 HCV infekcije do maksimalnih 100% kod pacijenata sa genotip 5 HCV infekcijom i mešovitim genotipom (kod ukupno 9 bolesnika).

### 4.3. Uspeh terapije i SVR

#### 4.3.1. ETR i SVR

Nakon 6 meseci od završetka primene kombinovane antivirusne terapije po opisanom protokolu, SVR je postignut kod 209 od ukupno 325 pacijenata (64,3%), od čega je 194 (92,8%) prethodno postiglo i ETR (**Grafikon 2.**).



**Grafikon 2.** Razlike u zastupljenosti ETR kod pacijenata sa ostvarenim SVR u odnosu na pacijente sa terapijskim neuspehom ( $p<0,001$ )

Kod 116 pacijenata (35,7%) je registrovana detektibilna viremija 6 meseci nakon završene terapije (terapijski neuspeh, bez postizanja SVR), a u ovoj grupi pacijenata je 77 (66,4%) prethodno ostvarilo ETR (tzv. „relaps“), dok 39 pacijenata (33,6%) nije imalo prethodno ostvaren ETR („non-responderi“). Pokazana je i statistički značajno veća zastupljenost ETR kod pacijenata koji su ostvarili terapijski uspeh u odnosu na pacijente sa terapijskim neuspehom ( $p < 0,001$ ).

#### **4.3.2. Preterapijske karakteristike i terapijski zavisni faktori kod pacijenata sa postignutim SVR**

Na **Tabeli 3.** su prikazane relevantne preterapijske karakteristike pacijenata (uključujući demografske, epidemiološke, virusološke i kliničke karakteristike) i razlike između dve grupe pacijenata u zavisnosti od postignutog SVR.

Pokazano je da su pacijenti, kod kojih je postignut SVR, bili mlađi ( $43,15 \pm 11,1$  godina) u odnosu na pacijente sa terapijskim neuspehom ( $49,7 \pm 10$  godina) ( $p < 0,001$ ), kao i brojniji u starosnoj kategoriji  $< 40$  godina (37,8% u grupi SVR vs. 15,5% sa terapijskim neuspehom,  $p < 0,001$ ).

Najveći broj pacijenata sa SVR je imalo nepoznati rizik za HCV infekciju i posttransfuzijski (po 31,6%), a potom iz grupe PWID (21,5%). Daljim uvidom u rezultate, najviša stopa SVR se beleži upravo u populaciji PWID (45/59 tj. kod 76,3% pacijenata), kao i u grupi pacijenata sa postoperativno stečenom HCV infekcijom (28/37 tj. kod 75,7%), dok je najveći procenat terapijskog neuspeha bio u grupi pacijenata koji su stekli infekciju posle profesionalne ekspozicije 6/10 tj. 60% i na nepoznat način 49/115 tj. 42,6% ( $p < 0,05$ ).

Između ove dve grupe pacijenata (SVR i terapijski neuspeh), pokazana je i statistički značajna razlika u distribuciji genotipova-genotip 1 infekcija je bila prisutna kod 52,2% pacijenata sa SVR, dok je ovaj genotip bio prisutan kod čak 78,4% pacijenata sa terapijskim neuspehom ( $p < 0,001$ ). Analizom pacijenata prema genotipu-pokazano je da je od ukupno 200

pacijenata sa G1-HCV infekcijom 54,5% postiglo SVR, a među 125 pacijenata sa non-G1 infekcijom 80% je postiglo SVR ( $p<0,001$ ).

Među pacijenatima sa terapijskim neuspehom su bili zastupljeniji pacijenti koji su imali preterapijsku cirozu, u odnosu na pacijente sa postignutim SVR (42,4% vs. 25,7%,  $p<0,001$ ). Od ukupno 97 pacijenata sa cirozom (METAVIR 4), SVR je postignut kod 52 pacijenata (53,6%). Međutim upadljiva je razlika u postizanju SVR u grupi pacijenata sa METAVIR 2 skorom ( $n=152$ ), među kojima je SVR postignut kod 120 (78,9%) pacijenata vs. 32 (21,1%) sa terapijskim neuspehom ( $p<0,001$ ).

Međutim, analizom ostalih varijabli-kao što su pol i dužina trajanja infekcije (kako prosečnoj, tako i posle kategorisanja u dve grupe) između pacijenata koji su ostvarili SVR i pacijenata kod kojih je terapija bila neuspešna, nije pronađena statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ) (**Tabela 3**).

Takođe, nije bilo statistički značajne razlike između dve grupe pacijenata po pitanju konzumiranja alkohola, gojaznosti (tj. BMI>27), steatoze jetre, kao i preterapijskih vrednosti viremije (uključujući učestalost visoke bazalne viremije >800 000 IU/ml) (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Razlike u preterapijskim karakteristikama pacijenata sa postignutim SVR (n=209) u odnosu na pacijente sa terapijskim neuspehom (n=116)

<b>Varijable</b>	<b>SVR (n=209)</b>	<b>terapijski neuspeh (n=116)</b>	<b>p</b>
<b>Pol (n,%)</b>			
Muški	118 (56,6%)	56 (48,3%)	0,156
Ženski	91 (43,4%)	60 (51,7%)	
<b>Starost (<math>\bar{x}\pm SD</math>) godina</b>	43,15 $\pm$ 11,1	49,7 $\pm$ 10	<0,001
<b>Starosne kategorije, godine (n,%)</b>			
<39	79 (37,8%)	18 (15,5%)	<0,001
$\geq$ 40	130 (62,2%)	98 (84,5%)	
<b>BMI&gt;27, n(%)<sup>1</sup></b>	28 (14,8%)	13 (12,5%)	0,725
<b>Put sticanja HCV infekcije, n(%)</b>			
PWID	45 (21,5%)	14 (12%)	0,03
transfuzije	66 (31,6%)	38 (32,8%)	
operacije/intervencije	28 (13,4%)	9 (7,7%)	
profesionalna eksponiranost	4 (1,9%)	6 (5,3%)	
nepoznati	66 (31,6%)	49 (42,2%)	
<b>Konzumiranje alkohola, n(%)</b>	25 (12%)	16 (13,8%)	0,634
<b>Dužina trajanja infekcije, (<math>\bar{x}\pm SD</math>) godine</b>	3,46 $\pm$ 3,78	3,67 $\pm$ 4,27	0,653
<5 godina, n(%)	150 (71,7%)	82 (70,7%)	0,836
>5 godina, n (%)	59 (28,2%)	34 (29,3%)	
<b>Stepen fibroze jetre, n(%)<sup>2</sup></b>			
METAVIR 2	120 (59,1%)	32 (30,2%)	
METAVIR 3	30 (14,8%)	29 (27,4%)	p<0,001
METAVIR 4	52 (25,7%)	45 (42,4%)	
<b>Prisustvo steatoze, n(%)<sup>3</sup></b>	54 (27,4%)	35 (31,3%)	0,514
<b>Genotip HCV, n(%)</b>			
G1	109 (52,2%)	91 (78,4%)	p<0,001
non-G1	100 (47,8 %)	25 (21,6%)	
<b>Bazalna viremija<sup>4</sup></b>			
>800 000 IU/ml HCV RNK, n(%)	111 (54,7%)	62 (54,9%)	0,974
<800.000 IU/ml HCV RNK, n(%)	92 (45,3%)	51 (45,1%)	
log <sub>10</sub> HCV RNK IU/ml ( $\bar{x}\pm SD$ )	5,97 $\pm$ 0,66	5,94 $\pm$ 0,66	0,734

<sup>1</sup>podaci o BMI su bili raspoloživi za ukupno 293 pacijenata, i to 189 iz grupe SVR i 104 iz grupe sa terapijskim neuspehom

<sup>2</sup>podaci o METAVIR skoru su bili raspoloživi kod ukupno 308 pacijenata, kod kojih je rađena slepa aspiraciona biopsija jetre, od toga 202 pacijenata iz grupe SVR i 106 pacijenata iz grupe sa terapijskim neuspehom

<sup>3</sup>podaci o prisustvu steatoze su bili raspoloživi za ukupno 309 pacijenata, od toga 197 sa postignutim SVR i 112 sa terapijskim neuspehom

<sup>4</sup>podaci o bazalnoj viremiji su bili raspoloživi kod ukupno 316 pacijenata, od toga 203 sa postignutim SVR i 113 pacijenata sa terapijskim neuspehom

Analizirane su i vrednosti preterapijskih laboratorijskih parametara (hematološki i biohemijski), pri čemu je uočena statistički značajna razlika u bazalnim vrednostima trombocita, zastupljenosti inverzije transaminaza, glikemije i vrednosti AFP ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 4**).

Pokazano je da je apsolutni broj trombocita pre početka terapije bio viši u grupi SVR ( $195,6 \pm 58,8$  vs.  $179,5 \pm 59$ ,  $p = 0,02$ ), dok je kod pacijenata sa terapijskim neuspehom bila zastupljenija inverzija serumskih transaminaza (12,1% vs. 5,7% kod SVR,  $p = 0,04$ ), više vrednosti glikemije ( $6,12 \pm 1,66$  vs.  $5,68 \pm 1,54$  kod SVR,  $p = 0,028$ ) i više vrednosti AFP ( $7,88 \pm 6,32$  vs.  $5,86 \pm 4,78$ ,  $p = 0,01$ ).

Međutim, vrednosti ostalih hematoloških parametara (osim pomenutog ukupnog broja trombocita), nisu se značajno razlikovale između ove dve grupe pacijenata. Takođe nisu pokazane razlike u preterapijskim prosečnim vrednostima serumskih transaminaza, bilirubina, GGT, albumina, ukupnih proteina, holesterola, triglicerida i azotnih materija u krvi u zavisnosti od postignutog SVR (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Razlike u preterapijskim vrednostima relevantnih laboratorijskih parametara (hematološki i biohemijski) pacijenata sa postignutim SVR u odnosu na pacijente sa terapijskim neuspehom

<b>Varijable</b>	<b>SVR</b>	<b>terapijski neuspeh</b>	<b>p</b>
<b>Hematološki parametri (<math>\bar{x}\pm SD</math>)</b>			
Le ( $\times 10^3$ ćel/ $\mu$ L)	6,86 $\pm$ 1,8	6,82 $\pm$ 2,2	0,867
Er ( $\times 10^6$ ćel/ $\mu$ L)	4,6 $\pm$ 0,6	4,37 $\pm$ 0,5	0,620
Hgb (g/L)	144,7 $\pm$ 18,8	144,5 $\pm$ 14	0,934
Thr ( $\times 10^3$ ćel/ $\mu$ L)	195,58 $\pm$ 58,8	179,5 $\pm$ 59	0,02
<100 $\times 10^3$ Thr, n (%)	5 (2,4%)	5 (4,3%)	0,337
<b>Biohemijski parametri (<math>\bar{x}\pm SD</math>)</b>			
AST (U/L)	64,87 $\pm$ 45,7	70,1 $\pm$ 43	0,311
ALT (U/L)	114,7 $\pm$ 88,76	103,7 $\pm$ 69,2	0,252
AST/ALT>1, n (%)	12 (5,7%)	14 (12,1%)	0,044
ALT>3X, n (%)	48 (23%)	25 (21,6%)	0,77
uk.bilirubin ( $\mu$ mol/L)	11,89 $\pm$ 5,24	12 $\pm$ 4,33	0,854
GGT (U/L)	59,64 $\pm$ 58,78	76 $\pm$ 78	0,158
albumin (g/L)	36,8 $\pm$ 9,6	35,6 $\pm$ 9,4	0,364
uk.proteini (g/L)	76,5 $\pm$ 9,7	79,8 $\pm$ 14,9	0,107
Cho (mmol/L)	5,27 $\pm$ 2,1	5,5 $\pm$ 2	0,406
Tg (mmol/L)	2,56 $\pm$ 1,1	2,6 $\pm$ 1,1	0,66
glikemija ( $\mu$ mol/L)	5,68 $\pm$ 1,54	6,12 $\pm$ 1,66	0,028
urea ( $\mu$ mol/L)	5,7 $\pm$ 3,6	5,7 $\pm$ 2,5	0,914
kreatinin (mmol/L)	71,1 $\pm$ 16	71,9 $\pm$ 15,9	0,672
PT <sup>1</sup> (%)	85 $\pm$ 14,9	82,6 $\pm$ 13,4	0,183
AFP <sup>2</sup> ( $\mu$ mol/L)	5,86 $\pm$ 4,78	7,88 $\pm$ 6,32	0,01

<sup>1</sup>protrombinsko vreme

<sup>2</sup> AFP normalni opseg 1,08-8,04  $\mu$ g/L (CMIA)

Ispitan je uticaj terapijskih faktora na postizanje SVR (**Tabela 5.**), pri čemu pokazano da je nedetektibilna viremija na kraju terapije (ETR) bila značajno zastupljenija kod pacijenata sa postignutim SVR (92,8% vs. 66,4%,  $p < 0,001$ ).

Nije pokazana statistički značajna razlika između ove dve grupe pacijenata kada su u pitanju prekidi terapije, redukcije doze lekova i brojnosti neželjenih efekata ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Zastupljenost ETR i terapijski-zavisnih varijabli kod pacijenata sa postignutim SVR u odnosu na pacijente sa terapijskim neuspehom

Varijable, n(%)	SVR	terapijski neuspeh	p
ETR	194 (92,8%)	77 (66,4%)	<i>&lt;0,001</i>
>2 prekida terapije	4 (1,9%)	3 (2,6%)	0,703
redukcija doze IFN	143 (69,4%)	87 (75,7%)	0,248
redukcija doze RBV	46 (22%)	24 (20,7%)	0,888
>2 neželjena efekta	142 (67,9%)	81 (69,8%)	0,803



### 4.3.3. Nezavisni prediktori SVR

U cilju otkrivanja nezavisnih prediktora postizanja SVR, univarijantnom logističkom analizom je testirano 12 mogućih nezavisnih prediktora (**Tabela 6.**), pri čemu je statistička značajnost pokazana kod 5 prediktora, koji su potom retestirani multivarijantnom logističkom regresijom. Pokazano je da su starost<40 godina, intravenska upotreba narkotika kao rizik za HCV infekciju, non-G1 infekcija, niži METAVIR skorovi i postignut ETR bili u statistički značajnoj vezi sa postizanjem SVR.

**Tabela 6.** Univarijantna analiza nezavisnih prediktora SVR

Variable	n (%)	univarijantna OR (95% CI)	p
muški pol	118 (56,5%)	1,389 (0,881-2,119)	0,157
starost<40 godina	79 (37,8%)	3,309 (1,860-5,881)	<0,001
BMI>27	28 (14,8%)	1,217 (0,601-2,461)	0,585
PWID	45 (21,5%)	1,999 (1,045-3,825)	0,036
trajanje infekcije <5 god	150 (71,8%)	1,050 (0,639-1,730)	0,836
non G1	100 (47,8%)	3,339 (1,987-5,612)	<0,001
preterapijski HCV RNK<800 000 IU/ml	92 (45,3%)	1,008 (0,635-1,600)	0,974
METAVIR F2-F3	146 (73,7%)	2,217 (1,340-3,665)	0,002
steatoza jetre	54 (27,4%)	0,831 (0,500-1,380)	0,514
preterapijski Thr<100 (x10 <sup>3</sup> ćel/μL)	5 (2,4%)	0,544 (0,154-1,920)	0,337
preterapijski ALT>3x	48 (23%)	1,085 (0,628-1,876)	0,89
ETR	184 (92,8%)	6,550 (3,415-12,560)	<0,001

Multivarijantna regresija (**Tabela 7.**) je pokazala da su nezavisni prediktori SVR bili: postizanje ETR (OR=7,235; 95%CI=3,480-15,042; p<0,001), starost<40 godina (OR=3,357; 95%CI=1,536-7,334; p=0,002), infekcija non-G1 HCV (OR=3,005; 95%CI=1,601-5,640; p=0,001) i odsustvo ciroze tj. METAVIR skor F2-F3 (OR=1,795; 95%CI= 1,010-3,191; p=0,046)

Nije pokazan statistički značajan uticaj određenih faktora vezanih za same pacijente (pol, način sticanja infekcije, gojaznost, steatoza jetre), dužinu trajanja infekcije, i laboratorijske parametre (bazalna viremija, preterapijska teška trombocitopenija i visoka aktivnost ALT) ( $p>0.05$ ) (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Multivarijantna analiza nezavisnih prediktora SVR

Variable	n (%)	multivarijantna OR (95% CI)	p
starost<40 godina	79 (37,8%)	3,357 (1,536-7,334)	0,002
PWID	45 (21,5%)	0,647 (0,277-1,507)	0,312
non G1	100 (47,8%)	3,005 (1,601-5,640)	0,001
METAVIR F2-F3	146 (73,7%)	1,795 (1,010-3,191)	0,046
ETR	184 (92,8%)	7,235 (3,480-15,042)	<0,001

#### 4.3.4. SVR i polimorfizmi UGT1A1 gena

Kod 42 pacijenata, koji su postigli SVR, analizirano je prisustvo različitih polimorfizama UGT1A1 gena, sa posebnim osvrtom na prisustvo *UGT1A1*\*28 genotipa.

Analizom relevantnih preterapijskih karakteristika pacijenata-markera vezanih za HCV infekciju (viremija, genotip, stepen fibroze jetre) i vrednosti osnovnih biohemijskih parametara, pokazano je da su pacijenti sa *UGT1A1*\*28 genotipom imali statistički značajno više vrednosti ukupnog bilirubina ( $p<0,001$ ) i niže vrednosti feritina ( $p<0,05$ ) (**Tabela 8**).

Daljom analizom je utvrđeno da je hiperbilirubinemija sa vrednostima ukupnog bilirubina većim od 17  $\mu\text{mol/L}$  zabeležena značajno češće kod pacijenata sa *UGT1A1*\*28 genotipom (kod 60% tj.  $n=6$ ) u odnosu na 6,3% ( $n=2$ ) pacijenata koji su bili heterozigoti za ovaj alel ( $p=0,001$ ). Regresionom analizom je pokazano da postoji statistički značajna regresiona korelacija između vrednosti ukupnog bilirubina i feritina sa prisustvom *UGT1A1*\*28 genotipa ( $p<0,05$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova HCV, vrednostima METAVIR skora,

bazalne viremije i drugih ispitivanih biohemijskih parametara kod pacijenata u zavisnosti od prisustva *UGT1A1*\*28 genotipa ( $p>0,05$ ) (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Razlike u relevantnim preterapijskim parametrima pacijenata sa SVR (n=42) u zavisnosti od prisustva *UGT1A1*\*28 genotipa

Varijable	<i>UGT1A1</i> *28 genotip	heterozigoti	p
<b>genotip HCV</b>			
G 1	6 (60%)	22 (68,8%)	0,856
G 2	1 (10%)	2 (6,3%)	
G3 3	3 (30%)	8 (25%)	
<b>Bazalna viremija HCV RNK (IU/ml)</b>			
<800 000	3 (30%)	11 (34,4%)	0,798
>800 000	7 (70%)	21 (65,6%)	
<b>Stepen fibroze jetre (METAVIR)</b>			
F2	5 (50%)	13 (40,6%)	0,501
F3	1 (10%)	9 (28,1%)	
F4	4 (40%)	10 (31,3%)	
<b>Preterapijski biohemijski parametri</b>			
AST (U/L)	71,5 ± 57	65,4±38,4	0,703
ALT (U/L)	172,7±102	114,5±93	0,174
GGT (U/L)	58,7±69	67,3±70,9	0,796
albumin (g/L)	38±9,3	40±7,72	0,339
ukupni proteini (g/L)	71,7±7,5	72,6±9,09	0,598
ferritin (µg/ml)	66,1±63,2	184,09±163,3	0,032
ukupan bilirubin (µmol/L)	19,5±7	10,98±5,2	0,001

#### 4.4. Period praćenja

Nakon 6 meseci od završetka terapije i procene postignutog terapijskog uspeha (SVR), nastavljeno je praćenje pacijenata, koje je u proseku iznosilo za celu kohortu  $60,9 \pm 37,6$  meseci (u intervalu od najkraćeg perioda 9 meseci, pa do maksimalnih 13 godina nakon SVR).

##### 4.4.1. Virusološki ishod

Tokom perioda praćenja je zabeležena detektibilna viremija kod 14 pacijenata (14/209 tj. kod 6,7% pacijenata koji su postigli SVR, odnosno 14/325 tj. kod 4,3% pacijenata u odnosu na čitavu kohortu), koji su smatrani za kasne relapsere.

Analizom preterapijskih karakteristika pacijenata (**Tabela 9.**), uočeno je da je u grupi kasnih relapsa postojala predominacija pacijenata sa cirozom i to kod 38,5% , u odnosu na 25,4% pacijenata sa stabilnim SVR ( $p=0,023$ ) i sa visokom bazalnom viremijom  $>800\ 000$  IU/ml (71,4% vs. 45% u grupi stabilnog SVR,  $p<0,05$ ). Među kasnim relapsima je primećena najmanja zastupljenost osoba iz PWID populacije (svega 7,1%), a najčešći rizik za HCV infekciju je bila primena transfuzija (kod 50% pacijenata,  $p=0,048$ ).

Nije bilo statistički značajne razlike u polnoj i starosnoj strukturi pacijenata sa stabilnim SVR i kasnih relapsa, niti je pokazano da postoji značajna razlika u zastupljenosti posmatranih varijabli vezanih za same pacijente (visok BMI, prisustvo steatoze, konzumiranje alkohola) i HCV infekciju (dužina trajanja infekcije, genotip HCV, prosečna bazalna viremija) ( $p>0,05$ ).

Analizom učestalosti različitih alela IL28B (**Tabela 9.**), pokazano je da je među pacijentima, koji su ostvarili stabilan SVR bila značajno veća zastupljenost povoljnog genotipa CCrs12979860 (82,1% vs. 42,9% kod kasnih relapsa,  $p=0,009$ ), dok je u grupi kasnih relapsa bio zastupljeniji TT rs12979860 genotip (21,4 vs. 10,7% pacijenata sa stabilnim SVR,  $p=0,025$ ).

Osim razlika u zastupljenosti ova dva alela polimorfizma rs12979860, nije registrovana statistički značajna razlika u zastupljenosti drugih polimorfizama, kao što su GGr8099917, TTr8099917 i AArs12980275 ( $p>0,05$ ). Takođe nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti *UGT1A1*\*28 genotipa među pacijentima iz ove dve grupe ( $p=0,746$ ).

**Tabela 9.** Preterapijske karakteristike pacijenata, koji su postigli stabilan SVR i kasnih relapsa

Varijable	stabilan SVR (n=195)	kasni virusološki relaps (n=14)	p
<b>Pol (n,%)</b>			
Muški	112 (57,4%)	6 (42,9%)	0,288
Ženski	83 (42,6%)	8 (57,1%)	
<b>Starost (<math>\bar{x}\pm SD</math>) godine</b>	43.2 $\pm$ 11.3	43,1 $\pm$ 9,4	0,991
<b>godine (Medijana) godine</b>	43	42	
<b>Starosne kategorije (n,%)</b>			
<39 godina	73 (37,4%)	6 (42,9%)	0,686
$\geq$ 40 godina	122 (62,6%)	8 (57,1%)	
<b>BMI&gt;27, n (%)</b>	26 (13,3%)	2 (14,3%)	0,852
<b>Put sticanja HCV infekcije, n (%)</b>			
PWID	43 (22,1%)	1 (7,1%)	0,048
transfuzije	60 (30,8%)	7 (50%)	
operacije/intervencije	26 (13,3%)	2 (4,3%)	
profesionalna eksponiranost	3 (1,5%)	1 (7,1%)	
nepoznati	63 (32,3%)	3 (21,4%)	
<b>Konsumiranje alkohola, n (%)</b>	23 (11,8%)	2 (14,3%)	0,677
<b>Dužina trajanja infekcije (<math>\bar{x}\pm SD</math>)</b>	2,6 $\pm$ 0,89	3,5 $\pm$ 0,3	0,401
<5 godina, n(%)	139 (71,3%)	12 (85,7%)	0,244
>5 godina, n(%)	56 (28,7%)	2 (14,3%)	
<b>Stepen fibroze jetre</b>			
ciroza n (%)	47 (25,4%)	5 (38,5%)	
METAVIR 2/3 n (%)	138 (74,6%)	8 (61,5%)	0,023
<b>Pristustvo steatoze, n (%)</b>	50 (27,2%)	4 (30,8%)	0,779
<b>Genotip HCV, n (%)</b>			
G1	102 (52,3%)	7 (50%)	0,867
non-G1	93 (47,7 %)	7 (50%)	
<b>Bazalna viremija, n (%)</b>			
HCV RNK >800 000 IU/ml	85 (45%)	10 (71,4%)	0,05
HCV RNK <800 000 IU/ml	104 (55%)	4 (28,6%)	
log10 HCV RNK IU/ml Medijana	5,9	6,15	0,734
<b>polimorfizmi IL-28B<sup>1</sup> n (%)</b>			
CCrs12979860	23 (82,1%)	6 (42,9%)	0,009
TTrs12979860	3 (10,7%)	3 (21,4%)	0,025
GG rs8099917	3 (10,7%)	2 (14,3%)	0,736
TT rs8099917	4 (14,3%)	0 (0%)	0,137
AArs12980275	4 (14,3%)	2 (14,3%)	0,986
<b>polimorfizmi UGT1A1<sup>1</sup> n (%)</b>			
UGT1A1*28 genotip	6 (22,2%)	4 (26,7%)	0,746

<sup>1</sup> polimorfizmi IL28B i UGT1A1 su određivani kod ukupno 42 pacijenata sa SVR (28 pacijenata sa stabilnim SVR i 14 kasnih relapsa)

Multivarijantnom Coxovom regresionom analizom preterapijskih karakteristika pacijenata (**Tabela 10.**) pokazana je statistički značajna negativna povezanost CCrs12979860 genotipa sa pojavom kasnog virusološkog relapsa ( $\beta=-1,380$ ,  $p=0,013$ ). Drugi preterapijski parametri, kao što su muški pol, starost, gojaznost, upotreba intravenskih narkotika, dužina trajanja infekcije, genotip HCV, prisustvo ciroze, steatoze i vrednosti trombocita i ALT, nisu imali statistički značajnog uticaja na nastanak kasnog virusološkog relapsa (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Multivarijantna Cox regresija preterapijskih faktora rizika za nastanak kasnog virusološkog relapsa

preterapijske varijable	beta	HR	95%CI	p
muški pol	-0,582	0,765	0,265-2,211	0,621
starost>40 godina	0,604	1,830	0,624-5,365	0,271
BMI>27	-0,550	0,577	0,123-2,708	0,486
PWID	0,945	2,572	0,334-19,798	0,364
trajanje infekcije >5 god	-0,883	1,578	0,349-7,133	0,554
genotip 1 HCV	0,384	1,469	0,510-4,226	0,476
preterapijski HCV RNK>800,000	-1,009	0,366	0,114-1,182	0,093
ciroza	0,241	1,273	0,392-4,130	0,231
steatoza	-0,011	0,389	0,304-3,218	0,985
preterapijski Thr<100 (x10 <sup>3</sup> ćel/μL)	3,034	37,820	0,000-5,451	0,841
preterapijski ALT>3x	-0,209	0,811	0,177-3,724	0,788
CCrs12979860	-1,814	0,522	0,278-0,979	0,013
TTrs12979860	0,821	2	0,462-8,664	0,358
GGr8099917	-0,329	1,333	0,251-7,084	0,737
TTrs8099917	20,64	1,167	1,003-1,357	0,999
AArs12980275	0,423	1	0,208-4,814	0,968
UGT1A1*28	-0,027	0,974	0,365-2,594	0,957

Non- CC genotip je bio prevalentniji kod pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom i to kod 8 (61,5%) vs. 6 (20,7%) sa CCrs12979860 genotipom ( $p=0,015$ ), sa relativnim rizikom za

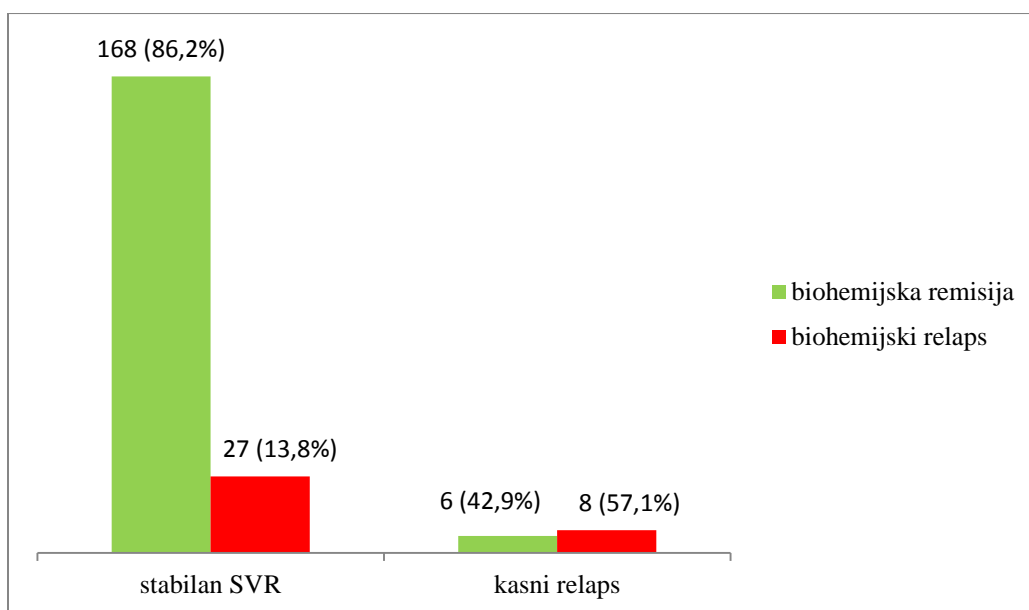
kasni virusološki relaps, koji je bio 6 puta veći u odnosu na povoljniji CC genotip (RR=3,2; 95% CI=1,278-7,982 vs. RR=0,522; 95% CI= 0,278-0,979).

#### 4.4.2. Biohemijski ishod

Kako bi se procenio biohemijski ishod kod pacijenata sa postignutim SVR, svi pacijenti u ovoj grupi (n=209) su imali bar dve ili više hematoloških i biohemijskih evaluacija, tokom perioda praćenja. Najveći broj pacijenata iz ove grupe (73,6%) je imalo kontinuitet u praćenju biohemijskih parametara od  $\geq 5$  godina, sa rutinskim laboratorijskim evaluacijama od bar 2 puta godišnje.

Tokom perioda praćenja je kod 174 (83,3%) pacijenata ostvaren i povoljan biohemijski ishod (biohemijska remisija), dok je nepovoljan biohemijski ishod (biohemijski relaps) sa porastom vrednosti enzima jetre zabeležen kod 35 (16,7%) pacijenata, koji su ostvarili SVR.

Daljom analizom (**Grafik 3.**) je pokazano da je biohemijski relaps bio značajno češći kod pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom u odnosu na pacijente sa stabilnim SVR (57,1% vs.13,8%,  $p < 0,000$ ).



**Grafik 3.** Biohemijski ishodi kod pacijenata u zavisnosti od virusološkog ishoda

Univarijantnom logističkom regresijom je analiziran biohemijski ishod, kao mogući prediktor kasnog virusološkog relapsa, ali nije pokazana statistički značajna korelacija (OR= 1,389 za 95%CI=0,367-5,261; p=0,629).

Analizom prosečnih vrednosti relevantnih biohemijskih parametara, između pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom i stabilnim SVR (**Tabela 11.**), pokazano je da su preterapijske vrednosti ukupnog bilirubina (15,8±9,6 vs. 11,6±4,8, p=0,01) i AFP (8,7±10,6 vs. 5,39±3,1, p=0,014) bile značajno više kod pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom.

Takođe je pokazano da su i tokom perioda praćenja poređenjem vrednosti hepatograma između pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom i stabilnim SVR, prosečne vrednosti AST (44,7±32,8 vs. 29,2±22,8), ALT (52,35±40,3 vs. 28,56±22,6) i ukupnog bilirubina (12,58 ±4,74 vs. 8,86±3) bile statistički značajno više u grupi pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom (**Tabela 11.**).

**Tabela 11.** Prosečne vrednosti relevantnih biohemijskih parametara preterapijski i tokom perioda praćenja (tj.vrednosti hepatograma prilikom poslednje laboratorijske kontrole) kod pacijenata sa stabilnim SVR i kasnim virusološkim relapsom

Variable	preterapijski			praćenje		
	stabilan SVR	kasni relaps	p <sup>1</sup>	stabilan SVR	kasni relaps	p <sup>1</sup>
AST (IU/ml)	66±46,8	51±21,16	0,234	29,2±22,8	44,7±32,8	0,019
ALT (IU/ml)	116,7±90,4	92,6±59	0,328	28,56±22,6	52,35±40,3	0,001
GGT (IU/ml)	56,7±52	96,5±20	0,108	43±5,9	43,1±17	0,108
uk. bilirubin (µmol/L)	11,6±4,8	15,8±9,6	0,01	8,86±3	12,58±4,74	0,016
AFP (µmol/L)	5,39±3,1	8,7±10,6	0,014	14,37±109	14,6±25	0,994

<sup>1</sup>verovatnoća je ispitivana između dve kategorije pacijenata- pacijenata sa stabilnim SVR vs. kasnim relapsom, a presek je bio preterapijski (bazalne vrednosti) i period praćenja (poslednja lab. kontrola tokom perioda praćenja)



Kada je posebno, tj. samo u grupi kasnih relapsa, analizirana dinamika (preterapijske u odnosu na vrednosti prilikom poslednje laboratorijske kontrole tokom perioda praćenja, **Tabela 11.**) relevantnih biohemijskih parametara hepatograma, uočen je trend statistički značajne redukcije u vrednostima ALT ( $92,64 \pm 59$  vs.  $52,35 \pm 40,3$ ,  $p=0,045$ ) i GGT ( $96,5 \pm 20$  vs.  $43,1 \pm 17$ ,  $p=0,008$ ).

Nije bilo statistički značajne razlike u prosečnim vrednostima AST, bilirubina niti AFP preterapijski i tokom perioda praćenja među kasnim relapserima ( $p>0,05$ ).

#### **4.4.3. Progresija fibroze**

Biopsija jetre je preterapijski sprovedena kod 308 pacijenata (94,7%) iz čitave kohorte, a od toga kod 198 pacijenata (94,7%) iz grupe koja je postigla SVR. Tokom perioda praćenja korišćena je neinvazivna metoda elastografije jetre (Fibroscan) kod 159 pacijenata (76%) sa postignutim SVR bar jedanput. Prosečna vrednost elastografije za ove pacijente, tokom perioda praćenja, je iznosila  $7,95 \pm 3,9$  kPa.

Kada su pacijenti stratifikovani, prema virusološkom ishodu, pokazano je da su prosečne vrednosti elastografije jetre tokom perioda praćenja bile značajno više u grupi kasnih relapsa ( $13,6 \pm 3,2$  kPa, medijana 10,6 kPa, za IQR 6,6-16,65) u odnosu na pacijente sa stabilnim SVR ( $7,4 \pm 0,1$  kPa, medijana 7,1 kPa, za IQR 6,2-8,6), što je potvrđeno na nivou statističke značajnosti ( $p<0,001$ ).

Kada je u pitanju dinamika fibroze, tokom perioda praćenja među pacijentima sa SVR 132 pacijenata (90,4%) je imalo nalaz elastografije koji je odgovarao preterapijskom skorcu fibroze dobijenom biopsijom jetre, dok je kod 6 (4,1%) konstatovana progresija skora fibroze, a kod 8 (5,5%) regresija skora fibroze ( $p<0,001$ ).

Od toga, je nakon stratifikacije prema virusološkom ishodu, pokazano da je u grupi pacijenata sa stabilnim SVR, dinamika fibroze imala značajno povoljniji ishod ( $p<0,001$ ), tj. da se jedino u ovoj grupi i beleže slučajevi pacijenata sa regresijom fibroze (8 pacijenata tj. 6%),

dok je najveći broj 125 pacijenata (94%) imalo nepromenjen nalaz fibroza skora u odnosu na preterapijski (**Tabela 12**).

**Tabela 12.** Procenjena dinamika fibroze kod pacijenata sa stabilnim SVR i kasnim virusološkim relapsom (Fibroscan)

<b>dinamika fibroze</b>	stabilan SVR	kasni relaps	p
nepromenjen	125 (94%)	7 (53,8%)	<0,001
progresija fibroze	0	6 (46,2%)	
regresija fibroze	8 (6%)	0	

Među pacijentima sa regresijom fibroze svi su imali regresiju fibroza skora sa F3 do F2. Svi pacijenti kod kojih je konstatovana progresija fibroze (ukupno šestoro, tj. 46,2% u ovoj podgrupi), su bili u grupi kasnih relapsa, pri čemu je kod 5 pacijenata došlo do progresije iz F3 u F4, a kod jednog pacijenta iz F2 u F3.

Daljom analizom dinamike fibroze kod pacijenata u zavisnosti od biohemijskog ishoda, utvrđeno je da je kod svih pacijenata sa progresijom fibroze, ujedno došlo i do nepovoljnog biohemijskog ishoda, dok je kod svih pacijenata sa povoljnim biohemijskim ishodom registrovan stacionaran nalaz ili regresija fibroze.

Multivarijantnom Coxovom regresionom analizom preterapijskih varijabli (**Tabela 13**) pokazana je statistički značajna povezanost između progresije fibroze i prisustva preterapijske ciroze ( $\beta=0,826$ , HR 2,285 za 95% CI=1,323-3,947;  $p=0,003$ ), kao i genotipom 1 ( $\beta=0,435$ , HR 2,145, za 95% CI=1,961-2,486;  $p=0,048$ ).

Ostale ispitivane preterapijske karakteristike pacijenata, nisu bile statistički značajno povezane sa nastankom progresije fibroze ( $p>0,05$ ).

U periodu praćenja, analizirana je i povezanost pojave kasnog virusološkog i biohemijskog relapsa, ali nije pokazana statistički značajna prediktivna vrednost ovih parametara kada je reč o proceni progresije fibroze ( $p>0,05$ ).

**Tabela 13.** Multivarijantna Cox regresija preterapijskih varijabli i parametara tokom perioda praćenja kao faktora rizika za nastanak progresije fibroze

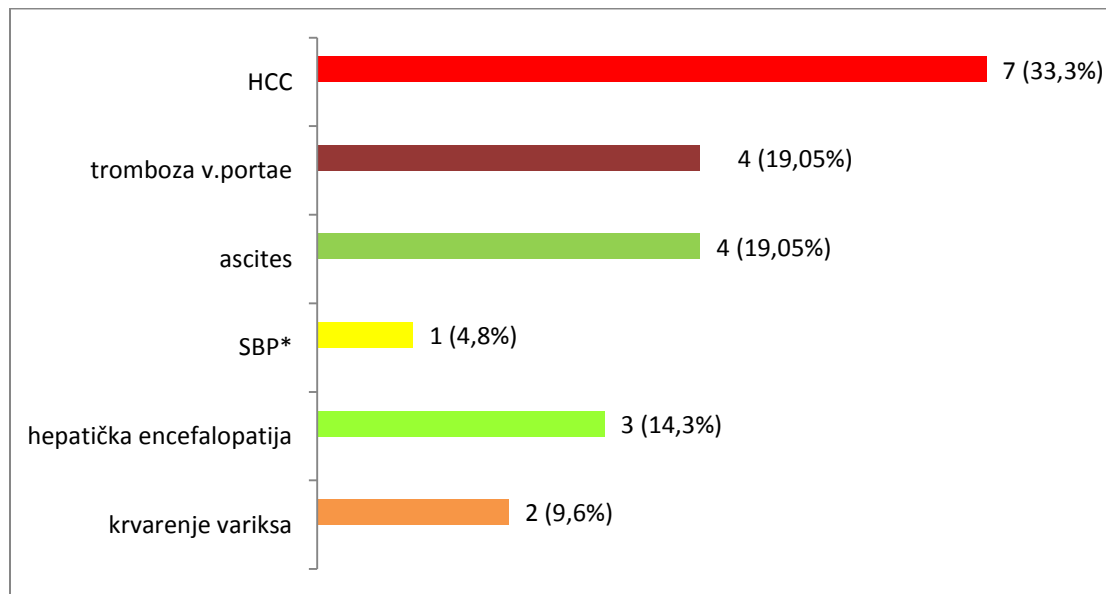
<b>preterapijske varijable</b>	$\beta$	HR	95%CI	p
muški pol	-0,143	0,867	0,542-1,388	0,552
starost>40 godina	-0,049	0,952	0,540-1,679	0,952
BMI>27	-0,539	0,584	0,255-1,334	0,202
PWID	-0,277	0,758	0,400-1,436	0,396
trajanje infekcije >5 god	-0,187	0,829	0,520-1,3232	0,433
genotip 1 HCV	0,435	2,145	1,961-2,486	0,048
preterapijski HCV RNK>800 000 IU/ml	0,064	1,068	0,685-1,660	0,775
ciroza	0,826	2,285	1,323-3,947	0,003
steatoza	0,463	1,590	0,822-3,074	0,168
preterapijski Thr<100 (x10 <sup>3</sup> ćel/μL)	0,523	0,593	0,119-2,947	0,523
preterapijski ALT>3x	-0,555	0,574	0,300-1,099	0,094
CCrs12979860	-1,354	0,258	0,033-2,023	0,197
TTrs12979860	1,172	3,227	0,423-24,623	0,258
UGT1A1*28	0,233	1,262	0,220-7,240	0,794
<b>period praćenja</b>				
kasni virusološki relaps	0,434	1,544	0,591-4,036	0,376
biohemijski relaps	0,420	1,522	0,826-2,806	0,178

#### 4.4.4. Klinički ishodi

Tokom perioda praćenja, kod pacijenata koji su postigli SVR zabeležen je ukupno 21 neželjeni klinički ishod, i to kod 13 pacijenata (6,2%), dok kod 196 pacijenata (93,8%) nije bilo neželjenih kliničkih ishoda.

Opservirani neželjeni klinički ishodi su bili dominantno pojava HCC (7 događaja, tj. trećina neželjenih ishoda,  $p < 0,05$ ), ali su zabeleženi i drugi ređe zastupljeni neželjeni ishodi (**Grafikon 4**). Svi pacijenti sa trombozom vene porte ( $n=4$ ) su imali konkomitantno i HCC.

Najređe opservirani neželjeni klinički ishodi su bili spontani bakterijski peritonitis kod jednog pacijenta sa ascitesom (sa izolacijom *E.coli* u kulturi ascitesa) i krvarenja iz variksa jednjaka kod dva pacijenta.



\*SBP-spontani bakterijski peritonitis

**Grafikon 4.** Opservirani neželjeni klinički ishodi tokom perioda praćenja kod pacijenata sa postignutim SVR

U grupi pacijenata koji su ostvarili SVR, tokom perioda praćenja dijagnostikovano je HCC kod 7 pacijenata (3,3%). Nije pokazana statistički značajna razlika u broju novootkrivenih slučajeva HCC u zavisnosti od virusološkog ishoda ( $p=0,414$ ), mada je u grupi kasnih relapsa zabeležen jedan slučaj HCC 1/14 (tj. 7,1% u ovoj kategoriji pacijenata), dok je u grupi stabilnih SVR bilo 6/195 (3,1%) slučajeva HCC.

Analizom mogućih prediktora za nastanak HCC uz pomoć multivarijantne Cox regresione analize preterapijskih varijabli (**Tabela 14.**) pokazana je statistički značajna povezanost sa bazalnim vrednostima tumorskog markera AFP ( $\beta=0,097$ , HR=1,101 za 95%CI=1,043-1,163;  $p=0,001$ ).

Iako su prisustvo ciroze, konzumiranje alkohola, dužina trajanja infekcije pre početka terapije, muški pol i prisustvo *UGT1A1*\*28 genotipa imali najviše vrednosti HR za nastanak HCC, njihova prediktorna moć na nivou ispitivane statističke značajnosti nije dokazana ( $p>0,05$ ).

Od varijabli koje su analizirane tokom perioda praćenja (**Tabela 14.**), pokazano je da postoji statistički značajna povezanost između prosečnih merenih vrednosti AFP ( $\beta=0,004$ , HR=1,004 za 95%CI=1,002-1,007;  $p<0,001$ ), porasta AFP ( $\beta=3,215$ , HR=24,901, 95%CI=2,966-209,057;  $p=0,003$ ) kao i biohemijskog relapsa ( $\beta=1,649$ , HR=5,204, 95%CI=1,160-23,341;  $p=0,031$ ) sa pojavom HCC.

**Tabela 14.** Multivarijantna Cox-ova regresiona analiza mogućih prediktora HCC (preterapijske varijable i parametri analizirani tokom perioda praćenja)

<b>preterapijske varijable</b>	$\beta$	HR	95%CI	p
muški pol	0,915	2,497	0,483-12,924	0,275
uzrast	0,087	1,091	0,988-1,204	0,084
BMI>27	0,233	1,249	0,149-10,468	0,837
posttransfuzijski	-0,214	0,807	0,180-3,625	0,780
PWID	-3,270	0,038	0,000-347,94	0,482
trajanje infekcije (god)	0,116	1,123	0,961-1,313	0,145
trajanje infekcije >5 god	1,004	2,730	0,603-12,370	0,193
genotip 1 HCV	-0,163	0,849	0,188-3,828	0,832
preterapijski HCV RNK>800 000 IU/ml	0,224	1,251	0,278-5,633	0,771
ciroza (METAVIR 4)	0,903	2,466	0,540-11,254	0,244
steatoza	0,758	2,135	0,249-18,289	0,489
konzumiranje alkohola	1,215	3,372	0,645-17,620	0,150
preterapijski AFP	0,097	1,101	1,043-1,163	0,001
CC <sub>rs12979860</sub>	-4,504	0,011	0,000-14,304	0,590
UGT1A1*28	5,601	2,701	0,000-3,804	0,594
<b>period praćenja</b>				
kasni virusološki relaps	0,007	1,007	0,118-8,574	0,995
biohemijski relaps	1,649	5,204	1,160-23,341	0,031
progresija fibroze	0,794	2,212	0,241-20,302	0,483
AFP tokom praćenja	0,004	1,004	1,002-1,007	<0,001
porast AFP	3,215	24,901	2,966-209,057	0,003

\*AFP normalni opseg 1,08-8,04  $\mu\text{g/L}$  (CMIA)

#### 4.4.5. Smrtni ishod

##### 4.4.5.1. Cela kohorta

U celoj kohorti pacijenata (n=325) tokom perioda praćenja, zabeleženo je ukupno 24/325 smrtnih ishoda (7,4%). Kod 19 pacijenata (79,2%) uzrok smrti je bio primarno hepatološki, dok su drugi uzroci smrti zabeleženi kod petoro pacijenata (20,8%)- od toga kod dvoje komplikacije kardiovaskularnih insulta (2/5) i kod troje pacijenata (3/5) nepoznat uzrok smrti,  $p < 0,001$ .

Analizom, preterapijskih varijabli (**Tabela 15.**) u čitavoj kohorti, između pacijenata kod kojih je došlo do smrtnog ishoda i preživelih, uočeno je da su preminuli pacijenti bili značajno stariji ( $49,7 \pm 9$  godina vs. preživeli  $45 \pm 11,3$  godina,  $p = 0,05$ ) uz predominaciju starosne kategorije preko 40 godina (21/24 tj. 87,5% u odnosu na preživele 207/301 tj. 68,8%,  $p = 0,048$ ).

Među preminulim pacijentima značajno su bili zastupljeniji pacijenti sa preterapijskom cirozom (14/24 tj. 58,3% vs. 83/301 tj. 30,1%,  $p = 0,005$ ) i komorbiditetima (58,3% vs. 36,2%,  $p = 0,047$ ).

Uvidom u relevantne preterapijske laboratorijske parametre koji su analizirani između ove dve grupe pacijenata pokazana je značajno zastupljenija teška trombocitopenija (3/24 tj. 12,5% vs. 7/301 tj. 2,3%,  $p = 0,005$ ) i više vrednosti AFP ( $9,8 \pm 7,2$  vs.  $6,3 \pm 5,2$ ,  $p = 0,05$ ), kod pacijenata sa smrtnim ishodom u odnosu na preživele.

Analizom drugih preterapijskih varijabli (**Tabela 15.**) nije pokazana statistički značajna razlika između ove dve grupe pacijenata ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 15.** Razlike u preterapijskim karakteristikama pacijenata sa smrtnim ishodom u odnosu na preživjele pacijente u čitavoj kohorti

<b>Varijable</b>	<b>umrli (n=24)</b>	<b>preživeli (n=301)</b>	<b>p</b>
<b>Pol, n (%)</b>			
Muški	15 (62,5%)	159 (52,8%)	0,360
Ženski	9 (37,5%)	142 (47,2%)	
<b>Starost, (<math>\bar{x}\pm SD</math>) godine</b>	49,7 $\pm$ 9	45 $\pm$ 11,3	0,05
<b>Starosne kategorije, n (%)</b>			
<39 god	3 (12,5%)	94 (31,2%)	0,048
$\geq$ 40 god	21 (87,%)	207 (68,8%)	
<b>Put sticanja HCV infekcije, n (%)</b>			
PWID	2 (8,3%)	57 (18,9%)	0,195
transfuzije	5 (20,8%)	10 (33,2%)	0,434
<b>Dužina trajanja infekcije (<math>\bar{x}\pm SD</math>) god</b>	4,3 $\pm$ 4,5	3,5 $\pm$ 4	0,339
>5 godina	8 (33,3%)	85 (28,2%)	0,595
<5 godina	16 (66,7%)	216 (71,8%)	
<b>Stepen fibroze jetre, n (%)</b>			
<b>ciroza</b>	14 (58,3%)	83 (30,1%)	0,005
<b>steatoza</b>	7 (29,2%)	82 (28,8%)	0,967
<b>BMI&gt;27, n (%)</b>	2 (10%)	39 (14,3%)	0,594
<b>konzumiranje alkohola, n (%)</b>	4 (16,7%)	37 (12,3%)	0,535
<b>komorbiditeti, n (%)</b> <sup>1</sup>	14 (58,3%)	109 (36,2%)	0,047
<b>Genotip HCV, n (%)</b>			
genotip 1 HCV	18 (75%)	182 (60,5%)	0,159
non-G1	6 (25%)	119 (39,5%)	
<b>Bazalna viremija (log<sub>10</sub> <math>\bar{x}\pm SD</math>)</b>	5,9 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,7	0,760
>800 000 IU/ml HCV RNK	11 (45,8%)	162 (55,5%)	0,361
<b>ALT&gt;3x, n (%)</b>	5 (20,8%)	68 (22,6%)	0,843
<b>Thr&lt;100 (x10<sup>3</sup>/ćel/<math>\mu</math>L), n (%)</b>	3 (12,5%)	7 (2,3%)	0,005
<b>AFP (<math>\bar{x}\pm SD</math> <math>\mu</math>mol/l)</b>	9,8 $\pm$ 7,2	6,3 $\pm$ 5,2	0,049

<sup>1</sup>komorbiditeti koji su bili poznati/uzeti u obzir kod pacijenata su bili-d.mellitus, hipertenzija, hiperlipidemija, kardiomiopatije



Multivarijantnom regresionom analizom u funkciji vremena (**Tabela 16.**) je pokazana i statistički značajna korelacija između starosti preko 40 godina ( $\beta=2,947$ , HR=0,053 za 95%CI=0,004-0,648;  $p=0,043$ ), ispitivanih komorbiditeta ( $\beta=0,824$ , HR=2,279 za 95%CI=1,011-5,144,  $p=0,047$ ), preterapijske trombocitopenije ( $\beta=1,589$ , HR=0,204, za 95%CI=0,047-0,897;  $p=0,035$ ) i vrednosti AFP ( $\beta=0,052$ , HR=1,054, za 95%CI=1,001-1,109;  $p=0,045$ ).

**Tabela 16.** Cox-ova regresiona analiza relevantnih preterapijskih varijabli sa smrtnim ishodom u celoj kohorti pacijenata

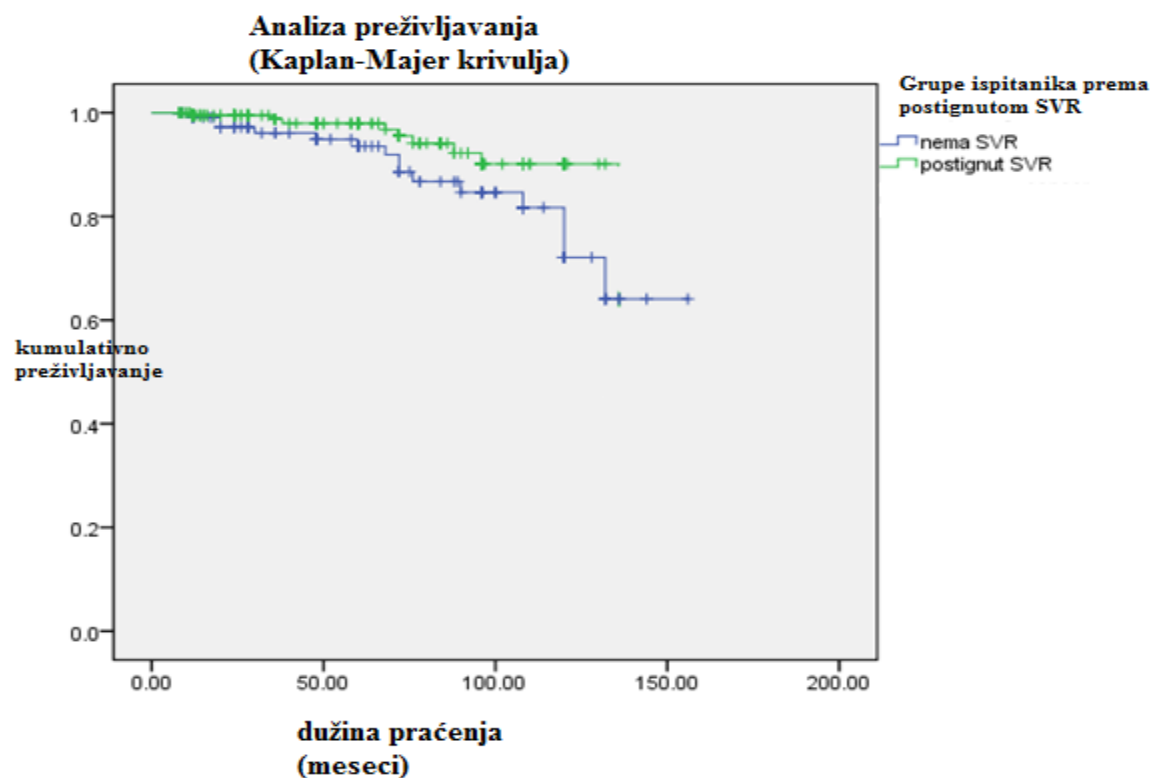
preterapijske varijable	$\beta$	HR	95%CI	p
muški pol	0,641	1,898	0,827-4,352	0,130
starost ( $\bar{x}\pm SD$ )	0,057	1,059	0,970-1,156	0,200
starost>40 godina	2,947	0,053	0,004-0,648	0,043
BMI>27	-0,261	0,770	0,177-3,345	0,727
PWID	-0,751	0,472	0,108-2,055	0,317
transfuzije	-0,796	0,451	0,166-1,223	0,118
trajanje infekcije ( $\bar{x}\pm SD$ )	0,086	1,090	0,918-1,294	0,326
trajanje infekcije >5 god	-0,576	0,562	0,106-2,991	0,499
komorbiditeti <sup>1</sup>	0,824	2,279	1,011-5,141	0,047
konzumiranje alkohola	0,533	1,705	0,578-5,028	0,334
genotip 1 HCV	0,327	1,387	0,549-3,537	0,489
preterapijski log HCV RNK IU/ml	0,144	1,155	0,576-2,316	0,684
HCV RNK>800 000 IU/ml	-0,266	0,798	0,355-1,793	0,584
ciroza	0,764	2,146	0,929-4,959	0,074
steatoza	0,212	1,236	0,511-2,990	0,639
preterapijski Thr<100 ( $10^3$ ćel/ $\mu$ L)	1,589	0,204	0,047-0,897	0,035
preterapijski ALT>3x	-0,155	0,857	0,283-2,594	0,784
albumin (g/L)	0,017	1,017	0,970-1,066	0,487
AFP( $\mu$ mol/L)	0,052	1,054	1,00-1,109	0,045

<sup>1</sup>komorbiditeti koji su bili poznati/uzeti u obzir kod pacijenata su bili-d.mellitus, hipertenzija, hiperlipidemija, kardiomiopatije

Daljom analizom čitave kohorte, a prema postignutom terapijskom učinku, uočeno je da su među preminulim pacijentima bili zastupljeniji pacijenti sa terapijskim neuspehom 15/24 (62,5%), u odnosu na pacijente sa ostvarenim SVR tj. 9/24 (37,5%),  $p=0,004$ .

Logističkom regresionom analizom je pokazano da je terapijski neuspeh bio u statistički značajnoj korelaciji sa smrtnim ishodom (HR=3,3 za 95% CI=1,396-7,802;  $p=0,007$ ). Analizom uzroka smrti u ove dve kategorije pacijenata, nije uočena statistički značajna razlika u zastupljenosti uzroka smrti, jer je primarno hepatološki uzrok smrti bio zabeležen kod 7/9 (77,8%) pacijenata sa SVR vs. 12/15 (80%) pacijenata koji su neuspešno lečeni,  $p>0,05$ .

Na **Grafiku 5.** prikazane su Kaplan Meier krivulje preživljavanja tj. kumulativni mortalitet u funkciji vremena praćenja pacijenata podeljenim u dve grupe, prema postignutom terapijskom odgovoru-pacijenata sa terapijskim neuspehom vs. pacijenata sa ostvarenim SVR



**Grafik 5.** Kaplan Majer krivulja preživljavanja pacijenata sa postignutim SVR i terapijskim neuspehom

#### 4.4.5.2. Pacijenti sa postignutim SVR

Kada je reč samo o pacijentima koji su postigli SVR (n=209), uočena je veća zastupljenost smrtnih ishoda u grupi pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom 1/14 (7,1%) u odnosu na grupu pacijenata sa stabilnim SVR 8/195 (4,1%), iako opservirana razlika u frekvenciji nije dostigla nivo statističke značajnosti (p=0,471).

Mada je relativni rizik za smrtni ishod bio gotovo dvostruko veći među kasnim relapsima (RR=1,709, 95%CI=0,209-15,491 vs. 0,951 95%CI=0,752-1,201), multivarijantna regresiona analiza (**Tabela 17.**) nije pokazala statistički značajnu razliku tj. povezanost kasnog virusološkog relapsa sa smrtnim ishodom (p=0,951).

Međutim, regresionom analizom u funkciji vremena ostalih praćenih ishoda (**Tabela 17.**) pokazano da je su biohemijski relaps ( $\beta=2,112$ , HR=8,266 za 95% CI= 2,062-33,131; p=0,003), pojava svih neželjenih kliničkih ishoda ( $\beta=3,487$ , HR=32,704 za 95% CI=6,710-159,385; p<0,0001), dijagnoza HCC ( $\beta=2,685$ , HR=14,655 za 95% CI=3,896-55,127; p<0,0001) i porast vrednosti AFP ( $\beta=3,354$ , HR=28,618 za 95% CI=3,417-239,697; p=0,002), bili statistički značajni prediktori smrtnog ishoda u grupi pacijenata sa postignutim SVR.

Drugi ishodi tokom perioda praćenja-kao što su pojava kasnog virusološkog relapsa (kao što je prethodno pomenuto), ali i progresija fibroze, nisu bili u statistički značajnoj korelaciji sa nastankom smrtnog ishoda (p>0,05).

**Tabela 17.** Cox-ova regresiona analiza svih ishoda tokom perioda praćenja u odnosu na smrtni ishod kod pacijenata sa postignutim SVR

period praćenja	$\beta$	HR	95%CI	p
kasni virusološki relaps	0,065	0,937	0,115-7,635	0,951
biohemijski relaps	2,112	8,266	2,062-33,131	0,003
progresija fibroze	0,636	1,889	0,222-16,047	0,560
svi neželjeni klinički ishodi	3,487	32,704	6,710-159,385	<0,0001
samo HCC	2,685	14,655	3,896-55,127	<0,0001
porast AFP	3,354	28,618	3,417-86,978	0,002

Među pacijentima sa postignutim SVR kod kojih je došlo do smrtnog ishoda, kod sedmero (77,8%) je uzrok smrti bio primarno vezan za jetrinu disfunkciju, dok je dvoje pacijenta (22,2%) preminulo od komplikacija kardiovaskularnih insulta.

Kod pacijenata sa hepatološkim uzrokom smrti (n=7), opservirano je da je najzastupljeniji uzrok smrti bio HCC (kod 5/7, tj. u 71,4%), pri čemu je jedan pacijent imao samo verifikovan HCC, jedan HCC i konkomitantno hepatičku encefalopatiju, a kod troje pacijenata sa HCC je zabeležena i konkomitantna tromboza v. portae.

Pored toga, dvoje pacijenata kod kojih je konstatovan hepatološki razlog smrti je imalo dekompenzaciju jetrine funkcije (u odsustvu HCC) i to jedan pacijent sa hepatičkom encefalopatijom, i jedan pacijent sa ascitesom.

## 5. DISKUSIJA

Epidemiologija hepatitis C virusne infekcije se značajno promenila za poslednje dve decenije, kako u svetu, tako i kod nas. Pojava novih puteva transmisije (i na sreću eradikacije drugih-kao što su pulovi krvi za transfuzije) i sve efikasnijih lekova, praćena je i novim izazovima-pitanjima reinfekcije, rezistencije i raspoloživosti novih terapijskih opcija u finansijski ograničenim sredinama.

Analiza preterapijskih karakteristika naših pacijenata, nije pokazala razlike u zastupljenosti polova (53,5% muškaraca vs. 46,5% žena,  $p=0,202$ ), među pacijentima sa HHC, mada se u mnogim epidemiološkim studijama beleži veća zastupljenost pacijenata muškog pola. U velikoj studiji Armstrong i autora u SAD, registrovana prevalencija HCV pozitivnosti je gotovo dvostruko veća kod muškaraca (2,1% u odnosu na 1,1% žena), mada postoji i mnoštvo autora koji nisu pokazali značajne razlike u polnoj distribuciji, kao što je slučaj kod naših pacijenata [185-187].

Međutim postoje i kontradiktorni rezultati, koji ukazuju na prevalenciju i veće rizike za HCV infekciju kod osoba ženskog pola u populaciji PWID, najverovatnije zbog češće zajedničke upotrebe pribora za intravensku primenu narkotika i nezaštićenih seksualnih odnosa sa partnerima iz iste populacije PWID [188,189].

Veoma heterogeni podaci vezano za različite delove sveta, a koji se odnose na populaciju PWID (slična je situacija kada je u pitanju epidemiologija HIV infekcije) uglavnom ukazuju na značaj uvođenja preventivnih programa (naročito među zatvorenima) i dodatne edukacije, ali postoje i značajne manjkavosti epidemioloških podataka o prevalenciji, naročito kada su u pitanju delovi Azije kao i istočne Evrope, odakle postoje vrlo ograničeni podaci, pa ove rezultate treba tumačiti sa rezervom [188,190].

Kada je reč o biološkim razlikama vezano za pol, iako nije pokazano da postoji razlika u prijemčivosti za sticanje HCV infekcije (osim u pomenutoj populaciji PWID), u mnogim studijama je pokazano da je ženski pol nezavisni prediktor spontane eliminacije akutne HCV

infekcije, bez obzira na način sticanja infekcije [191]. Čak su i rezultati prikupljeni u SAD u periodu od 1999. do 2002. godine nacionalnom zdravstvenom i nutritivnom anketom (National Health and Nutrition Examination Survey -NHANES) pokazali da je rizik za hronicitet HCV infekcije iznosio 89% kod muškaraca i 63,4% kod žena [185]. Pored toga, postoje i rezultati (najčešće iz prospektivnih studija praćenja isključivo ženskih kohorti pacijentkinja inficiranih nakon primene kontaminiranih derivata krvi), koji ukazuju na značajno sporiju progresiju fibroze, u odnosu na pacijente muškog pola [192].

Ipak, kako su ove razlike u progresiji bolesti vezane za protektivne efekte estrogena na jetru (pokazano je i da su ranije trudnoće i upotreba hormonske supstitucione terapije u vezi sa sporijom fibrogenezom), pomenute prednosti nestaju nakon nastupanja menopauze [193]. Kontradiktorni su i rezultati vezano za polne razlike u postizanju SVR u eri interferona, mada postoji konsenzus o značajno višim stopama SVR kod mlađih žena reproduktivne dobi (starosti do 40 godina), što je u vezi sa pomenutim protektivnim efektom estrogena [194].

Pored toga, u epidemiološkom smislu, polne razlike se često vezuju za veću izloženost faktorima rizika za inokulaciju, ali i upotrebi alkohola. U našoj zemlji, postoje veoma oskudni epidemiološki podaci, kada je reč o većim kohortama ispitanika, mada je u studiji Knežević i autora, pokazano da su osobe muškog pola bili češći konzumenti alkohola i intravenskih narkotika [195]. Treba napomenuti da prilikom konzumiranja alkohola, značajnog uticaja ima frekventnost konzumiranja i količina (pokazano je da su muškarci češće konzumenti većih koncentracija alkohola, mada je prag negativnog uticaja u smislu fibrogeneze i tolerancije znatno niži kod osoba ženskog pola) [196,197].

Starost pacijenata (naročito u momentu sticanja HCV infekcije) i dužina trajanja infekcije, prema literaturnim podacima, predstavljaju značajne nezavisne prediktore progresije bolesti–nastanka ciroze i HCC [5].

Prosečna preterapijska starost pacijenata u našoj studiji iznosila je 48 godina (medijana), a trećina pacijenata je bila starosti od 45-54 godina (34,2%). Treba napomenuti da su prilikom selekcije pacijenata kriterijumi za uključivanje u studiju (istovetni sa kriterijumima za primenu antivirusne terapije), eliminisali pacijente mlađe i starije dobi (ispod 18 godina i preko 65 godina), što svakako može da utiče na interpretaciju rezultata i praćenje. Međutim slični podaci

se dobijaju i u drugim zemljama- npr. u SAD je 65% osoba sa HCV infekcijom starosti između 30 i 49 godina, pri čemu se smatra da je ova infekcija retka kod osoba mlađih od 20 godina, a prevalentnija kod starijih od 40 godina [185]. Starost pacijenata, kao i era u kojoj je došlo do infekcije, mogu da ukažu i rizik za HCV infekciju, jer su u preterapijskoj eri dominantni rizici bili transfuzije i upotreba kontaminiranih medicinskih instrumenata. Podaci Centra za kontrolu i prevenciju bolesti u Atlanti (Center for Disease Control- CDC) pokazuju da je oko 75% osoba sa HCV infekcijom u SAD, rođeno između 1945. i 1965. (tzv. „baby boomer“ generacija) godine, što je značajno uticalo na implementaciju novih preporuka za skrining na HCV infekciju, upravo u ovoj populaciji [198]. Zanimljivo je da prema procenama CDC, jednokratno testiranje (korišćenjem seroloških testova), samo u ovoj populaciji, može da identifikuje i do 800 000 inficiranih osoba. Na taj način je procenjeno, da bi se uz savremene terapijske protokole moglo izbeći više od 120 000 smrtnih ishoda, koji su u vezi sa HCV infekcijom, što predstavlja uštedu od oko 1,5 milijardi dolara u troškovima lečenja komplikacija nelečene/kasno prepoznate HCV infekcije [198].

Starost pacijenata u momentu postavljanja dijagnoze je od velikog kliničkog značaja, i u eri DAA, jer je pokazano da je povezana sa progresivnim oštećenjem jetre, pri čemu su relevantni negativni prediktori nastanak primoinfekcije u starijoj dobi i dužina trajanja bolesti. U dve značajne prospektivne kohortne studije (Williams i autori, Boccato i autori) pokazano je da je kod pacijenata koji su inficirani nakon 40-te godine sa bazalnom lakom fibrozom, postojala značajno brža progresija fibroze, u odnosu na pacijente mlađe dobi [199,200].

U situaciji, gde se započinje lečenje starijih pacijenata i sa težim preterapijskim oštećenjem jetre (što je bio slučaj u našoj studiji), očekuju se i manja efikasnost terapijskih protokola, kao i češća pojava neželjenih efekata terapije (naročito prilikom primene interferona) [201].

U našoj studiji je procenjeno da je terapija započeta u proseku nakon 3,5 godine od momenta kada je dijagnostikovana HCV infekcija. Ovaj vremenski period (koji predstavlja relativno dugo trajanje infekcije), u kombinaciji sa pomenutim starosnim intervalom, predstavlja klinički problematične parametre. Tokom višedecenijske prakse, u našoj zemlji su se menjale nacionalne preporuke (kao i pravila fonda za zdravstveno osiguranje) za praćenje pacijenata sa novootkrivenom HCV infekcijom, koje su nekada podrazumevale i višegodišnje odlaganje

terapije. Najčešće je odlagan početak lečenja u grupi PWID, gde je uslov za primenu kombinovane antivirusne terapije bila stabilna apstinencija od psihoaktivnih supstanci. Takođe protokoli lečenja su se odlagali i kod žena reproduktivne dobi, koje su planirale trudnoću, kao i kod osoba koje su konzumirale alkohol. Sve pomenute situacije su produžavale period trajanja nelečene HCV infekcije, za koji sada sa sigurnošću znamo da utiče nepovoljno na tok i ishod bolesti [5]. Takođe povremeni prekidi u nabavci antivirusnih lekova i testova za molekularnu detekciju HCV infekcije i genotipizaciju (koji su se dešavali za poslednje dve decenije), uticali su na odlaganje antivirusne terapije, što je čest slučaj u zemljama sa finansijskim izazovima. Situacija je slična kod nas i u DAA eri, gde je savremena antivirusna terapija dostupna samo ograničenom broju pacijenata. Pored ovih razloga za odlaganje terapije, treba napomenuti da je kod značajnog broja pacijenata, inicijalna dijagnoza HCV infekcije postavljena u fazi uznapredovalog oštećenja jetre (ciroza). Razlog tome je sličan, kao i u drugim razvijenijim zemljama, a to je činjenica da je sam tok hronične HCV infekcije asimptomatski, a da se tegobe koje bi inicirale testiranje javljaju mnogo kasnije, i to u fazi komplikovane bolesti. Takođe postoje rezultati koji ukazuju da je čak i ciljano testiranje, bazirano samo na osnovu uočenih povišenih vrednosti enzima jetre, neefikasno u oko 50% slučajeva pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom [198]. Veliki udeo asimptomatski inficiranih osoba, omogućava održavanje enormnog broja osoba, koje nikada nisu ni testirane i nisu ni svesne HCV infekcije (procene CDC su da se taj udeo samo u SAD kreće od 45-85% osoba), a koje su u riziku od progresije infekcije i u epidemiološkom smislu predstavljaju rezervoar HCV infekcije. Zbog toga su u bogatijim zemljama uvedene preporuke za testiranje određenih populacija, za koje se smatra da su pod povećanim rizikom.

Kod nas postoje nacionalne smernice za dijagnostiku HCV infekcije, na osnovu kliničkih, epidemioloških i/ili laboratorijskih ili radioloških procena, pri čemu se savetuje skrining veoma široke populacije-davalaca krvi, davalaca i primalaca organa/tkiva za transplantaciju, osoba sa hemofilijom, pacijenata na hemodijalizi, pacijenata sa HBV i HIV koinfekcijom, učesnika u programima in vitro fertilizacije, trudnica, pacijenata koji primaju biološku/imunosupresivnu ili hemioterapiju, dece anti-HCV pozitivnih majki starosti od 18 meseci, osoba iz populacije PWID. Takođe se savetuje skrining svih osoba koje su primili transfuziju krvi pre 1994., zdravstvenih radnika, ljudi koji žive u istom domaćinstvu sa inficiranim pacijentima, njihovih seksualnih partnera (posebno iz populacije MSM), imigranata iz visoko prevalentnih zemalja, štićenika



socijalnih i popravnih ustanova i zatvora [202]. Međutim implementacija ovih preporuka je često manjkava, naročito u manjim sredinama, često zbog otežane dostupnosti testova, neinformisanosti i stigmatizacije.

Najzastupljeniji genotip u ovoj studiji je bio genotip 1, i to kod 61,5% pacijenata, što je u skladu sa do sada publikovanim podacima vezano za istočnu Evropu i našu sredinu [5]. Takođe predominacija genotipa 1 je očekivana, kada se uzme u obzir i najčešći rizik za HCV infekciju u ovoj studiji (parenteralnim putem-krvni derivati i transfuzije kod 32% ispitanika, nozokomijalno kod 11,4%). Treba napomenuti, da su zahvaljujući uvođenju rigoroznog skrininga jedinica donirane krvi u Srbiji, transfuzije krvi i krvnih derivata nakon 1993. Godine, praktično eliminisane kao rizik za sticanje HCV infekcije.

Iako je broj populacionih studija u istočnoj Evropi veoma ograničen, a naša zemlja još uvek ne pripada nekom od sistema epidemiološkog nadzora, do sada raspoloživi podaci i kliničke opservacije ukazuju na lokalne tj. geografske razlike u predominaciji najverovatnijih rizika za sticanje HCV infekcije. Za razliku od SAD, zapadnoevropskih zemalja i zemalja Južne Amerike, u našoj regiji se procenjuje da postoji znatno veći udeo nozokomijalno stečenih infekcija. Procenjeno je da su hirurške procedure i parenteralni rizici (ne računajući transfuzije krvi i krvnih derivata) odgovorne za nastanak 40-71% infekcija [203]. U studiji Poljskih autora na pacijentima koji su hospitalizovani zbog akutne ili hronične HCV infekcije, pokazano je da je od 59-71% stečenih HCV infekcija zapravo nozokomijalnog porekla, i u vezi sa ranijim medicinskim procedurama i/ili hospitalizacijama. Takođe je pokazano da su manje hirurške intervencije, ali i stomatološke procedure, nezavisni prediktori za nastanak HCV infekcije [203-205].

Nezanemarljiv je udeo pacijenata u našoj studiji, kod kojih je način sticanja infekcije ostao nepoznat (35,4%), što je vrlo čest slučaj u svim do sada raspoloživim publikacijama o faktorima rizika za HCV infekciju. Postoje i pojedinačne studije, gde se ovaj udeo pacijenata kreće čak i do 50% [5]. Kako su načini transmisije HCV infekcije dobro proučeni, sasvim je izvesno da su u ovoj grupi pacijenata zastupljene kombinacije različitih poznatih rizika za sticanje infekcije. Svakako da udela u ovakvim rezultatima ima i sama metodologija ispitivanja načina sticanja infekcije (često otežane rekonstrukcije epidemioloških rizika koji su se desili nekoliko decenija unazad) i procenu prevalencije infekcije. U multicentričnoj studiji iz 2015.

godine Mitrović i autori su izneli podatke u populaciji novootkivenih anti-HCV pozitivnih osoba među dobrovoljnim davaocima krvi u Srbiji, prema kojima ranija upotreba narkotika, transfuzije (pre 1993. godine) i tetovaže predstavljaju nezavisne faktore rizika za HCV infekciju [39]. Iako postoje mnogobrojna metodološka ograničenja, kada su u pitanju studije koje se bave proučavanjem faktora rizika za HCV infekciju i mogućih načina transmisije, bolje poznavanje ovih prediktora u našoj sredini je neophodno, kako bi se preciznije identifikovale osobe kojima je potrebno testiranje na HCV infekciju i planirale efikasnije preventivne mere.

U našoj studiji je sasvim izvesno da postoji značajno manja zastupljenost (tj. potcenjenost broja) osoba iz populacije PWID, u odnosu na opštu populaciju anti-HCV pozitivnih osoba (među našim pacijentima svega 18,2%) u Srbiji.

Jedan od razloga za to je i činjenica da je udeo osoba koje su koristile intravenske narkotike realno mnogo veći u odnosu na prijavljene anamnestičke podatke. Jedna velika studija, među dobrovoljnim davaocima krvi u SAD, je pokazala da je nakon dopunskih ispitivanja značajan broj anti-HCV pozitivnih osoba ipak naknadno prijavio podatak o ranijoj zloupotrebi intravenskih narkotika, uprkos inicijalnoj negaciji ovog rizika [206]. Takođe je poznato da u našoj sredini postoje mnogobrojni problemi vezani za dostupnost testiranja i lečenja u ovoj populaciji (s obzirom na to da se bolesti zavisnosti leče u usko specijalizovanim centrima), kao i rasipanje velikog broja anti-HCV pozitivnih osoba u druge bolničke centre uključujući i zatvorske bolnice (u kojima je takođe sprovedena antivirusna terapija) [117].

Sam dizajn naše studije, koji je obuhvatio pacijente sa HCV infekcijom i preterapijskim teškim oštećenjem jetre, je takođe eliminisao veliki broj osoba iz populacije PWID, kako je reč uglavnom o mlađim osobama sa preterapijskim lakšim stepenom fibroze, dok su u fokusu naše studije bili pacijenti sa preterapijskim teškim oštećenjem jetre. U našoj sredini, studija Bojović i autora iz 2013. godine dala je prve podatke na populaciji od 100 PWID sa HCV infekcijom- gde je pokazano da su ovi pacijenti značajno mlađe dobi, sa najčešćim preterapijskom lakom fibrozom, dok su preterapijska teža oštećenja jetre (teška fibroza i ciroza) bile značajno zastupljenije u kontrolnoj grupi pacijenata koji nisu bili korisnici intravenskih narkotika [118].

Postoji veliki broj dokaza o značaju određivanja viremije tj. nivoa HCV RNK u krvi pacijenata- pre početka, tokom i nakon završetka antivirusne terapije u predikciji ishoda HCV

infekcije (ne samo terapijskog već i dugoročno posmatrano kliničkog ishoda) [207]. U našoj studiji nije bilo dominacije pacijenata sa visokom preterapijskom viremijom (svega 54,7% pacijenata je imalo viremiju preko 800 000 IU/ml), mada je reč o populaciji pacijenata sa najtežim stepenom oštećenja jetre, što nije iznenađujuće. Iako je veliki broj autora demonstrirao prediktivni značaj bazalne viremije i SVR/kliničkog ishoda, postoje brojni rezultati, koji ne ukazuju na korelaciju visoke bazalne viremije sa stepenom/progresijom fibroze [207,208].

U svakodnevnoj kliničkoj praksi, naročito kod pacijenata sa cirozom, naše iskustvo i opservacije ne ukazuju na korelaciju preterapijske viremije sa terapijskim ishodom. Rezultati ove studije, nisu pokazali da postoji značajna razlika u prosečnim preterapijskim vrednostima HCV RNK, niti dominacija pacijenata sa visokom viremijom (>800 000 IU/ml) u grupi pacijenata sa terapijskim neuspehom.

Takođe u našoj populaciji pacijenata, nije pokazana značajna povezanost između niske preterapijske viremije i postignutog SVR ( $p=0,974$ ). Naši rezultati, koji će biti kasnije diskutovani u ovom poglavlju, takođe nisu pokazali prediktivni značaj preterapijske viremije i pojave kasnog virusološkog relapsa, progresije fibroze, pojave HCC i preživljavanja.

Razlog za nedostatak ove korelacije je svakako kompleksna i multikauzalna patogeneza oštećenja jetre kod HCV infekcije (uključujući pitanje uticaja imunoloških kontrolnih mehanizama na nivo viremije), često neusklađenost tj. nedovoljan stepen standardizacije testova (što je svakako problem u zemljama sa ograničenim prihodima), ali i pitanje korelacije nivoa HCV RNK u krvi (viremije) sa replikacijom HCV u hepatocitima [208].

Rezultati naše studije, koji se tiču vrste i učestalosti neželjenih efekata, tokom primene kombinovane antivirusne terapije, su veoma slični većini studija, koje su uključivale i značajno veći broj ispitanika [113, 209-212].

S obzirom na to da je efikasnost bilo kog terapijskog režima u bliskoj vezi sa podnošljivošću lekova i pojavom/vrstom neželjenih efekata, jer se direktno reperkutuje na adherenciju pacijenata, činjenica je da je uprkos rigoroznom praćenju pacijenata (naročito na početku primene antivirusne terapije) zabeležen veliki broj neželjenih efekata, koji su značajno otežavali sprovođenje iste.

Većina velikih studija beleži pojavu bar jednog neželjenog efekta (sa ovim režimom) kod čak 95% pacijenata, pri čemu je dodatno otežavajuća okolnost činjenica da se oni mogu pojaviti bilo kada- tj. neposredno nakon primene prve doze interferona, pa i do nekoliko meseci kasnije u toku stabilne primene terapije [211].

Ipak, možda najzanimljiviji i sa kliničkog aspekta najznačajniji neželjeni efekti, koji mogu da dovedu do redukcija doza lekova i/ili terapijskih prekida, se odnose na hematološke i neželjene neuropsihijatrijske incidente, mada bilo koja intenzivna konstitucionalna tegoba, koja značajno utiče na kvalitet života pacijenta, može uticati na adherenciju.

U svakodnevnoj praksi najčešći razlog za redukciju doze lekova i prekide/prevremeno obustavljanje terapije su teži hematološki poremećaji i to zbog mijelosupresivnog efekta interferona, kao i ribavirinom-izazvana hemolitička anemija. S obzirom na specifičnost ispitanika u ovoj studiji i veliku zastupljenost pacijenata sa teškom fibrozom i cirozom, kod kojih se viđaju i preterapijska anemija i trombocitopenija, bilo je posebno zanimljivo uporediti učestalost ovih poremećaja, a u odnosu na rezultate drugih autora.

Najčešće zabeležen hematološki poremećaj je bila anemija, i to kod čak 35,4% pacijenata, što je sasvim razumljivo, ako se uzme u obzir udeo pacijenata sa bazalnom teškom fibrozom i cirozom. Iako je mehanizam nastanka anemije dominantno u vezi sa upotrebom ribavirina (dozno-zavisna hemoliza), neosporno je da i interferon svojim mijelosupresivnim efektom doprinosi njenom nastanku [212,213]. Zastupljenost ribavirinom-indukovane anemije je i u drugim studijama velika, i kreće se i do 67%, a maksimum dostiže između 2. i 8. nedelje terapije [213]. Takođe je pokazano, da iako stepen anemije varira, niže vrednosti hemoglobina mogu biti u vezi sa nižim preterapijskim vrednostima trombocita i određenim fenotipovima haptoglobina [213].

Neutropenija je zabeležena u našoj studiji kod 16% pacijenata, što je u skladu sa većinom publikovanih rezultata, ali nije bilo dokumentovanih slučajeva infekcija koje bi se mogle dovesti u vezu sa ovim hematološkim poremećajem, a koje su drugi autori opisali [211]. Ipak ostaje otvoreno pitanje kliničkog značaja prolazne neutropenije, naročito kada se uzmu u obzir rezultati jedne studije od 119 ispitanika, u kojoj je zabeležena pojava različitih infekcija kod 22 pacijenata (kao što su respiratorne, urinarne itd.) [214].

Učestalost trombocitopenije je bila visoka-zabeležena je kod 30% pacijenata, što je bilo i očekivano s obzirom na zastupljenost ciroze i portalne hipertenzije u ispitivanoj populaciji. Pokazano je u više studija pacijenata sa preterapijskom trombocitopenijom, da su bazalne vrednosti trombocita  $<100\ 000/\mu\text{L}$  i rapidna pojava trombocitopenije faktori rizika za nastanak terapijski indukovane teške trombocitopenije, koja predstavlja rizik za krvarenja [215].

Veoma česti ekstrahepatički poremećaji, koji se viđaju kod pacijenata sa HHC infekcijom, su neuropsihijatrijske prirode, naročito depresija. Mogući mehanizmi pomoću kojih HCV direktno i indirektno indukuje nastanak depresivne simptomatologije, uključuju direktnu invaziju centralnog nervnog sistema, uticaj na neurotransmisiju putem metaboličkih promena, kao i indukcija zapaljenskog odgovora [5,216].

Pored već pomenutih hematoloških poremećaja, u našoj studiji je tokom primene interferona, zabeležen i visok procenat pojave depresivne simptomatologije (21,8%), što je takođe u skladu sa literaturnim podacima drugih autora [113,210,212]. Ovako visoka zastupljenost se objašnjiva dejstvom interferona, kao i činjenicom da je prevalencija depresije kod pacijenata sa hepatitis C virusnom infekcijom, inače veća u odnosu na opštu populaciju (i do 4 puta češća), pa primena antivirusne terapije nosi značajne rizike u smislu pogoršanja preegzistentnih psihijatrijskih stanja, uključujući anksioznost i pojavu suicidalnih ideja [5,113,216].

U našoj sredini, pored prikazanih rezultata, postoje rezultati iz samo jedne studije iz 2002. godine Pavlović i autora, u kojoj su po prvi put u Srbiji razmatrane pojave depresivnih poremećaja u manjem uzorku pacijenata ( $n=74$ ) sa HHC tokom primene kombinovane antivirusne terapije. Autori su opisali da je čak 20% pacijenata imalo umerene/teške simptome depresije sa pikom u 12. nedelji antivirusne terapije, dok je dodatnih 30% pacijenata imalo blaže depresivne simptome, pri čemu nije pokazan značajan uticaj terapijski-zavisnih faktora (dužina trajanja terapije, doza pegilovanog interferona) [216].

Osnovni koncept u primeni terapijskih protokola zasnovanim na interferonu se bazira na odgovorom vođenoj terapiji (Response guided treatment, RGT), što u praksi znači da se tokom primene terapije, a na osnovu nivoa HCV RNK može utvrditi optimalna dužina lečenja, ali i identifikovati pacijenti, kod kojih je potrebno terapiju obustaviti prevremeno (u slučajevima gde postoje pokazatelji da su šanse za postizanje SVR veoma niske) [5,217]. Ovaj pristup je omogućio optimizaciju terapije-povećanje efikasnosti lečenja (tj. postizanja SVR) i poboljšanje podnošljivosti terapije (što je svakako uticalo i na komplijansu pacijenata), ne samo u dualnim protokolima već i u tripl režimima sa boceprevirom i telaprevirom.

Primena ove paradigme je bazirana na unapređenju osetljivosti molekularnih testova i sve nižeg praga detekcije HCV RNK, što je prevashodno omogućilo pouzdano i kontinuirano praćenje viremije u krvi tokom i nakon završetka terapije [5]. Iako je u cilju standardizacije testova uvedena kalibracija u odnosu na standard, postoje razlike u kvantifikaciji komercijalnih testova, koje mogu da otežaju interpretaciju rezultata i utiču na kliničke odluke o optimalnom trajanju lečenja. Razlozi za ovu pojavu su višestruki, između ostalog i prisustvo genotip-specifičnih varijabilnih sekvenci na mestu vezivanja prajmera za reakciju PCR, mada postoje i razlike u karakteristikama samih testova (npr. razlike u unutrašnjoj kontroli) [218].

Osim toga, u našoj sredini otežavajuća okolnost u sprovođenju ponavljanih testiranja tokom primene terapije se odnosi i na tehničke poteškoće (prvenstveno ograničenu dostupnost reagenasa i virusoloških testova), kao i adherenciju pacijenata.

Zbog toga je u ovoj studiji prvi evaluiran terapijski cilj bio ETR, kako je kod svih pacijenata bilo moguće sprovesti virusološku dijagnostiku na kraju terapije, a samo kod izvesnog broja u 4 nedelji terapije (tzv. rapidni virusološki odgovor) i 12 nedelji (tzv. rani virusološki odgovor), iako je sasvim izvesno da je momenat kada se kod pacijenta postigne nedetektibilna viremija prediktor SVR [219]. ETR je postignut kod 83,4% pacijenata, a biohemijski odgovor tj. normalizacija vrednosti serumskih transaminaza, na kraju terapije, je ostvarena kod 77,2%, pri čemu nije pokazan uticaj genotipa HCV na postizanje ETR (kretala se od najniže 78,5% kod genotip 1 HCV infekcije do maksimalnih 100% kod pacijenata sa genotip 5 HCV infekcije).

Postizanje SVR je cilj antivirusne terapije, pa se u svakodnevnoj kliničkoj praksi često poistovećuje sa eradikacijom HCV infekcije, s obzirom na to da je doveden u vezu sa dugoročnim održavanjem nedetektibilne viremije u 99% slučajeva [98,100].

Već je diskutovan u prethodnim poglavljima i klinički očigledan značaj postizanja SVR u svakodnevnoj praksi, uključujući smanjenje globalnog morbiditeta i mortaliteta vezanog za jetru, naročito kada je reč o poznim komplikacijama i incidenciji HCC [220]. Veoma su dobro proučeni prediktori i stope SVR kod pojedinačnih grupa pacijenata, koji su takođe diskutovani u uvodu, mada treba napomenuti da u proučavanju efikasnosti antivirusne terapije postoji često i značajan selekcionni bias tj. diskutabilna metodološka pitanja uključenja preselektovanih pacijenta (sa mnogobrojnim kriterijumima za uključivanje i isključivanje iz kliničkih studija), pogotovo u visokospecijalizovanim zdravstvenim ustanovama, što je slučaj i u ovoj studiji [221].

U našoj ispitivanoj grupi pacijenata sa preterapijskom teškom fibrozom i cirozom, ukupna stopa SVR je izuzetno visoka, čak u odnosu na do sada publikovane rezultate u svetskoj literaturi, i iznosi 64,3% (nezavisno od genotipa). SVR je postignut u našoj studiji kod 54,5% pacijenata sa G1 i 80% sa non-G1 HCV infekcijom ( $p < 0,001$ ), kao i kod 53,6% pacijenata sa cirozom. Do sada su najviše stope SVR kod ovakvih bolesnika zabeležene kod Korejskih autora (mnogo više u odnosu na autore sa Zapada), pri čemu je SVR ostvaren kod 36,7% bolesnika sa genotipom 1 (značajno niža stopa u odnosu na SVR kod 67% bolesnika bez ciroze u istoj studiji) i 86% bolesnika sa cirozom i non-genotip 1 infekcijom [222].

Ovako visoke stope SVR u terapijski najzahtevnijoj grupi bolesnika, uz geografske i etničke razlike, veliki broj autora objašnjava nižom bazalnom viremijom, odličnom adherencijom bolesnika i razlikama u genetskim faktorima bolesnika (prevashodno visokoj zastupljenosti povoljnih genotipova IL28B (rs12979860 CC i rs8099917 TT) [5,207,144,145].

Analizom različitih kliničkih, virusoloških i epidemioloških varijabli, u našoj studiji pokazano je da su prediktori postizanja SVR bili ETR, starost < 40 godina, non-G1 HCV infekcija i odsustvo ciroze tj. niži METAVIR skor F2-F3. Do sada je u više navrata pominjan i diskutovan značaj određivanja mnogobrojnih preterapijskih prediktora SVR. Ipak neophodno je naglasiti da odluke o započinjanju primene antivirusne terapije/trajanju i vrsti terapijskog protokola, svakako

ne treba bazirati samo na prisustvu preterapijskih prediktora, pogotovo kada se uzme u obzir da oni ne mogu uvek i precizno da predvide terapijski ishod kod svakog pacijenta ponaosob [207].

Svakako je najvažniji parametar u kliničkoj praksi odgovorom vođene terapije, upravo dinamika viremije tokom primene antivirusne terapije, koja predstavlja pouzdan vodič u proceni terapijske efikasnosti i ishoda [207,223]. Ključni parametar za procenu ishoda terapije je virusološki odgovor tokom primene terapije, tj. momenat kada se postigne nedetektibilna viremija, kao što je već pomenuto. Pokazano je da je verovatnoća postizanja SVR značajno veća kod pacijenata koji su što ranije i što duže postigli/održali nedetektibilnu viremiju [224].

Kako u ovoj studiji nismo analizirali rapidni i rani virusološki odgovor (za koji je veliki broj studija pokazao da predstavljaju relevantne terapijske prediktore SVR), prva prekretnica koja je analizirana u kinetici viremije je bio ETR, koji je ujedno i prvi miljokaz terapijske efikasnosti. Nažalost i do jedna trećina pacijenata sa postignutim ETR ipak ne ostvari i SVR (virusološki relaps), iz višestrukih razloga [223,225]. Jedna od hipoteza je da nakon završetka primene supresivne antivirusne terapije iz ekstrahepatičkih rezervoara (periferne ćelije krvi-neutrofili, B limfociti, neke ćelije gastrične mukoze) može doći do ponovne replikacije HCV RNK, slično modelu HIV-a. Međutim zbog postojanja mnogobrojnih kontradiktornih rezultata, ovakvo stanovište nije sasvim jasno dokazano [10,14-16,18,223]. Znatno češća situacija je da su pacijenti pogrešno klasifikovani kao terapijskih responderi sa postignutim ETR, a zbog primene manje osetljivih molekularnih testova sa višim pragom detektibilnosti. U studiji Gerota i saradnika je pokazano da upotreba manje osetljivih PCR testova može da zanemari prisustvo minimalne rezidualne viremije kod oko 12% i na taj način ih pogrešno okarakterise kao pacijente sa ostvarenim ETR [226].

Takođe je nezanemarljiv uticaj genotipa HCV na održivost ETR i pojavu virusološkog relapsa (koji je npr. značajno češći kod pacijenata sa G1 infekcijom 23-30%, dok su zabeležene stope relapsa kod pacijenata sa G2 i G3 infekcijom kreću od 4%-32%), pa postoji veliki broj studija koje ukazuju na prediktivni značaj genotipa HCV na postizanje SVR [102-104,223,225,227].

Slično našim rezultatima, mlađa dob pri započinjanju terapije koreliše sa postizanjem SVR, što je već diskutovano, čime se samo i potvrđuje značaj što ranije dijagnostike i primene antivirusne terapije bez odlaganja.



Naši rezultati, koji ukazuju na prediktivni značaj težine fibroze na postizanje SVR, su takođe u skladu sa do sada publikovanim podacima, pri čemu iako pacijenti sa lakšim stepenom oštećenja jetre postižu najviše stope SVR, nesumnjivo je da pacijenti sa težim oštećenjem jetre (naročito cirozom) imaju još veću korist od primene antivirusne terapije i potencijalne eradikacije HCV infekcije, ako se uzme u obzir redukcija rizika od pojave poznih komplikacija, dodatnog morbiditeta i mortaliteta [5,100,101].

Ovaj odnos je dvosmeran, jer postoji značajan broj studija koje ukazuju da je kod pacijenata sa SVR dalja progresija fibroze u periodu praćenja značajno usporena u odnosu na pacijente sa detektibilnom HCV RNK, uz podatke i o mogućoj reverziji fibroze, što će biti predmet diskusije u periodu praćenja [228].

U eri interferona, postizanje SVR se često izjednačava sa izlečenjem tj. eradikacijom HCV infekcije, mada je u DAA eri ovakvo stanovište mnogo realnije, zahvaljujući izuzetno visokim stopama SVR i veoma retkim slučajevima relapsa nakon višegodišnjeg praćenja. Postoji mnoštvo dokaza o prednostima eliminacije HCV RNK iz krvi i postizanju SVR (bez obzira na terapijski protokol koji je korišćen), uključujući poboljšanje biohemijskih nalaza vezanih za funkciju jetre (povoljan biohemijski ishod), usporenu fibrogenezu ili čak regresiju fibroze, gubitak HCV RNK u tkivu jetre i smanjenje infektivnosti (potencijalno uklanjanje određenih puteva transmisije virusa npr. kod diskordantnih partnera).

Na taj način se postiže poboljšanje kvaliteta života (uključujući i smanjenje tegoba/rešavanje pitanja ekstrahepatičkih manifestacija HCV infekcije), prevencija komplikacija i značajna redukcija mortaliteta (kako opšteg, tako i vezanog za komplikacije terminalne bolesti jetre) [229,230].

Uprkos terapijskom uspehu i postignutoj eliminaciji HCV RNK iz krvi pacijenata 6 meseci nakon sprovedene terapije, postoje dva značajna pitanja- prvo pouzdanosti i dugoročnosti SVR (pojava kasnog virusološkog relapsa i pitanje dugoročnosti remisije bolesti), a zatim i pojave neželjenih kliničkih ishoda-uključujući progresiju fibroze i pojavu HCC-naročito kod pacijenata sa teškom preterapijskom fibrozom, a uprkos postignutom SVR. U našoj sredini nema

publikovanih podataka vezanih za ova dva problema, osim naših kliničkih opservacija u višedecencijskom ambulantnom praćenju ovih bolesnika.

Kada je reč o kasnom virusološkom relapsu, podaci stranih autora su veoma različiti, ali većina rezultata ukazuje na izuzetno visoke stope nedetektibilne viremije godinama nakon postignutog SVR, koje se kreću od 91-100%, u zavisnosti od vrste interferonskog režima koji je primenjivan (monoterapija IFN, različite forme IFN, kombinacija sa ribavirinom) i sa razlikama u dužini perioda praćenja, koje se kreće i preko 10 godina [231]. Iako redak fenomen, do sada publikovani slučajevi kasnog relapsa u literaturi, uglavnom opisuju asimptomatske pacijente sa umerenim vrednostima HCV RNK, koji se najčešće otkriju slučajno tokom višegodišnjeg perioda praćenja, a često i u okviru reevaluacije ponovnog porasta vrednosti serumskih transaminaza [232].

Pojavu kasnog virusološkog relapsa autori objašnjavaju različitim mehanizmima, pri čemu je vrlo mali broj studija u mogućnosti da sa pouzdanošću odgovori na pitanja- da li je postignuti SVR bio isto što i eradikacija HCV infekcije (ili samo supresija replikacije), kao i da li je isključena reinfekcija (što često nije moguće, zbog zahtevne tehnologije i visokih troškova sekvencioniranja HCV RNK, i predstavlja jednu od najčešćih slabosti ovakvih studija, uključujući i naše).

Jedan od najčešćih razloga, koji se u literaturi takođe dovode u vezu sa ovom pojavom, tiču se osetljivosti tj. praga detektibilnosti molekularnih testova koji se koriste za dijagnostiku HCV infekcije i praćenje virusološkog ishoda. Ono što je sasvim izvesno da je upotreba osetljivijih PCR testova sa pragom detektibilnosti od 50 IU/ml neophodna da bi se uopšte definisao SVR, jer upotrebom manje osetljivih testova postoji mogućnost da se pacijenti pogrešno proglase za respondere (6 meseci nakon završetka terapije), a samim time kasnije nakon detekcije viremije pogrešno okarakterišu kao kasni relapseri [229]. Razlike u osetljivosti testova, ali i različite definicije biohemijskog i virusološkog odgovora, mogu da objasne razlike u publikovanim stopama kasnog virusološkog relapsa u dostupnoj literaturi, koje se kreću u od 0-9% [128-131].

Ipak većina autora smatra da je pojava detektibilne viremije nakon postignutog SVR, u vezi sa reinfekcijom, pre nego kasnim relapsom, pogotovo kada se uzme u obzir veoma

ograničen broj studija koji je sekvencioniranjem HCV RNK apsolutno isključio mogućnost reinfekcije. Simmons i autori u velikoj metaanalizi su pokazali da se 5-godišnji rizik nakon sprovedene terapije kreće od minimalnih 0,95% u populaciji sa najmanjim rizikom od reinfekcije, pa do maksimalnih 15,02% u grupi pacijenata sa koinfekcijom (HBV i HIV) i najvećim rizicima za reinfekciju (dominantno PWID) tj. u populacijama koje su ponavljano izložene HCV infekciji [131].

Posebno je zanimljivo pitanje koje se tiče moguće perzistencije HCV RNK u hepatocitima (tzv. rezervoar HCV infekcije), kao potencijalnog prediktora buduće detektibilne HCV RNK u krvi i kasnog virusološkog relapsa.

Veliki broj studija je pokazao značaj određivanja intrahepatičke HCV RNK u predikciji postizanja SVR, pri čemu postoje publikovani rezultati o prediktivnom značaju i senzitivnosti od čak 100% i specifičnosti od 90% [233].

Nažalost detekcija intrahepatičke HCV RNK nije široko dostupna, niti je bilo mogućnosti da se upotrebi u ovoj studiji. Međutim kada je reč o dugoročnoj prognozi, iako postoje kontradiktorni rezultati koji otežavaju interpretaciju određivanja intrahepatičke HCV RNK, nekolicina studija je pokazala izvestan prognostički značaj i mimo postizanja SVR. Larghi i autori su u studiji praćenja (medijana 39 meseci nakon završetka terapije interferonom) od 25 pacijenata sa postignutim SVR, pokazali korelaciju između nedetektibilne HCV RNK u krvi i tkivu jetre.

Takođe je kod svih pacijenata sa ostvarenim SVR dokazana i biohemijska remisija uz patohistološki potvrđenu regresiju fibroze jetre, čak i kod jednog pacijenta kod koga je detektovana HCV RNK u tkivu jetre [234]. Nekolicina studija na veoma malim uzorcima je takođe pokazala korelaciju između promena nivoa hepaticke HCV RNK i viremije tokom interferonske terapije, kao i moguć značaj detektibilne hepaticke HCV RNK nakon završetka terapije kao prediktora kasnog relapsa [230,235].

Međutim, iako su brojne studije potvrdila korelaciju viremije i intrahepatičke HCV RNK, kao i činjenicu da kod ovakvih nalaza neadekvatno uzorkovanje/obrada uzoraka tkiva, ali i neravnomerna distribucija HCV kroz jetru (u nekim studijama inficira svega 5-25% hepatocita) značajno umanjuje značaj intrahepatičkog određivanja HCV RNK [236,237].

Jedini do sada publikovani literaturni podaci iz Srbije, tj. opis tri slučaja mogućeg kasnog virusološkog relapsa, objavili su Ružić i autori 2018. godine u Kliničkom Centru Vojvodine. U studiji preseka iz 2014. godine, kada je testirano 129 pacijenata najmanje 5 godina nakon postignutog SVR, otkrivena su 3 pacijenta (2,3%) sa detektibilnom viremijom, koja su imala konkomitantne autoimune bolesti (vaskulitis) [238]. Nažalost, slična ograničenja kao i u našoj studiji (nemogućnost isključenja virusološkog relapsa RNK sekvencioniranjem) uz slučaj pacijentkinje na programu hemodijalize i nepoznat prag detektibilnosti korišćenih molekularnih dijagnostičkih testova, otežavaju mogućnost interpretacije ovih rezultata.

U našoj studiji je tokom višegodišnjeg perioda praćenja 325 pacijenata sa teškim preterapijskim oštećenjem jetre, zabeležena detektibilna viremija kod 14 pacijenata (6,7%), koji su postigli SVR. Ovakav rezultat je u skladu sa literaturnim podacima stranih autora, čije se incidencije kreću od 0-9% [98,131,132,229,231,232]. Činjenica da je u grupi terapijski najzahtevnijih pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom postignuto i održano višegodišnje odsustvo detektibilne viremije, govori u prilog pouzdanosti SVR kao markera eradikacije HCV infekcije.

Naši rezultati su pokazali da među pacijentima sa kasnim virusološkim relapsom dominiraju pacijenti sa najtežim preterapijskim oštećenjem jetre tj. cirozom, visokom bazalnom viremijom >800 000 IU/ml i dominantno nepovoljnim genotipom TTrs12979860. Međutim u našoj studiji jedini preterapijski faktor, koji je na nivou statističke značajnosti, doveden u negativnu vezu sa rizikom od kasnog virusološkog relapsa, je prisustvo CCrs12979860 genotipa (kod 82,1% kasnih relapsa). Veldt i autori u studiji sa 12 kasnih relapsa nakon monoterapije interferonom (pri čemu nije bila uključena analiza polimorfizama IL28B), takođe nisu doveli u vezu klasične preterapijske faktore, kao što su demografske karakteristike pacijenata, patohistološki nalaz, viremiju, genotip HCV, sa nastankom kasnog virusološkog relapsa [239].

Kada su u pitanju polimorfizmi IL28B, do sada nije analiziran njihov potencijalni značaj kada je u pitanju kasni virusološki relaps, jer je korišćen i ispitan isključivo kao prediktor spontane eliminacije HCV infekcije i postizanja SVR [154-159]. Rezultati naše studije predstavljaju prve, te vrste, koji su uzeli u obzir genski polimorfizam IL28B, kao mogući prediktor dugoročne nedetektibilne viremije i nakon 6 meseci od završetka terapije. Prisustvo CC genotipa, za koji je poznato da je prediktor SVR, je u našoj studiji imalo pozitivan prediktorni

značaj tj. pacijenti sa ovim genskim polimorfizmom su značajno češće imali stabilan SVR i nakon dugogodišnjeg perioda praćenja. S obzirom na ovaj rezultat i činjenicu da je određivanje polimorfizama gena za IL28B relativno jednostavna i ekonomična analiza, sasvim je sigurno da ovaj test može imati veliku korist ne samo u predikciji SVR već i identifikaciji pacijenata kod kojih postoji rizik od nastanka kasnog virusološkog relapsa (pacijenti sa non CC genotipom), pa i potrebe za ponovnim HCV RNK PCR tokom follow-up perioda.

Kada je reč o problemu kasnog virusološkog relapsa, do sada publikovani rezultati su veoma oskudni i nekonkluzivni [31]. Najveći ograničavajući faktor za pouzdaniju analizu prediktora su mali uzorci pacijenata, zbog izuzetno niske stope kasnog relapsa, kao i čestog rasipanje pacijenata nakon dugogodišnjeg follow up-a, što je ograničenje i ove studije. U poglavlju „Ograničenja studije“ će biti detaljnije diskutovani i drugi potencijalni problemi ( kao što su prag detekcije molekularnih testova i rizik od reinfekcije), koji mogu imati uticaja na konačne rezultate i zaključke.

Analiza biohemijskih parametara u okviru višegodišnjeg perioda praćenja predstavlja tehnički jednostavan postupak, koji je ekonomičan i izvodljiv, bez obzira na klinički milje. Veliki broj studija pokazuje da je terapijski uspeh (postignut SVR, bez obzira na terapijski protokol) praćen i biohemijskom remisijom, osim u slučaju konkomitantnog hepatološkog oboljenja, abuzususa alkohola, kao i progresije steatoze jetre [128,136,230].

Lau i autori su pokazali da je kod svih pacijenata u slučaju terapijskog neuspeha, detektibilna HCV RNK bila praćena povremenim ili perzistentno povišenim vrednostima serumskih transaminaza, u odsustvu sekundarnog hepatološkog razloga [240].

Slični zaključci su publikovani i kada je u pitanju dugogodišnji follow-up pacijenata sa ostvarenim SVR, gde se navode stabilne stope biohemijske remisije i do 99% pacijenata, čak i kod pacijenata sa virusološkim relapsom [128].

Međutim kako je poznato da čak i pacijenti sa komplikacijama (npr. HCC) mogu imati perzistentno normalne vrednosti enzima jetre, praćenje samo biohemijskih parametara kod pacijenata, naročito u grupi sa teškim oštećenjem jetre, nije dovoljno [136,239].

Postoje i publikovane studije gde se povišena aktivnost ALT uz histološku aktivnost, dovodi u vezu sa prekomernim imunološkim odgovorom (intrahepatičkih citotoksičnih T limfocita), što rezultira pojavom niže viremije, pa se paradoksalno javlja situacija u kojoj je biohemijski profil pacijenta u negativnoj korelaciji sa viremijom [236]. Kompleksnu interakciju između viremije i biohemijskog odgovora odražavaju i rezultati naše studije, koji su pokazali da je biohemijski relaps iako češći, bez statistički značajne korelacije sa pojavom kasnog virusološkog relapsa.

Kada je reč o praćenju progresije fibroze, postoji veoma ograničen broj studija dugoročnog praćenja pacijenata sa SVR, kod kojih su sprovedene rebiopsije jetre radi reevaluacije patohistološkog nalaza i ishoda fibroze. Reichard i autori su u follow-up studiji od 23 pacijenata sa stabilnim SVR, rebiopsijom nakon 5 godina od završetka terapije, pokazali značajno poboljšanje patohistološkog nalaza (uz smanjenje prosečnih vrednosti skorova fibroze i inflamacije), a slično parcijalno poboljšanje je registrovano kod dva pacijenta sa kasnim virusološkim relapsom (kod oba pacijenta uz redukciju inflamacije, uz regresiju fibroze kod jednog i stacionaran nalaz skora fibroze kod drugog) [136].

Shiratori i saradnici su na značajno većem uzorku od 183 pacijenata sa SVR nakon rebiopsije posle 3,7 godina (medijana) pokazali značajnu povezanost SVR sa redukcijom fibroze od  $-0.60 \pm 0.07$  ( u periodu praćenja <3 godine) i  $-0.88 \pm 0.08$  ( nakon >3 godina praćenja posle postignutog SVR) prosečnu regresiju fibroze od  $-0.28 \pm 0.03$  jedinica/godišnje [241].

Tachi i autori su na studiji od 97 pacijenata sa SVR nakon prosečnih 5,8 godina pokazali regresiju fibroze kod 44 pacijenata (45%), progresiju kod 6% pacijenata i stacionaran nalaz kod 47 pacijenata (48%), dok u studiji George i autora nakon prosečnih 62 meseca praćenja nije bilo regresije fibroze kod 20% pacijenata na uzorku od 49 pacijenata sa SVR [137,139].

Ovakvi rezultati govore u prilog činjenici da je vremenski period između biopsija od velikog značaja u proceni fibrogeneze, nakon sprovedene terapije, a da se regresija fibroze, kao jedan veoma dugotrajan proces, može dovesti u vezu sa supresijom replikacije HCV [139,228,239].

U svakodnevnoj praksi, ishod fibrogeneze može uticati na nastanak kliničkih komplikacija HCV infekcije, uključujući incidenciju HCC. U već pomenutoj studiji Tachi i

autora su demonstrirana povezanost progresivne fibroze sa nastankom HCC tj. učestalost HCC je u grupi pacijenata sa progresijom fibroze bila statistički značajno veća (33%), u odnosu na pacijente sa regresijom ili stacionarnim nalazom fibroze (4%), nakon 5 godišnjeg perioda praćenja [139].

Rezultati naše studije u kojoj je korišćen Fibroscan kao neinvazivna metoda, su pokazali stacionaran nalaz kod najvećeg broja pacijenata sa SVR (90,4%), uz regresiju skora fibroze kod 8 (5,5%) pacijenata, za period praćenja od 50 meseci (medijana). Progresija fibroze je konstatovana kod 6 pacijenata (4,1%), koji su takođe imali i detektibilnu viremiju (kasni relapsi).

Marugan i autori su na uzorku od 80 pacijenata (koju je činilo 92% pacijenata sa lakšim bazalnim oštećenjem jetre) pokazali povezanost nedetektibilne viremije tokom follow-up perioda od 4 godine, sa stacionarnim nalazom fibroze (merenim serijskim Fibrosken snimanjima) uz regresiju fibroze kod 0,8% pacijenata, uz odličnu podnošljivost ove neinvazivne dijagnostičke metode [128]. Kada je reč o pacijentima sa teškom bazalnom fibrozom, čak i kod pacijenata sa stabilnim SVR postoje dokazi o povezanosti dugoročnog ishoda fibroze sa kliničkim komplikacijama (naročito pojavom HCC), što će biti diskutovano u nastavku.

Iako postoje dokazi o redukciji skorova fibroze merene Fibroskenom i u ovoj specifičnoj grupi pacijenata, otežavajući faktor u upotrebi i tumačenju neinvazivnih dijagnostičkih metoda može biti i činjenica da u prisustvu ciroze dolazi do remodelovanja arhitekture tkiva jetre čime se mogu dobiti potcenzjene vrednosti Fibroskena kod ovakvih pacijenata [242,243].

Uprkos činjenici da postoje kontradiktorni rezultati o pouzdanosti neinvazivnih dijagnostičkih procedura, kao što su Fibroscan, Fibrotest i markera (APRI, the FIB-4 index and the Forns index), rebiopsije u eri visoko efikasne i potentne DAA antivirusne terapije svakako više nisu opravdane, naročito u praćenju pacijenata sa postignutim SVR. Rebiopsije, kao invazivna dijagnostička procedura, pogotovo u grupi pacijenata sa cirozom jetre, povezane su sa značajnim rizikom od krvarenja i drugih neželjenih efekata.

U svakodnevnoj kliničkoj praksi u našoj sredini sprovedena je strategija dugogodišnjeg praćenja pacijenata sa preterapijskom teškom fibrozom, bez obzira na terapijski ishod i vrstu antivirusne terapije.

U našoj sredini do sada nije bilo publikovanih rezultata o dugoročnom ishodu, mimo SVR (naročito kod pacijenata sa cirozom), kao ni lokalnih preporuka ili vodiča koji bi dali jasne instrukcije o dužini i frekventnosti praćenja ovakvih pacijenata.

Međutim sada već višedecenijske kliničke opservacije u svakodnevnom ambulantnom radu, uprkos mnogim tehničkim (naročito dijagnostičkim ograničenjima), ukazuju na činjenicu da se kod terapijski iskusnih pacijenata sa teškim bazalnim oštećenjem jetre i dalje beleže neželjene kliničke komplikacije, uprkos postignutom SVR ili čak regresiji fibroze (ciroze) [239].

Poslednjih godina su mnogobrojne studije pokazale slične rezultate, koji su implementirani u formalnim preporukama Evropske asocijacije za ispitivanje jetre (EASL-European Association for the study of Liver) za post-terapijski follow-up pacijenata sa postignutim SVR. Kada je reč o pacijentima bez preterapijske ciroze, postignut SVR se poistovećuje sa izlečenjem, a periodični follow-up se ne savetuje, osim u slučaju preegzistentnih komorbiditeta ili kofaktora za bolest jetre (podatak o zloupotrebi alkohola, gojaznost, dijabetes melitus tip 2). Pacijentima sa postignutim SVR, koji su nalik na naše pacijente, preterapijski imali tešku fibrozu i cirozu (METAVIR skor >3), se preporučuje ehosonografski skrining na HCC svakih 6 meseci. Kod ovakvih pacijenata, koji su preterapijski imali i varikse jednjaka, se savetuje i ponavljanje endoskopije, iako su krvarenja iz variksa veoma retka nakon postignutog SVR [87].

Najčešći nepovoljan klinički ishod u ovoj grupi pacijenata i glavni razlog potrebe za doživotnim praćenjem je upravo rizik od pojave HCC. Nedvosmisleno je pokazano u mnoštvu studija da postizanje i održavanje SVR dramatično smanjuju rizik od pojave HCC, bez obzira na vrstu terapijskog protokola koji je korišćen, čak i kod pacijenata sa preterapijskom cirozom [239,240,241,244-246].

Morgan i autori su u svojoj velikoj metaanalizi pokazali da je SVR bio povezan sa trostrukim smanjenjem rizika za nastanak HCC (u odnosu na pacijente kod kojih nije postignuta nedetektibilna viremija) kod pacijenata sa različitim stepenom preterapijske fibroze [247]. Kada



je reč samo o pacijentima sa teškom fibrozom i cirozom, velika multicentrična follow-up studija van der Meera od 530 pacijenata je pokazala nakon 8,4 godina (medijana), kumulativnu incidenciju HCC od 5%, kod pacijenata sa stabilnim SVR u odnosu na 22% kod pacijenata, kod kojih nije postignut SVR, kao i procenjeni rezidualni rizik od nastanka HCC na 1000 pacijenata sa cirozom i SVR od 1% godišnje [248,249].

Publikovane godišnje incidencije se značajno razlikuju u zavisnosti od geografske regije- naročito kada se porede rezultati autora sa dalekog istoka (naročito u radovima Japanskih autora), gde se publikuju incidencije između 0,02% i 0,5% godišnje kod pacijenata sa postignutim SVR [250,251].

Naši rezultati po pitanju pojave HCC u toku višegodišnjeg perioda praćenja, u grupi pacijenata koji su ostvarili SVR, su slični drugim većim studijama koje su obuhvatile pacijente sa preterapijskom teškom fibrozom, pri čemu je HCC dijagnostikovao kod 7 pacijenata (3,3%). Prilikom analize mogućih preterapijskih prediktora za nastanak HCC, jedino su preterapijski povišene vrednosti AFP dostigle nivo statističke značajnosti, a tokom perioda praćenja porast AFP i pojava biohemijskog relapsa, što je u skladu sa višegodišnjim kliničkim opservacijama u ambulantnom praćenju naših pacijenata. Otežavajuća okolnost, vezana za interpretaciju AFP, su konfliktni rezultati koji se tiču veoma varijabilne dijagnostičke i prognostičke prediktivne vrednosti, a u zavisnosti od graničnih vrednosti ovog markera. Neki autori ukazuju na solidnu senzitivnost i specifičnost granice od 10 ng/ml u proceni rizika za nastanak HCC kod pacijenata sa HCV cirozom [252]. Međutim studija Trevisani i autora je pokazala da uprkos odličnoj specifičnosti visokog nivoa AFP (u ovoj studiji >200 ng/ml) senzitivnost ovakvog nalaza je iznosila svega 22% [253].

Ovakvi rezultati svakako opravdavaju stanovište doživotnog praćenja pacijenata sa najvećim rizikom za nastanak HCC (pacijenti koji su terapijski naivni ili sa terapijskim neuspehom), ali i pacijenata sa postignutim SVR i teškom fibrozom, jer praćenje pomenutih biohemijskih parametara i/ili otkrivanje biohemijskog relapsa su svakako lako dostupni i ekonomični u našem okruženju. Zanimljivo je da pojava virusološkog relapsa i progresije fibroze u našoj studiji nije dovedena u direktnu vezu sa nastankom HCC, što svakako govori u prilog multikauzalnoj prirodi onkogeneze kod HCC.

U našoj zemlji postoje veoma ograničeni publikovani podaci vezani za hepatocelularni karcinom, posebno kada je reč o pacijentima sa HCV infekcijom. Zdravstveno statistički godišnjak Instituta za javno zdravlje Batut sa poslednjim podacima iz 2015. godine je publikovao standardizovane stope incidencije za primarne tumore jetre (bez posebnog osvrta na HCC), koje su se kretale od 8,1 (za muškarce) i 3,1 (žene) na 100 000 stanovnika grada Beograda, dok su u centralnoj Srbiji incidencije 6,5 (za muškarce) i 3,7 (žene) na 100 000 stanovnika [254].

Kanazir i autori su u praćenju incidencije samo HCC u populaciji Beograda u periodu od 2004.-2007. godine, identifikovali 45 *de novo* dijagnostikovanih slučajeva HCC i pokazali statistički značajnu povezanost između nastanka HCC i prisustva anti-HCV antitela (bez osvrta na terapijski status i/ili detektibilnost HCV RНК), HBsAg pozitivnosti i dijabetes melitusa [255]. Ružić i autori su u desetogodišnjoj retrospektivnoj studiji iz 2014. godine u Kliničkom Centru Vojvodine analizirali 51 pacijenta sa HCV cirozom i HCC, od kojih su 38% pacijenata bili *non responderi* i kasni relapseri, a 1,9% pacijenata je imalo ostvaren SVR nakon primene interferona [256]. Autori su na populaciji starije strukture i značajno većom dužinom trajanja infekcije (dominantno posttransfuziono stečenom), uočili da je 26% obolelih imalo je povišene vrednosti AFP uz sličan zaključak našim rezultatima o značaju ovog markera u praćenju pacijenata sa cirozom jetre. Iako nisu analizirani mogući prediktori, u ovoj studiji su izneseni podaci o prosečnom preživljavanju (nezavisno od primenjenog terapijskog režima) koje je iznosilo svega  $1,39 \pm 1,61$  godina, dominantno zbog kasnog otkrivanja ali i ograničenih terapijskih mogućnosti za lečenje HCC u Srbiji [256].

Kada je reč o drugim kliničkim neželjenim ishodima, rezultati naše studije su pokazali da su najčešće pozne komplikacije (posle HCC), kod pacijenata sa postignutim SVR, pojava ascitesa (kod 4 pacijenata tj. 1,9%), tromboze v.porte (1,9%) i hepatičke encefalopatije (1,4%), slično drugim autorima, koji su pratili pacijente sa preterapijskom cirozom [257].

Zanimljivo je da Veldt i autori u velikoj kohortnoj studiji od 479 pacijenata iz 2007. godine nisu zabeležili ni jednu epizodu dekompenzacije jetrine funkcije (ishodi koji su u našoj studiji klasifikovani kao nepoželjni klinički ishodi-ikterus, ascites, hepatička encefalopatija, krvarenje iz variksa jednjaka) kod pacijenata sa teškom fibrozom i postignutim SVR, nakon medijane praćenja od 2,1 godine- što je značajno kraći follow-up period u odnosu na dizajn naše studije [258]. Međutim nakon produžetka follow-up perioda na 8,4 godina, registrovana je

nekolicina pacijenata, kod kojih je ipak došlo do pojave dekompenzacije jetre, uprkos postignutom SVR, mada je terapijski uspeh i nedetektibilna viremija i nakon tog perioda bila značajan negativan prediktor nepovoljnih kliničkih ishoda [249].

U ovoj studiji su po prvi put analizirane uloge genskih polimorfizama u dugoročnoj prognozi pacijenata sa teškim oštećenjem jetre izazvanim HCV infekcijom.

Posebno je nalizirana zastupljenost *UGT1A1\*28* genotipa, koja je ispitivana na uzorku od 42 pacijenata iz studijske kohorte, što predstavlja prve publikovane rezultate u populaciji pacijenata sa HCV infekcijom u našoj zemlji.

Već je pomenuto da je ovaj alel veoma zastupljen u zemljama naše okoline (podaci se kreću od 12,5% u Makedoniji do 16,7% u Italiji), a Vuković i autori su na uzorku od 100 zdravih anti-HCV negativnih osoba iz Srbije, pronašli zastupljenost od 16% [177,178].

Međutim u našem uzorku od 42 pacijenata sa HHC zastupljenost je bila značajno veća – čak 23,8%, što je među višim publikovanim prevalencijama (doduše publikovani rezultati se odnose na zdrave dobrovoljne davaoce krvi), mada se najviše prevalence beleže u Afričkim zemljama i do 43% [177].

Kada je reč isključivo o populaciji pacijenata sa HCV infekcijom, naša zastupljenost je takođe značajno visoka u odnosu na do sada publikovane rezultate stranih autora iz velikih multietničkih populacija pacijenata sa HCV infekcijom (Urbanek i saradnici 15,7%, Souza i saradnici 10,4%) [171,179].

Moguće je da je prava zastupljenost ovog genotipa zapravo mnogo viša tj. da su publikovani rezultati potcenjeni, kako se i dijagnoza Gilbertovog sindroma često previdi zbog promenljivih kliničkih znakova. Subklinički Gilbertov sindrom se javlja znatno češće, zbog inkompletne penetrantnosti pomenute mutacije, ali i drugih urođenih i stečenih poremećaja metabolizma bilirubina, koji mogu uticati na kliničku prezentaciju, pa time i na indikaciju za genetskim ispitivanjem u pravcu Gilbertovog sindroma.

Takođe, specifičnost naše studijske grupe se ogleda u njenoj genetskoj homogenosti, kako su svi pacijenti istovetnog etničkog porekla. Ograničenja ove analize i interpretacije rezultata se prevashodno odnose na veličinu uzorka, što će biti diskutovano u daljem tekstu.

U ispitivanoj grupi naših pacijenata prisustvo *UGT1A1*\*28 genotipa je uticalo na preterapijske vrednosti ukupnog bilirubina i feritina, što su takođe zaključci dve velike studije Piekuse i saradnika, kao i de Souza i saradnika [171,180]. Hiperbilirubinemija, koja kod pacijenata sa *UGT1A1*\*28 genotipom nastaje zbog smanjene aktivnosti enzima UDP-glukuronoziltransferaze, može biti veoma visoka, naročito na početku primene ribavirina (kako sa primenom interferona, tako i u kombinaciji sa DAA) [181,259]. Neosporno je da u slučaju pojave ikterusa tokom primene ribavirina, genotipizacija može dati adekvatno objašnjenje za pojavu hiperbilirubinemije i na taj način isključiti ribavirinom-indukovanu hemolizu, čime može izbeći neopravdano ukidanje/subdoziranje ovog leka.

Značajno je napomenuti da osim farmakogenetskog značaja ovog genotipa, hiperbilirubinemija kod ovih pacijenata može dovesti do negativne selekcije i isključivanja iz kliničkih studija, ali i precenjivanja stepena oštećenja jetre (Child-Pugh i MELD skor) [181,182].

Osim hiperbilirubinemije, povezanost *UGT1A1*\*28 genotipa sa vrednostima serumskog feritina kod pacijenata sa HHC su takođe uočili i Piekuse i autori što je i očekivano, jer su serumski markeri gvožđa (feritin i transferin) često korišćeni kao pomoćni markeri fibroze i nekroinflamacije jetre [171]. Naši rezultati su pokazali povezanost ispitivanog genotipa sa nižim vrednostima feritina (mada bez povezanosti sa stepenom fibroze jetre), što može ukazati na grupu pacijenata sa potencijalno efikasnijim odgovorom na antivirusnu terapiju.

Naši rezultati nisu pokazali da postoji povezanost između prisustva *UGT1A1*\*28 genotipa i drugih markera vezanih za HCV infekciju-preterapijske viremije, genotipa virusa, kao i već pomenuto odsustvo povezanosti sa preterapijskim stepenom fibroze, slično već publikovanim rezultatima Urbanek i saradnika [179].

U tekstu je već diskutovana kompleksna priroda patogeneze fibroze kod HHC, u kojoj učestvuju genetski determinisani faktori, apoptoza, imunološki posredovani mehanizmi i oksidativni stres. Nedostatak povezanosti ispitivanog genotipa sa fibrozom jetre može biti u vezi i sa drugim faktorima vezanih za samu HCV infekciju-kao što su dužina trajanja infekcije i dob pacijenta u momentu inficiranja, BMI, komorbiditeti i faktori sredine [260].

U našoj studiji su po prvi put ispitivani i publikovani rezultati, koji ukazuju na odsustvo povezanosti *UGT1A1*\*28 genotipa sa dugoročnim ishodima kod pacijenata sa teškom fibrozom i

cirozom, koji su postigli SVR, i to pojavom kasnog virusološkog relapsa, progresije fibroze i pojavom HCC [261]. Ovo su prvi rezultati te vrste, i pretragom literature nisu pronađene studije drugih autora, koje bi omogućile poređenje sa našim rezultatima.

Već je diskutovan razlog mogućeg odsustva ove povezanosti, kada je u pitanju progresija fibroze, a samim time i pojave nepovoljnih ishoda (HCC). Odsustvo povezanosti sa pojavom kasnog virusološkog relapsa se takođe ogleda kroz već pomenut izostanak korelacije sa osnovnim preterapijskim markerima vezanim za HCV.

U odsustvu literaturnih podataka koji se bave ovom problematikom, kao i ograničenim uzorkom, veoma je teško doneti definitivne zaključke o značaju ovog polimorfizma u dugoročnoj prognozi pacijenata sa HHC.

Kada je reč o polimorfimima gena za IL28B, brojne studije stranih autora, kao i domaći autori Lazarević i saradnici, Đorđević J, su nedvosmisleno doveli u vezu povoljan CCrs12979860 genotip sa postizanjem SVR [155,157,161,262].

Prediktorna moć CC genotipa kod G1 HCV infekcije je iskorišćena za proizvodnju komercijalnog testa (koji je jednostavan za izvođenje i jeftin), čime je značajno unapređena efikasnost RGT protokola baziranih na interferonu. Međutim rezultati najnovih studija ukazuju i na potencijalni značaj određivanja polimorfizama gena IL28B i u eri DAA, naročito kada je u pitanju predikcija ranog virusološkog odgovora i progresije fibroze [163,164,168].

Međutim kada je u pitanju ishod HCV infekcije nakon perioda praćenja, postoje vrlo oskudni i konfliktni rezultati, naročito kada je reč o mogućoj povezanosti određenih genotipova IL28B sa nekroinflamacijom i fibrogenezom [165-168]. U našoj zemlji osim pomenutih domaćih autora, koji su analizirali SVR, nema rezultata bilo kakvih studija, u kojima je analiziran dugoročni značaj ovih genskih polimorfizama.

Rezultati naše studije su pokazali da postoji značaj genotipizacije IL28B u predikciji dugoročne stabilne nedetektibilne viremije i nakon postignutog SVR, kod pacijenata sa najtežim oštećenjem jetre.

Pokazano je da je prisustvo povoljnog genotipa CCrs12979860 nezavisni prediktor dugoročne supresije HCV replikacije, nakon postignutog SVR, što predstavlja prve rezultate te

vrste, jer je do sada ovaj genotip korišćen isključivo za predikciju spontane eliminacije HCV i postizanja SVR [263]. Klinički nepovoljniji genotip TTrs12979860, iako značajno češći kod pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom, nije bio statistički značajan u predikciji ovog neželjenog ishoda. Manjak podataka vezanih za ovu pojavu svakako se može objasniti malim brojem pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom, što zbog stabilnosti SVR, ali i zbog dugogodišnjeg osipanja pacijenata tokom follow-up perioda (poglavlje o ograničenjima studije).

Pitanje povezanosti polimorfizama IL28B sa progresijom fibroze je bolje proučeno, mada su rezultati krajnje kontradiktorni. Naši rezultati nisu pokazali vremenski zavisnu povezanost između genotipova IL28B i progresije fibroze, kao ni protektivan efekat CC genotipa na fibrogenezu, slično rezultatima studije Nourredina i saradnika [165]. Međutim Falletti i autori su u svojoj studiji iz 2011. godine na uzorku od 629 terapijski iskusnih pacijenata, pokazali kontradiktorne rezultate i dokazali korelaciju između prisustva T alela i težine fibroze [166].

Takođe naši rezultati nisu doveli u vezu nastanak HCC, kao jednog od poznih neželjenih kliničkih ishoda, sa genotipom IL28B, slično rezultatima Savina i saradnika. Savino i saradnici su u velikoj prospektivnoj kohortnoj studiji 15 godina pratili terapijski iskusne i terapijski naivne pacijente sa HHC i cirozom jetre bez povezanosti genotipova IL28B sa smrtnim ishodom i neželjenim kliničkim ishodima-dekompenzacijom ciroze i pojavom hepatocelularnog karcinoma [264]. U ovoj studiji, autori nisu uzeli u obzir stabilnost virusološke supresije u podgrupi pacijenata sa ostvarenim SVR, niti je analizirana povezanost sa pojavom kasnog virusološkog relapsa.

Kada je reč o inflamaciji, Nourredin i saradnici su u odsustvu veze sa fibrozom, ipak pronašli povezanost genotipova IL28B sa stepenom nekroinflamacije i dugoročnim kliničkim ishodima. Autori su objasnili ovaj paradoksalni rezultat činjenicom da su mehanizmi fibrogeneze multikauzalni i da mogu biti nezavisni od inflamacije. Rezultati drugih autora (Mehta i saradnici, Youssef i saradnici, D'Ambrosio i saradnici) nisu pokazali bilo kakvu povezanost između genotipova IL28B (naročito rs12979860 polimorfizma) i nekroinflamacije [265,266,267].

Veoma konfliktni rezultati, kada je u pitanju dugoročna prognoza pacijenata sa HCV infekcijom, svakako su posledica populacionih razlika u genetskom miljeu, kao i relativno malih

uzoraka (kao i nedostatak kontrolnih grupa anti HCV negativnih ispitanika) za donošenje definitivnih zaključaka, kada je reč o populacionoj genetici.

Razultati ove studije su nedvosmisleno pokazali pozitivne efekte uspešne antivirusne terapije, kada je u pitanju preživljavanje terapijski najzahtevnijih pacijenata. Rizik od smrtnog ishoda je bio 3,3 puta veći u grupi pacijenata kod kojih nije postignut SVR, što je u skladu sa literaturnim podacima u studijama koje su pratile pacijente sa preterapijskom teškom fibrozom i cirozom.

Van den Meer i autori su u velikoj multicentričnoj prospektivnoj studiji 530 pacijenata sa HCV infekcijom i teškom fibrozom, koji su praćeni 13 godina, jasno pokazali 4 puta manji rizik od smrtnog ishoda kod pacijenata koji su postigli SVR [249].

Morgan i autori su u okviru velike prospektivne HALT-C studije (koja je pratila dugoročne terapijske efekte kod pacijenata sa preterapijskom cirozom) pokazali nakon 7,5 godina praćenja značajnu razliku u kumulativnoj proporciji pacijenata sa smrtnim ishodom-i to 2,2% kod pacijenata sa postignutim SVR u odnosu na 27% *non-respondera* koji su neuspešno lečeni, kao i uz značajno niže količnike rizika (HR) u grupi SVR za sve vremenski zavisne ishode-smrtni ishod, potrebu za transplantacijom i nastanak HCC [268].

Fernandez Rodriguez i autori su takođe publikovali rezultate 5-godišnjeg mortaliteta, u okviru velike multicentrične studije koja je obuhvatila 568 pacijenata sa cirozom, i to 2% kod pacijenata sa SVR u odnosu na 14% kod *non-respondera* [269].

Naši rezultati su takođe pokazali da su nezavisni prediktori smrtnog ishoda (osim terapijskog neuspeha) bili starost preko 40 godina, prisustvo komorbiditeta, teška trombocitopenija i povišene vrednosti AFP. Zanimljivo je da nije pokazana razlika u rizicima u zavisnosti od genotipa HCV, što je bio slučaj u nekolicini studija, u kojima je genotip 3 infekcija dovedena u vezu sa bržom progresijom fibroze i steatozom [270].

Takođe, iako je uočena značajno veća zastupljenost višeg METAVIR skora među pacijentima koji su preminuli, prisustvo ciroze u odnosu na tešku fibrozu nije se pokazalo kao statistički značajan prediktor smrtnog ishoda u našoj kohorti, bez obzira na terapijski ishod. U već pomenutoj multicentričnoj studiji španskih autora, su među nezavisnim prediktorima

smrtnog ishoda kod pacijenata sa cirozom, jasno pokazali izostanak SVR, preterapijsku hipoalbuminemiju i prisustvo variksa jednjaka [269].

Slične prediktore navode i autori velike 10-godišnje multicentrične studije iz Kine, koji su takođe pokazali da su terapijski neuspeh, komorbiditeti (dijabetes melitus i hipertenzija-koje smo i mi pratili) i konzumiranje alkohola prediktori smrtnog ishoda, ali i preterapijski stepen fibroze i koinfekcija hepatitisom B [271]. Brojne studije su pokazale značaj starosti pacijenata, već pomenutog nivoa albumina, težine fibroze, komorbiditeta (pored pomenutih i gojaznost), a nekolicina čak i korelaciju sa dugogodišnjim pušenjem i posttransfuzijski stečenom infekcijom [5,91,93,271-273].

Posebno su zanimljivi rezultati koje smo dobili u grupi pacijenata sa postignutim SVR- među kojima je pokazano da kasni virusološki relaps, iako češće uočen, nije predstavljao nezavisni prediktor smrtnog ishoda.

Međutim, tokom perioda praćenja, biohemijski relaps, porast AFP i pojava neželjenih kliničkih ishoda (uključujući HCC), su se pokazali kao nezavisni prediktori smrtnog ishoda kod pacijenata, uprkos uspešnoj antivirusnoj terapiji. Ipak postoji značajan broj studija, koje su pokazale da je čak i u slučaju nastanka HCC, preživljavanje značajno više kod pacijenata sa postignutim SVR u odnosu na *non-repondere* [274].

Svakako ovakvi rezultati obavezuju na dugoročno praćenje pacijenata sa teškom fibrozom i cirozom, kako bi se što ranije dijagnostikovale potencijalno hirurški resektibilne promene, čak i kod pacijenata sa stabilnim SVR i dugogodišnjom nedetektibilnom viremijom.

Iako je u našoj studiji obuhvaćen solidan broj ispitanika, koji su detaljno analizirani i praćeni tokom dužeg vremenskog perioda, uzorak pacijenata koji je korišćen u analizi virusološkog i biohemijskog ishoda kod pacijenata sa SVR (n=209), kao i detekciji genetskih polimorfizama IL28B i UGT1A1 (n=42) je bio ograničen, uz razlike u dužini perioda praćenja. Sve ovo otežava interpretaciju podataka i donošenje zaključaka o celokupnoj populaciji pacijenata sa teškim oštećenjem jetre izazvanim HCV infekcijom.



Uprkos činjenici da su predstavljeni rezultati prvi publikovani ovakve vrste u našoj sredini, svakako je potrebno proširiti broj ispitanika, naročito kada je reč o populacionoj genetici, radi pouzdanije procene učestalosti pomenutih genskih polimorfizama. Jedan od razloga je etnička i geografska specifičnost svake populacije (kada su u pitanju zastupljenosti *UGT1A1\*28* i *IL28B CC* genotipovi), mada su rezultati koje smo dobili i prezentovali slični rezultatima publikovanim u zemljama našeg pokruženja na značajno većem uzorku ispitanika [162,178].

Dizajn studije na nivou zdravstvene ustanove tercijernog nivoa, kao i selekcija pacijenata sa preterapijskim teškim oštećenjem jetre, svakako predstavljaju selekциони bias, jer su imali uticaja na prosečnu starost ispitivane populacije i manju zastupljenost pacijenata iz populacije PWID. Kako je pokazano da su pacijenti sa teškom fibrozom/cirozom starije dobi, a da je u populaciji PWID veoma mali udeo pacijenata sa teškom preterapijskom lezijom jetre, moguće je da je starost naše kohorte precenjena, a zastupljenost pacijenata iz PWID potcenjena (zbog čega je moguće da je i zastupljenost *non-G1* infekcije u našoj kohorti precenjena) u odnosu na čitavu populaciju pacijenata sa HCV infekcijom.

Kada je reč o evaluaciji virusološkog ishoda jedan od glavnih ograničavajućih faktora predstavlja senzitivnost virusoloških testova. Iako je korišćen visoko osetljiv PCR test sa pragom detektibilnosti od 50 IU/ml, ne može se isključiti da bi se upotrebom osetljivijih molekularnih testova otkrilo još više pacijenata sa detektibilnom viremijom na kraju terapije (pravi terapijski neuspeh sa niskom viremijom), čime bi se smanjila mogućnost da se pacijenti kasnije tokom perioda praćenja pogrešno svrstaju u kategoriju kasnih relapsa.

U grupi pacijenata sa kasnim virusološkim relapsom nije mogla biti apsolutno isključena reinfekcija, jer nam nije bila dostupna metoda RNK sekvencioniranja, ali je kod svih pacijenata ponovljena genotipizacija, pa su mečovani genotipovi pre terapije i nakon virusološkog relapsa. Takođe treba napomenuti da u ovoj grupi od 14 pacijenata nije bilo podataka o ranijem/aktivnom konzumiranju intravenskih narkotika (što bi bio najveći rizik za reinfekciju), već je u najvećem broju bilo reč o pacijentima koji su naveli ranije transfuzije krvi/krvnih derivata kao potencijalni rizik za HCV infekciju (bez repetitivnih inokulacionih rizika).

U cilju procene fibrogeneze tokom perioda praćenja, korišćene su neinvazivne dijagnostičke metode (Fibrosken i ultrazvuk), dok rebiopsije nisu rađene. Stav autora je da u

ovom slučaju rebiopsije ne bi bile etički opravdane, pogotovo kada se uzmu u obzir rizik od komplikacija prilikom izvođenja ove intervencije (naročito kod pacijenata sa cirozom). Zbog toga je u rezultatima i diskusiji navedeno da je reč o proceni progresije/regresije fibroze, bez mogućnosti donošenja definitivnog zaključka. Kod izvesnog broja pacijenata nije mogla biti učinjena ni preterapijska (bazalna) biopsija jetre i patohistološki pregled zbog postojanja kontraindikacija za ovu intervenciju, što je objašnjeno u poglavlju Pacijenti i metode.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Kombinovana antivirusna terapija PEG-IFN i ribavirinom je u grupi terapijski najzahtevnijih pacijenata sa teškom fibrozom i cirozom jetre bila veoma uspešna, sa postignutim SVR kod 64,3% pacijenata, od kojih je 92,8% prethodno postiglo i ETR. Prediktori terapijskog uspeha u našoj studiji su bili postizanje nedetektibilne viremije nakon završetka terapije (ETR), starost < 40 godina, infekcija non-1 genotipom HCV i lakši bazalni stepen fibroze (niži METAVIR skor).

2. SVR predstavlja pouzdan laboratorijski marker terapijskog uspeha i nakon dugogodišnjeg praćenja kod pacijenata sa teškom preterapijskom fibrozom i cirozom, a u vezi je sa redukcijom neželjenih kliničkih ishoda i smanjenjem mortaliteta.

3. Stopa kasnog virusološkog relapsa je, kod pacijenata sa teškim oštećenjem jetre koji su postigli SVR, veoma niska i iznosi 6,7%, što je u skladu sa do sada publikovanim rezultatima stranih autora (0-9%). Jedini nezavisni prediktor kasnog virusološkog relapsa u našoj studiji bio je non-CC genotip IL28B, mada su među kasnim relapserima bili zastupljeniji pacijenti sa cirozom i visokom bazalnom viremijom.

4. Analizom polimorfizama gena za IL28B, pokazan je značaj genotipizacije IL28B u predikciji dugoročne stabilne virusološke supresije i nakon postignutog SVR. Pokazano je da je prisustvo povoljnog genotipa CC rs12979860 nezavisni prediktor dugoročne supresije HCV replikacije, nakon postignutog SVR, što predstavlja prve rezultate te vrste, jer je do sada ovaj genotip korišćen isključivo za predikciju spontane eliminacije HCV i postizanja SVR. Međutim genotipizacija IL28B nije bila od značaja u praćenju progresije fibroze, niti proceni rizika od natanka HCC.

5. Analizom polimorfizama gena za UGT1A1, uočena je visoka zastupljenost *UGT1A1\*28* genotipa (23,8%) među pacijentima. Ovaj genotip predstavlja značajan farmakogenetski faktor, koji može uticati na pojavu hiperbilirubinemije tokom primene antivirusne terapije, a koja nije u vezi sa primenom ribavirina. Prisustvo *UGT1A1\*28* genotipa je dovedeno u vezu sa

preterapijskim vrednostima ukupnog bilirubina i feritina. U ovoj studiji su po prvi put ispitivani i publikovani rezultati, koji ukazuju da prisustvo ovog genotipa nema uticaj na dugoročni ishod (kasni virusološki relaps, progresiju fibroze i pojavu HCC) kod pacijenata sa teškom fibrozom i cirozom, koji su postigli SVR.

6. Kod pacijenata sa teškim preterapijskim oštećenjem jetre, uprkos postignutom SVR i održavanju nedetektibilne viremije, postoji rizik od nepovoljnih kliničkih ishoda, od kojih je najčešći hepatocelularni karcinom (HCC). Pokazano je da su pojava biohemijskog relapsa i porast vrednosti AFP statistički značajni nezavisni prediktori, dok pojava kasnog virusološkog relapsa i progresija fibroze nisu imali prediktivnu vrednost za nastanak HCC.

7. Pacijenti sa uznapredovalim oštećenjem jetre, kod kojih je sprovedena uspešna kombinovana antivirusna terapija i postignut SVR, imali su tokom perioda praćenja više nezavisnih prediktora smrtnog ishoda, kao što su porast AFP, pojava biohemijskog relapsa i dekompenzacija (pojava neželjenih kliničkih ishoda).

8. Kod pacijenata sa postignutim SVR, pojava kasnog virusološkog relapsa i progresija fibroze nije dovedena u vezu sa povećanim rizikom od smrtnog ishoda.

9. Zbog postojanja rizika od nastanka neželjenih kliničkih ishoda i mogućnosti dalje redukcije mortaliteta u slučaju pravovremene dijagnostike HCC, opravdano je dugoročno praćenje pacijenata sa teškom fibrozom i cirozom, uprkos postignutom SVR sa dugogodišnjom supresijom virusne replikacije.

## 7. LITERATURA

1. Houghton M. Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int.* 2009; 29:82-8.
2. Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:1-15.
3. Li HC, Lo SY. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol.* 2015; 7 (10): 1377-89.
4. Nouroz F, Nouroz S, Shaheen G, Mujtaba G, Mujtaba S. An overview on hepatitis C virus genotypes and its control. *Egypt J Med Hum Genet.* 2015; 85:291-298.
5. Delić D. Hronični virusni hepatitis. Beograd: Zavod za udžbenike; 2012.
6. Muñoz de Rueda P, Fuentes Rodríguez JM, Quiles Pérez R, Medina G, Álvarez M, Ruíz C et al. Hepatitis C virus NS5A region mutation in chronic hepatitis C genotype 1 patients who are non-responders to two or more treatments and its relationship with response to a new treatment. *World J Gastroenterol.* 2017;23(25):4538-4547.
7. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(10):3805-9.
8. Uchida T, Imamura M, Kan H, Hiraga N, Hayes N, Tsuge M et al. Usefulness of humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus virology. *J Gen Virol.* 2017;98:1040–1047.
9. Chevaliez S, Pawlotsky JM. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan SL, editor. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology.* Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
10. Ploss A, Evans MJ. Hepatitis C virus host cell entry. *Curr Opin Virol.* 2012;2(1):14-9.
11. Forton DM, Taylor-Robinson SD, Thomas HC. Cerebral dysfunction in chronic hepatitis C infection. *J Viral Hepat.* 2003;10:81–86.

12. Ragab G, Hussein MA. Vasculitic syndromes in hepatitis C virus: A review. *J Adv Res.* 2016;8(2):99-111.
13. Khoury T, Chen S, Adar T, Jacob EO, Mizrahi M. Hepatitis C infection and lymphoproliferative disease: accidental comorbidities? *World J Gastroenterol.* 2014; 20(43): 16197-202.
14. Bürgel B, Friesland M, Koch A, Manns MP, Wedemeyer H, et al. Hepatitis C virus enters human peripheral neuroblastoma cells - evidence for extra-hepatic cells sustaining hepatitis C virus penetration. *J Viral Hepat.* 2011; 18(8):562-70.
15. Fletcher NF, Yang JP, Farquhar MJ, Hu K, Davis C, et al. Hepatitis C virus infection of neuroepithelioma cell lines. *Gastroenterology.* 2010; 139(4):1365-74.
16. Fishman SL, Murray JM, Eng FJ, Walewski JL, Morgello S, Branch AD. Molecular and bioinformatic evidence of hepatitis C virus evolution in brain. *J Infect Dis.* 2008; 197(4):597-607.
17. Deforges S, Evlashev A, Perret M, Sodoyer M, Pouzol S, Scoazec JY et al. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol.* 2004; 85(9):2515-23.
18. Marukian S, Jones CT, Andrus L, Evans MJ, Ritola KD, Rice C et al. Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology.* 2008; 48(6):1843-50.
19. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013;19:837–849.
20. Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, et al. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2007;13(17):2416-26.
21. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:3392–3396.

22. Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, et al. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology*. 1992;190:894–899.
23. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J*. 2011;8:161.
24. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):103-26.
25. Taherkhani R, Farshadpour F. Global Elimination of Hepatitis C Virus Infection: Progresses and the Remaining Challenges. *World J Hepatol*. 2017; 9(33):1239-1252
26. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59:318–327.
27. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, et al. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol*. 1997;78(2):321–328.
28. Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol*. 2005;5:131–139. [PubMed]
29. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap P L, Sherlock S, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*. 1994;19:13–18.
30. Takada N, Takase S, Takada A, Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol*. 1993; 17(3):277-83.
31. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. 1995; 171(6):1607-10.

32. Verma V, Chakravarti A, Kar P. Genotypic characterization of hepatitis C virus and its significance in patients with chronic liver disease from North India. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61:408–14.
33. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2016;22(34):7824-40.
34. Pham ST, Bull RA, Bennett JM, Rawlinson WD, Dore GJ, et al. Frequent multiple hepatitis C virus infections among injection drug users in a prison setting. *Hepatology*. 2010;52:1564–1572.
35. Yun H, Kim D, Kim S, Kang S, Jeong S, Cheon Y, et al. High prevalence of HBV and HCV infection among intravenous drug users in Korea. *J Med Virol*. 2008;80:1570–1575.
36. McNaughton AL, Thomson EC, Templeton K, Gunson RN, Leitch EC. Mixed genotype hepatitis C infections and implications for treatment. *Hepatology*. 2014;59(3):1209-10.
37. World Health Organization. (2017). Global hepatitis report 2017. World Health Organization. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255016>.
38. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(9):558-67.
39. Mitrovic N, Delic D, Markovic-Denic L, Jovicic M, Popovic N, et al. Seroprevalence and risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in Serbia: A multicentre study. *Dig Liver Dis*. 2015;47(7):572-6.
40. World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016–2021: towards ending viral hepatitis 2016.  
Dostupno: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf>.
41. Lazarus JV, Safreed-Harmon K, Thursz MR, Dillon JF, El-Sayed MH et al. The Micro-Elimination Approach to Eliminating Hepatitis C: Strategic and Operational Considerations. *Semin Liver Dis*. 2018; 38(3):181-192.



42. Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Yamazaki C, Okamoto H, Tsuda F, et al. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology*. 1992;16(5):1109-14.
43. Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control*. 1995;23(5):273-7.
44. Hernandez ME, Bruguera M, Puyuelo T, Barrera JM, Sanchez Tapias JM, Rodes J. Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *J Hepatol*. 1992;16(1-2):56-8.
45. Center for Behavioral Health Statistics and Quality (2014). 2013 National Survey on Drug Use and Health: Detailed Tables. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Rockville, MD. Dostupno: <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUH-DetTabs2013.pdf>
46. Hahné SJ, Veldhuijzen IK, Wiessing L, Lim T-A, Salminen M, Laar M van de. Infection with hepatitis B and C virus in Europe: a systematic review of prevalence and cost-effectiveness of screening. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13(1):181.
47. EMCDDA report Hepatitis C among drug users in Europe: epidemiology, treatment and prevention, Lisbon, July 2016.
- Dostupno: [http://www.emcdda.europa.eu/publications/insights/hepatitis-c-among-drug-users-in-europe\\_en](http://www.emcdda.europa.eu/publications/insights/hepatitis-c-among-drug-users-in-europe_en)
48. EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction), National Drug Report 2017 Serbia. Dostupno: [http://www.emcdda.europa.eu/publications/country-drug-reports/2017/serbia\\_en](http://www.emcdda.europa.eu/publications/country-drug-reports/2017/serbia_en).
49. EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction), EMCDDA National Report on Drug Situation in Serbia, 2014.
- Dostupno: <http://www.emcdda.europa.eu/html.cfm/index233204EN.html>.

50. Scheinmann R, Hagan H, Lelutiu-Weinberger C, Stern R, Des Jarlais DC, Flom PL, et al. Non-injection drug use and hepatitis C virus: a systematic review. *Drug Alcohol Depend.* 2007;89(1):1–12.
51. Macías J, Palacios RB, Claro E, Vargas J, Vergara S, et al. High prevalence of hepatitis C virus infection among noninjecting drug users: association with sharing the inhalation implements of crack. *Liver Int.* 2008;28(6):781–786.
52. Oliveira-Filho AB, Sawada L, Pinto LC, et al. Epidemiological aspects of HCV infection in non-injecting drug users in the Brazilian state of Pará, eastern Amazon. *Virol J.* 2014;11:38.
53. Grady GF, Chalmers TC. Risk of Post-Transfusion Viral Hepatitis. *N Engl J Med.* 1964;271:337–342.
54. Tobler LH, Busch MP. History of posttransfusion hepatitis. *Clin Chem.* 1997;43:1487–1493.
55. Selvarajah S, Busch MP. Transfusion transmission of HCV, a long but successful road map to safety. *Antivir Ther.* 2012;17(7):1423-9.
56. Roisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood.* 1993;81:412–418.
57. Zhubi B, Mekaj Y, Baruti Z, Bunjaku I, Belegu M. Transfusion-transmitted infections in haemophilia patients. *Bosn J Basic Med Sci.* 2009;9:271–277.
58. Posthouwer D, Plug I, van der Bom JG, Fischer K, Rosendaal FR, Mauser-Bunschoten EP. Hepatitis C infection among Dutch haemophilia patients: a nationwide cross-sectional study of prevalence and antiviral treatment. *Haemophilia.* 2005;11:270–275.
59. Katsoulidou A, Sypsa V, Tassopoulos NC, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in Greece: temporal trends in HCV genotype-specific incidence and molecular characterization of genotype 4 isolates. *J Viral Hepat.* 2006;13:19–27.
60. National Registry of Congenital Coagulopathies of the Republic of Serbia, the Blood Transfusion Institute.

Dostupno:[https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=EN&data\\_id=3497&Disease\(s\)/group%20of%20diseases=Von-Willebrand-disease&title=Von%20Willebrand%20disease&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3497&Disease(s)/group%20of%20diseases=Von-Willebrand-disease&title=Von%20Willebrand%20disease&search=Disease_Search_Simple)

61. Fissell RB, Bragg-Gresham JL, Woods JD, Jadoul M, Gillespie B, et al. Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: the DOPPS. *Kidney Int.* 2004;65:2335–2342.
62. Di Napoli A, Pezzotti P, Di Lallo D, Petrosillo N, Trivelloni C, Di Giulio S. Epidemiology of hepatitis C virus among long-term dialysis patients: a 9-year study in an Italian region. *Am J Kidney Dis.* 2006;48:629–637.
63. Sun J, Yu R, Zhu B, Wu J, Larsen S, Zhao W. Hepatitis C infection and related factors in hemodialysis patients in china: systematic review and meta-analysis. *Ren Fail.* 2009;31:610–620.
64. Espinosa M, Martn-Malo A, Ojeda R, Santamara R, Soriano S, et al. Marked reduction in the prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: causes and consequences. *Am J Kidney Dis.* 2004;43:685–689.
65. Mangia A, Burra P, Ciancio A, Fagiuoli S, Guido M, et al. Hepatitis C infection in patients with chronic kidney disease. *Int J Artif Organs.* 2008;31:15–33.
66. Thaler MM, Park CK, Landers DV, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet.* 1991; 338:17.
67. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med.* 1994; 330:744.
68. Sabatino G, Ramenghi LA, di Marzio M, Pizzigallo E. Vertical transmission of hepatitis C virus: an epidemiological study on 2,980 pregnant women in Italy. *Eur J Epidemiol.* 1996; 12:443.
69. Yeung LT, King SM, Roberts EA. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology.* 2001; 34:223.

70. Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: The HCV partners study. *Hepatology*. 2013; 57:881.
71. Tahan V, Karaca C, Yildirim B, Bozbas A, Ozaras R, Demir K, et al. Sexual transmission of HCV between spouses. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(4):821–824.
72. Lissen E, Alter HJ, Abad MA, et al. Hepatitis C virus infection among sexually promiscuous groups and the heterosexual partners of hepatitis C virus infected index cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993; 12:827.
73. Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Levey AS. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med*. 1991; 325:454.
74. Pfau PR, Rho R, DeNofrio D, et al. Hepatitis C transmission and infection by orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2000; 19:350.
75. Roth D, Zucker K, Cirocco R, et al. The impact of hepatitis C virus infection on renal allograft recipients. *Kidney Int*. 1994; 45:238.
76. Haley RW, Fischer RP. Commercial tattooing as a potentially important source of hepatitis C infection. Clinical epidemiology of 626 consecutive patients unaware of their hepatitis C serologic status. *Medicine (Baltimore)*. 2001; 80:134.
77. Parés A, Barrera JM, Caballería J, et al. Hepatitis C virus antibodies in chronic alcoholic patients: association with severity of liver injury. *Hepatology*. 1990; 12:1295.
78. Koff RS, Dienstag JL. Extrahepatic manifestations of hepatitis C and the association with alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 1995; 15:101.
79. Okazaki T, Yoshihara H, Suzuki K, et al. Efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. Comparison between non-drinkers and drinkers. *Scand J Gastroenterol*. 1994; 29:1039.
80. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol*. 1999; 31:9-16.

81. Loomba R, Rivera MM, McBurney R, et al. The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 33:559.
82. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology.* 2003; 125:80.
83. Chu CM, Yeh CT, Liaw YF. Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus. *Gut.* 1999; 45:613.
84. Maheshwari A, Thuluvath PJ. Management of acute hepatitis C. *Clin Liver Dis.* 2010; 14:169.
85. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology.* 2008;47(1):321–331.
86. Corey KE, Mendez-Navarro J, Gorospe EC, et al. Early treatment improves outcomes in acute hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *J Viral Hepat.* 2010; 17:201.
87. EASL. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018.  
Dostupno: <http://easl.eu/wp-content/uploads/2018/10/HepC-English-report.pdf>
88. Shin EC, Seifert U, Kato T, Rice CM, Feinstone SM, Klotzel PM, et al. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest.* 2006;116:3006–3014.
89. Larkin J, Bost A, Glass JI, Tan SL. Cytokine-activated natural killer cells exert direct killing of hepatoma cells harboring hepatitis C virus replicons. *J Interferon Cytokine Res.* 2006;26:854–865.
90. Dhingra S, Ward SC, Thung SN. Liver pathology of hepatitis C, beyond grading and staging of the disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(4):1357–1366.
91. McCaughan GW, George J. Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection. *Gut.* 2004;53(3):318–321.

92. Rustgi VK. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *J Gastroenterol*. 2007;42:513–521.
93. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. 2014;61:S58–S68.
94. Bandiera S, Billie Bian C, Hoshida Y, Baumert TF, Zeisel MB. Chronic hepatitis C virus infection and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Virol*. 2016;20:99–105.
95. Manns M, Buti M, Gane E, Pawlotsky JM, Razavi H, et al. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17006.
96. Liu Z, Pelfrey CM, Cotleur A, Lee JC, Rudick RA. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2001;112(1-2):153-62.
97. Bekisz J, Baron S, Balinsky C, Morrow A, Zoon KC. Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals*. 2010;3(4):994-1015.
98. Swain MG, Lai MY, Shiffman ML, et al. A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology*. 2010; 139:1593.
99. Russo MW. Antiviral therapy for hepatitis C is associated with improved clinical outcomes in patients with advanced fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; 4:535.
100. Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, et al. A sustained virologic response reduces risk of all-cause mortality in patients with hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011; 9:509.
101. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002; 347:975.
102. Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3:S97.
103. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol*. 2008; 49:634.

104. Yan KK, Guirgis M, Dinh T, et al. Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:3416.
105. Conjeevaram HS, Fried MW, Jeffers LJ, et al. Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. *Gastroenterology.* 2006; 131:470.
106. Kanwal F, White DL, Tavakoli-Tabasi S, et al. Many patients with interleukin 28B genotypes associated with response to therapy are ineligible for treatment because of comorbidities. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12(2):327–333.
107. Thompson AJ, McHutchison JG. Will IL28B polymorphism remain relevant in the era of direct-acting antiviral agents for hepatitis C virus? *Hepatology.* 2012;56:373–381.
108. Eslam M, Aparcero R, Kawaguchi T, et al. Meta-analysis: insulin resistance and sustained virological response in hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 34:297.
109. Ramcharran D, Wahed AS, Conjeevaram HS, et al. Associations between serum lipids and hepatitis C antiviral treatment efficacy. *Hepatology.* 2010; 52:854.
110. Rao GA, Pandya PK. Statin therapy improves sustained virologic response among diabetic patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2011; 140:144.
111. Bitetto D, Bortolotti N, Falletti E, et al. Vitamin A deficiency is associated with hepatitis C virus chronic infection and with unresponsiveness to interferon-based antiviral therapy. *Hepatology.* 2013; 57:925.
112. Rocco A, Compare D, Coccoli P, et al. Vitamin B12 supplementation improves rates of sustained viral response in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Gut.* 2013; 62:766.
113. Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* 2006;55(9):1350–1359.

114. Ferenci P, Shiffman ML, Fried MW, Sulkowski MS, Haeussinger D, Zarski J-P, et al. Early prediction of response to 40KDA peginterferon alfa-2a (PEGASYS) plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001;34:351.
115. Delić D, Mitrović N, Popović N, et al. Kombinovana antivirusno-imunomodulatorna terapija - primena pegilovanog interferona alfa-2a i ribavirina kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C. *Srp Arh Celok Lek*. 2012; 140(9-10): 612-8.
116. Jakovljevic M, Mijailovic Z, Jovicic BP, Canovic P, Gajovic O, et al. Assessment of viral genotype impact to the cost-effectiveness and overall costs of care for PEG-interferon-2 $\alpha$  + ribavirine treated chronic hepatitis C patients. *Hepat Mon*. 2013;13(6):e6750.
117. Simonović Babić J, Bojović K, Delić D, Katanić N, Mitrović N, Malinić J. Antiviral treatment of hepatitis C in Serbian prison setting: medical treatment outcomes and patients adherence. *Med Pregl*. 2016; 69(3-4):85-91.
118. Bojovic K, Simonovic J, Katanic N, Milosevic I, Pesic I, Delic D, et al. The comparison of chronic hepatitis C treatment outcome between intravenous drug users and non-intravenous drug users. *Biomed Pharmacother*. 2013 ;67(6):517-20.
119. Wilby KJ, Partovi N, Ford JA, Greanya E, Yoshida EM. Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol*. 2012;26(4):205–210.
120. Simonović-Babić Jasmina, Bojović Ksenija, Fabri Milotka, Kostić Velimir, Jovanović Maja, Mijailović Željko, et al. Boceprevir u hroničnom hepatitisu C genotip 1 - prva iskustva u Srbiji. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2015;143: 35-41.
121. Geddawy A, Ibrahim YF, Elbahie NM, Ibrahim MA. Direct Acting Anti-hepatitis C Virus Drugs: Clinical Pharmacology and Future Direction. *J Transl Int Med*. 2017;5(1):8–17.
122. McConachie SM, Wilhelm SM, Kale-Pradhan PB. New direct-acting antivirals in hepatitis C therapy: a review of sofosbuvir, ledipasvir, daclatasvir, simeprevir, paritaprevir, ombitasvir and dasabuvir. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2016;9(2):287-302.
123. Milošević I, Karić U, Pešić-Pavlović I, Stevanović G, Barać A, Smiljanić M, et al. Successful treatment of chronic hepatitis C in a hemodialysis. *J Infect Dev Ctries*. 2018; 12:142-



124. Simonović-Babić J, Bojović K, Fabri M, Cvejić T, Svorcan P, Nožić D, et al. Real-life data on the efficacy and safety of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir plus dasabuvir plus ribavirin in the patients with genotype 1 chronic hepatitis C virus infection in Serbia. *Vojnosanit Pregl.* 2019; 76: 531-536.
125. Radević B. *Transplantacija jetre.* Beograd: IP Zavet; 1996:32-36.
126. Abdel-Hakeem MS, Shoukry NH. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Front Immunol.* 2014;5: 274.
127. Grebely J, Hajarizadeh B, Dore GJ. Direct-acting antiviral agents for HCV infection affecting people who inject drugs. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017; 14(11):641-651.
128. Marugan MT, Tamayo J, Mendoza J, et al. Long-term outcome of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin. *World Journal of Gastroenterology.* 2011; 17(4):493-8.
129. Lu Y, Andonov A, Wong D. Hepatitis C virus late relapse after sustained virologic response from interferon and ribavirin treatment as confirmed by RNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 2014; 52: 367-369.
130. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Colby TV, Walewska-Zielecka B, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2005; 41:106–114.
131. Simmons B, Saleem J, Hill A, Riley RD, Cooke GS et al. Risk of Late Relapse or Reinfection With Hepatitis C Virus After Achieving a Sustained Virological Response: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2016;3:683–694.
132. Li QR, Zhang CJ, Xiong YL, et al. Long-term assessment of relapse and associated risk factors in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2012;20:353-356.
133. Uojima H, Murakami S, Nakatani S, et al. Late Relapse after a Sustained Virologic Response at 24 Weeks after Treatment with Daclatasvir and Asunaprevir Combination Therapy

for Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1b Infection with Liver Cirrhosis. *Intern Med.* 2018;57(7):951–956.

134. Ascher DB, Wielens J, Nero TL, et al. Potent hepatitis C inhibitors bind directly to NS5A and reduce its affinity for RNA. *Sci Rep.*2014; 4: 4765.

135. Kumada H, Suzuki F, Suzuki Y, et al. Randomized comparison of daclatasvir + asunaprevir versus telaprevir + peginterferon/ribavirin in Japanese hepatitis C virus patients. *J Gastroenterol Hepatol.*2016; 31: 14-22.

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

137. Serfaty L. Follow-up of patients with chronic hepatitis C and a sustained viral response. *Liver Int.* 2016; 36: 67-71.

138. Innes HA, Hutchinson SJ, Allen S, et al. Excess liver-related morbidity of chronic hepatitis C patients, who achieve a sustained viral response, and are discharged from care. *Hepatology.* 2011;54: 1547–1558.

139. Tachi Y, Hirai T, Miyata A, Ohara K, Iida T, et al. Progressive fibrosis significantly correlates with hepatocellular carcinoma in patients with a sustained virological response. *Hepatol Res.* 2015; 45: 238–246.

140. Fierro NA, Gonzalez-Aldaco K, Torres-Valadez R, Martinez-Lopez E, Roman S, Panduro A. Immunologic, metabolic and genetic factors in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2014;20(13):3443–3456.

141. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009;461:798–801.

142. Rivero-Juarez A, Gonzalez R, Camacho A, Manzanares-Martin B, Caruz A, et al. Natural killer KIR3DS1 is closely associated with HCV viral clearance and sustained virological response in HIV/HCV patients. *PLoS One.* 2013;8:e61992.

143. Fellay J, Thompson AJ, Ge D, Gumbs CE, Urban TJ, et al. ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature*. 2010; 464(7287):405-8.
144. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al . Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-a and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*.2009;41: 1105–1109.
145. Lagging M, Askarieh G, Negro F, Bibert S, Soderholm J, Westin J, et al. Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE* 2011;6: e17232.
146. Trépo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;54:60–69.
147. Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, Aghemo A, Del Menico B, De Nicola S, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;53:791–799.
148. Coppola N, Pisaturo M, Sagnelli C, Onorato L, Sagnelli E. Role of genetic polymorphisms in hepatitis C virus chronic infection. *World J Clin Cases*. 2015;3(9):807–822.
149. Yee LJ, Im K, Borg B, Yang H, Liang TJ. Interleukin-6 haplotypes and the response to therapy of chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun*. 2009;10:365–372.
150. Coppola N, Zampino R, Bellini G, Macera M, Marrone A, Pisaturo M, et al. Association between a polymorphism in cannabinoid receptor 2 and severe necroinflammation in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:334–340.
151. Valli De Re, Laura Gragnani, Elisa Fognani, et al. Impact of Immunogenetic IL28B Polymorphism on Natural Outcome of HCV Infection. *Biomed Res Int*. 2014;2014:710642.
152. Donnelly R, Kotenko S. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *JICR*. 2010;30 (8):555–564.

153. Li M, Liu X, Zhou Y, Shao B. Interferon- $\lambda$ s: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol.* 2009; 86 (1): 23–32.
154. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet.* 2009; 41:1105–1109.
155. Lagging M, Askarieh G, Negro F, Bibert S, Soderholm J, Westin J, et al. Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE.* 2011; 6:e17232.
156. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon and ribavirin therapy. *Nat Genet.* 2009; 41:1100–1104.
157. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009;461(7265):798–801.
158. Moini M, Azarpira N, Darai M, Sabet S, Geramizadeh B. Allele and Genotype Frequency of IL28B (rs12979860) in South Iranian population. *Middle East J Dig Dis.* 2015; 7(4):261-262.
159. Christoph S, Simone S, Alexandra D, et al. Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *J Hepatol.* 2011;54:415–421.
160. Tomokazu K, Nelson HC, Waka O, et al. Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b. *J Hepatol.* 2011; 54:408–414.
161. Lazarević I, Djordjević J, Čupić M, Karalić D, Delić D, Švrtlih N et al. The influence of single and combined IL28B polymorphisms on response to treatment of chronic hepatitis C. *J Clin Virol.* 2013;58(1):254-257.
162. Grgić I, Gorenec L, Gašpar M, Čerina M, Palininić A, Trupković M, et al. Interleukin-28B polymorphism in persons with chronic hepatitis C in Croatia. *CJI.* 2016; 36(2):69–73.

163. King LY, Chung RT. IL28B testing in a rapidly changing world: Still relevant? *J Hepatol.* 2013;58(5):847-9.
164. Osinusi A, Naggie S. The Role of IL28B Genotype Testing in the Era of Direct Acting Antiviral Agents. *Eur Gastroenterol Hepatol Rev.* 2012;1(2):33–39.
165. Noureddin M, Wright EC, Alter HJ, et al. Association of IL28B genotype with fibrosis progression and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C: a longitudinal analysis. *Hepatology.* 2013;58(5):1548-1557.
166. Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fornasiere E, Cmet S, et al. Role of interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype. *J Clin Immunol.* 2011;31(5):891-899.
167. Di Marco V, Bronte F, Calvaruso V, Capra M, Borsellino Z et al. IL28B polymorphisms influence stage of fibrosis and spontaneous or interferon-induced viral clearance in thalassemia patients with hepatitis C virus infection. *Haematologica.* 2012; 97(5): 679-86.
168. Fabrício-Silva GM, Poschetzky BS, de Mello Perez R, Dos Santos RC, Cavalini LT, Porto LC. Association of cytokine gene polymorphisms with hepatitis C virus infection in a population from Rio de Janeiro. *BrazilHepat Med.* 2015; 7:71-79.
169. Strassburg CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(6): 703-15.
170. Nagar S, Blanchard RL. Pharmacogenetics of uridine diphosphoglucuronosyltransferase (UGT)1A family members and its role in patient response to irinotecan. *Drug Metab Rev.* 2006;38(3):393.
171. De Souza M, Vaisberg V, Abreu R, Ferreira A, da SilvaFerreira C, Nasser P, et al. UGT1A1\*28 relationship with abnormal total bilirubin levels in chronic hepatitis C patients: Outcomes from a case-control study. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(11):e6306.
172. Radlović N. Hereditary hyperbilirubinemias. *Srp Arh Celok Lek.* 2014; 142(3-4): 257-60.

173. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol.* 2004;22:1382–8.
174. Culley CL, Kiang TK, Gilchrist SE, Ensom MH. Effect of the UGT1A1\*28 allele on unconjugated hyperbilirubinemia in HIV-positive patients receiving Atazanavir: a systematic review. *Ann Pharmacother.* 2013;47(4):561-72.
175. Tseng CS, Tang KS, Lo HW, et al. UDP-glucuronosyltransferase 1A7 genetic polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma risk and onset age. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:1758–63.
176. Berg AO, Armstrong K, Botkin J, Calonge N, Haddow J, Kaye C. et al. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group Recommendations from the EGAPP Working Group: Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? *Genet Med.* 2009;11(1):15-20.
177. Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, Verma IC, de Silva S, Arambepola M. et al. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (UGT1A1): Hematologic and evolutionary implications. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;31(1):98.
178. Vukovic M, Radlovic N, Lekovic Z, et al. UGT1A1 (TA)<sub>n</sub> Promoter Genotype: Diagnostic and Population Pharmacogenetic Marker in Serbia. *Balkan J Med Genet.* 2018;21(1):59–68.
179. Urbánek P, Leníček M, Muchová L, Subhanová I, Dušek L, Kaspříková N, et al. No association of promoter variations of HMOX1 and UGT1A1 genes with liver injury in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol.* 2011;10(4):445-51.
180. Piekuse L, Kreile M, Zarina A, et al. Association between inherited monogenic liver disorders and chronic hepatitis C. *World J Hepatol.* 2014;6(2):92-97.
181. Bizya N, Sarantuya G, Namdag B, Yang S. Interferon and ribavirin combination therapy are linked to severe indirect hyperbilirubinemia in patients with nt-211G > A variant of UGT1A1 gene A. *JFMA.*2015; 114: 1147-1148.

182. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001; 33: 464–470.
183. Radojković D, Kusić J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem*. 2000; 46(6): 883-4.
184. Hori K, Shin WS, Hemmi C, Toyo-oka T, Makino T. High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2003; 4:477-484.
185. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med*. 2006; 144: 705-14.
186. Rantala M, van de Laar MJ. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. *Euro Surveill*. 2008;13:21.
187. Saraswat V, Norris S, de Knegt RJ, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in select countries. *J Viral Hepat*. 2015; 22: 6-25.
188. Esmaili A, Mirzazadeh A, Carter GM, et al. Higher incidence of HCV in females compared to males who inject drugs: A systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat* . 2017;24(2):117–127.
189. Van Beek I, Dwyer R, Dore GJ, Luo K, Kaldor JM. Infection with HIV and hepatitis C virus among injecting drug users in a prevention setting: retrospective cohort study. *BMJ* .1998;317(7156):433–7.
190. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* .2013;57(4):1333–42.
191. Wang CC, Krantz E, Klarquist J, et al. Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance. *J Infect Dis*. 2007; 196: 1474-82.

192. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825-32.
193. Villa E, Vukotic R, Camma C, et al. Reproductive status is associated with the severity of fibrosis in women with hepatitis C. *PloS One*. 2012; 7:e44624.
194. Hayashi J, Kishihara Y, Ueno K, et al. Age-related response to interferon alfa treatment in women vs men with chronic hepatitis C virus infection. *Arch Intern Med*. 1998; 158: 177-81.
195. Knežević T. Evropsko istraživanje o upotrebi alkohola i drugih droga među mladima u Srbiji 2008. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije i Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović-Batut“; 2009.
196. Wilsnack RW, Wilsnack SC, Kristjanson AF, Vogeltanz-Holm ND, Gmel G. Gender and alcohol consumption: patterns from the multinational GENACIS project. *Addiction* 2009; 104: 1487-500.
197. Hezode C, Lonjon I, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Zafrani ES, Dhumeaux D. Impact of moderate alcohol consumption on histological activity and fibrosis in patients with chronic hepatitis C, and specific influence of steatosis: a prospective study. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1031-7.
198. Guidelines For Viral Hepatitis Surveillance And Case Management [database on the Internet] 2016. Dostupno: <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/index.htm>
199. Williams MJ, Lang-Lenton M. Progression of initially mild hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection. *J Viral Hep* 2011; 18 : 17-22.
200. Boccato S, Pistis R, Noventa F, Guido M, et al. Fibrosis progression in initially mild chronic hepatitis C. *J Viral Hep* 2006;8: 13-4.
201. M. Bourlière, D. Ouzan, M. Rosenheim, et al. Pegylated interferon- $\alpha$ 2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in a real-life setting: the Hepatys French cohort (2003–2007). *Antivir Ther* 2012;17: 101-110.



202. Working Group on viral hepatitis of the Ministry of Health of the Republic of Serbia. National Strategy of the Republic of Serbia for the Treatment of Viral Hepatitis, 2017. Available: <https://www.zdravlje.gov.rs/tekst/337323/radne-verzije-i-nacrti.php>
203. Chlabicz S, Flisiak R, Grzeszczuk A, Kovalchuk O, Prokopowicz D, Chyczewski L. Known and probable risk factors for hepatitis C infection: a case series in north-eastern Poland. *World J Gastroenterol* 2006;12(1):141–145.
204. Mazurek J. Hospital acquired infections caused by hepatitis C virus. *Przeegl Epidemiol* 2000;54:315–324.
205. Chlabicz S, Grzeszczuk A, Prokopowicz D. Medical procedures and the risk of iatrogenic hepatitis C infection: case-controlled study in north-eastern Poland. *J Hosp Infect* 2004;58:204–209.
206. Murphy EL, Bryzman SM, Glynn SA, Ameti DI, Thomson RA, et al. Risk factors for hepatitis C virus infection in United States blood donors. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). *Hepatology* 2000; 31(3):756-62.
207. Navaneethan U, Kemmer N, Neff GW. Predicting the probable outcome of treatment in HCV patients. *Therap Adv Gastroenterol* 2009;2(5):287–302.
208. De Moliner L, Pontisso P, De Salvo GL, et al. Serum and liver HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and histological features. *Gut* 1998;42:856-860.
209. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Haussinger D, et al. Combination of peginterferon alfa-2a plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347:975–982.
210. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001 Sep 22; 358(9286):958-65.
211. Sung H, Chang M, Saab S. Management of Hepatitis C Antiviral Therapy Adverse Effects. *Curr Hepat Rep*. 2011;10(1):33–40.

212. Russo MW, Fried MW. Side effects of therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124(6):1711-9.
213. Van Vlierbergh, H., Delanghe, J.R., De Vos, M., and Leroux-Roel, G. Factors influencing ribavirin-induced hemolysis. *J Hepatol.* 2001; 34: 911–916
214. Soza A, Everhart JE, Ghany MG, et al. Neutropenia during combination therapy of interferon alfa and ribavirin for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:1273–1279.
215. Lin KH, Hsu P, Yu HC, Lin CK, Tsai WL, et al. Factors linked to severe thrombocytopenia during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis c and pretreatment low platelet counts. *BMC Gastroenterol* 2012;12:7.
216. Pavlović Z1, Delić D, Marić NP, Vuković O, Jašović-Gašić M. Depressive symptoms in patients with hepatitis C treated with pegylated interferon alpha therapy: a 24-week prospective study. *Psychiatr Danub* 2011 Dec;23(4):370-7.
217. Maasoumy B, Vermehren J. Diagnostics in hepatitis C: the end of response-guided therapy? *Hepatology* 2015; 61:712–21.
218. Vermehren J, Kau A, Gärtner BC, Göbel R, Zeuzem S, Sarrazin C. Differences between two real-time PCR-based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. *J Clin Microbiol* 2008;46:3880–3891.
219. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* .2008;49:634–651.
220. Bruno S, Stroffolini T, Colombo M, et al. Sustained virological response to interferon-alpha is associated with improved outcome in HCV-related cirrhosis: a retrospective study. *Hepatology* 2007;45:579–587.
221. Hansen N, Obel N, Christensen PB, et al. Effectiveness of treatment with pegylated interferon and ribavirin in an unselected population of patients with chronic hepatitis C: A Danish nationwide cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2011; 11: 177.

222. Jung CH, Um SH, Kim TH, et al. Treatment Response and Long-Term Outcome of Peginterferon  $\alpha$  and Ribavirin Therapy in Korean Patients with Chronic Hepatitis C. *Gut Liver* 2016;10(5):808–817.
223. Poordad F, Flamm S. Virological relapse in chronic hepatitis C. *Antiviral Therapy* 2009; 14:303–313.
224. Marcellin P, Heathcote EJ, Craxi A. Which patients with genotype 1 chronic hepatitis C can benefit from prolonged treatment with the ‘accordion’ regimen? *J Hepatol.* 2007;47:580–587.
225. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr, Morgan TR, et al. Peginterferonalpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 2004; 140:346–355.
226. Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, et al. Hepatitis C minimal residual viraemia (MRV) detected by TMA at the end of PEG-IFN plus ribavirin therapy predicts posttreatment relapse. *J Hepatol.* 2006; 44:83–87.
227. Jacobson IM, Brown RS, Jr, Freilich B, et al. Peginterferon alfa-2b and weight-based or fixed-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology* 2007;46:971–981.
228. Chen Yi Mei SLG, Thompson AJ, Christensen B, et al. Sustained virological response halts fibrosis progression: a long-term follow-up study of people with chronic hepatitis C infection. *PLoS One* 2017;12(10):e0185609.
229. Buti M, Esteban R. Long-term outcome after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Annals of hepatology* 2007; 6(4):267-9
230. Marcellin P, Boyer N, Gervais A, Martinot M, Pouteau M, Castelnau C, Kilani A, et al. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med.* 1997; 15;127(10):875-81.
231. Ferreira S , Carneiro M, de Souza FF, Teixeira AC, Villanova MG, Figueiredo JF, Passos AD, et al. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C with sustained virologic response to interferon. *Braz J Infect Dis.* 2010; 14(4):330-4.

232. Lu Y, Andonov A, Wong D. Hepatitis C virus late relapse after sustained virologic response from interferon and ribavirin treatment as confirmed by RNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1): 367-369.
233. Kondo M, Tanaka K, Ikeda M, Arata S, Saito S, Sakaguchi T, et al. Hepatic HCV-RNA as a predictor of outcome after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 1996;11(3):236-40.
234. Larghi A, Tagger A, Crosignani A, Ribero ML, Bruno S, Portera G, et al. Clinical significance of hepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C demonstrating long-term sustained response to interferon-alpha therapy. *J Med Virol.* 1998;55(1):7-11.
235. Shindo M, Arai K, Sokawa Y, Okuno T. Hepatic hepatitis C virus RNA as a predictor of a long-term response to interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med.* 1995;122:586-591.
236. McHutchison JG, Poynard T, Esteban-Mur R, Davis GL, Goodman ZD, Harvey J, Ling MH, Garaud JJ, et al. Hepatic HCV RNA before and after treatment with interferon alone or combined with ribavirin. *Hepatology* 2002;35(3):688-93.
237. Gowans EJ. Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):85-98.
238. Ruzic M, Fabri M, Preveden T, Baculov K, Pete M, Stojsin A. Autoimmune manifestation of hepatitis C virus infection as a risk for late virological relapse after pegylated interferon and ribavirin therapy. *Vojnosanit Pregl.* 2018; 75:1233-1236.
239. Veldt BJ, Saracco G, Boyer N, Cammà C, Bellobuono A, Hopf U, et al. Long term clinical outcome of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to interferon monotherapy. *Gut* 2004;53(10):1504-8.
240. Lau DT, Kleiner DE, Ghany MG, Park Y, Schmid P, Hoofnagle JH. 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;28(4):1121-7.
241. Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, Kuroki T, et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med.* 2000;132(7):517-24.

242. Hezode C, Castera L, Roudot-Thoraval F et al. Liver stiffness diminishes with antiviral response in chronic hepatitis C. *Aliment Pharm Ther.* 2011;34:656–63.
243. D'Ambrosio R, Aghemo A, Fraquelli M et al. The diagnostic accuracy of Fibroscan for cirrhosis is influenced by liver morphometry in HCV patients with a sustained virological response. *J Hepatol.* 2013;59:251–56.
244. Singal AK, Singh, Jaganmohan S et al. Antiviral therapy reduces risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8:192–99.
245. Cardoso AC, Moucari R, Figueiredo-Mendes C et al. Impact of peginterferon and ribavirin therapy on hepatocellular carcinoma: incidence and survival in hepatitis C patients with advanced fibrosis. *J Hepatol.* 2010;52:652–57.
246. Pearlman BL, Traub N. Sustained virologic response to antiviral therapy for chronic hepatitis C virus infection: a cure and so much more. *CID.* 2011;889–900.
247. Morgan RL, Baack B, Smith BD et al. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med.* 2013; 158:329–337
248. Van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA* 2012;308:2584–93.
249. Van der Meer A, Feld, J, Hofer H, Almasio P, Calvaruso V, Fernandez-Rodriguez C et al. The risk for hepatocellular carcinoma among patients with chronic HCV infection and advanced hepatic fibrosis following sustained virological response. *Hepatology* 2013; 58: 280A.
250. Okanoue T, Itoh Y, Minami M, et al. Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage: a retrospective study in 1148 patients. *Viral Hepatitis Therapy Study Group. J Hepatol* 1999;30:653–9.

251. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Osaka Liver Disease Study Group. *Hepatology* 1998;27:1394–402.
252. Kumada T, Toyoda H, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, et al. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2011;46(4):536-44.
253. Trevisani F, D’Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol.* 2001;34:570-5.
254. Institut za javno zdravlje dr Milan Jovanović Batut (2018) Zdravstveno-statistički godišnjak republike Srbije 2018. Beograd, str 215. Dostupno: <http://www.batut.org.rs/download/publikacije/pub2018.pdf>
255. Kanazir M, Boricic I, Delic D, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma:a case-control study in Belgrade(Serbia). *Tumori* 2010; 96(6):911-7.
256. Ruzic M, Fabri M, Preveden T, Stojanovic S et al. Hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C-experience gained at Clinical Center of Vojvodina. *Med Pregl.* 2014; LXVII (Supl 2): 31-38.
257. Gramenzi A, Andreone P, Fiorino S, et al. Impact of interferon therapy on the natural history of hepatitis C virus related cirrhosis. *Gut* 2001;48(6):843–848.
258. Veldt BJ, Heathcote, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, Zeuzem S, et al. Sustained virologic response and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Ann Intern Med.* 2007; 147: 677–684.
259. Deterding K, Grüngreiff K, Lankisch TO, Potthoff A, Bahr MJ, et al. Gilbert's syndrome and antiviral therapy of hepatitis C. *Ann Hepatol.* 2009;8(3):246-50.
260. Mallat A, Hezode C, Lotersztajn S. Environmental factors as disease accelerators during chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2008; 48: 657-665.

261. Jordović J, Bojović K, Simonović Babić J, Gasić V, Kotur N, et al. Significance of UGT1A1\*28 Genotype in Patients with Advanced Liver Injury Caused by Chronic Hepatitis C. *J Med Biochem.* 37: 1–8, 2018.
262. Đorđević J. Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom. [doktorska teza]. Univerzitet u Beogradu; 2014. Dostupno na: [www.fedorabg.bg.ac.rs](http://www.fedorabg.bg.ac.rs) › get › bdef:Content › download
263. Jordovic J, Simonovic-Babic J, Gasic V, Kotur N, Zukic B, Pavlovic S, et al. IL-28B genotypes as predictors of long-term outcome in patients with hepatitis C-related severe liver injury. *J Infect Dev Ctries.* 2019; 13: 526-535.
264. Savino B et al. Interleukin-28b (IL-28B) Polymorphism Has No Impact on the Long-Term Outcome of Patients With HCV-Related Cirrhosis: A 15-Years Retrospective-Pro prospective Cohort Study. *Gastroenterology.* 2016; 142(5):S-945.
265. Mehta M, Hetta HF, Abdel-Hameed EA, et al. Association between IL28B rs12979860 single nucleotide polymorphism and the frequency of colonic Treg in chronically HCV-infected patients. *Arch Virol.* 2016;161(11):3161–3169.
266. Youssef SS, Abbas EA, Mostafa A, Omran MH, Barakat A, Seif SM. IL28B rs 12979860 predicts response to treatment in Egyptian hepatitis C virus genotype 4 patients and alpha fetoprotein increases its predictive strength. *J Interferon Cytokine Res.* 2014; 34(7):505-9.
267. D'Ambrosio R, Aghemo A, De Francesco R, Rumi MG, Galmozzi E, De Nicola S, et al. The association of IL28B genotype with the histological features of chronic hepatitis C is HCV genotype dependent. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(5):7213-24.
268. Morgan TR, Ghany MG, Kim HY, Snow KK, Shiffman ML, De Santo JL, et al. Outcome of sustained virological responders with histologically advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010;52(3):833-44.
269. Fernández-Rodríguez CM, Alonso S, Martínez SM, Forns X, Sanchez-Tapias JM, Rincón D, et al. Peginterferon plus ribavirin and sustained virological response in HCV-related cirrhosis: outcomes and factors predicting response. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(10):2164-72.

270. Probst A, Dang T, Bochud M, Egger M, Negro F, Bochud PY. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat.* 2011;18(11):745-59.

271. Zeng QL, Feng GH, Zhang JY, et al. Risk factors for liver-related mortality in chronic hepatitis C patients: a deceased case-living control study. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(18):5519–5526.

272. Grebely J, Raffa JD, Lai C, Kerr T, Fischer B, Kraiden M, et al. Impact of hepatitis C virus infection on all-cause and liver-related mortality in a large community-based cohort of inner city residents. *J Viral Hepat.* 2011;18:32–41.

273. Zakhari S. Bermuda Triangle for the liver: alcohol, obesity, and viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28:18–25.

274. Shiratori Y, Shiina S, Teratani T, Imamura M, Obi S, Sato S, et al. Interferon therapy after tumor ablation improves prognosis in patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Ann Intern Med.* 2003; 138: 299–306.



## BIOGRAFIJA

Jelena (devojačko: Nikolić) Jordović, rođena je 04.03.1983. godine u Beogradu, Republika Srbija. Maturirala je u Vanguard Highschool, Ocala, Florida, SAD.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2001. godine, a diplomirala u julu 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,14.

Doktorske akademske studije iz naučne oblasti Epidemiologija upisala je 2016. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Specijalističke studije iz oblasti Infektologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je 2015. godine sa ocenom odličan.

Od juna 2008. u radnom je odnosu u Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije, a u martu 2019. godine izabrana je u zvanje Kliničkog asistenta za užu naučnu oblast Infektivne bolesti na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Autor je više radova publikovanih u domaćim i međunarodnim časopisima.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jelena Jordović

broj upisa MF/ 5115/2016

### Izjavljujem

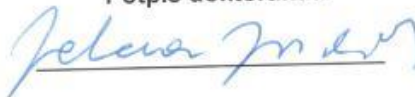
da je doktorska disertacija pod naslovom:

**„Uticaj stabilnog virusološkog odgovora na tok i ishod bolesti kod pacijenata sa teškom fibrozom ili cirozom jetre uzrokovanom hroničnom hepatitis C virusnom infekcijom“**

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

U Beogradu, 19.03.2020

Potpis doktoranda



Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Jordović

Broj upisa MF 5115/2016

Studijski program Epidemiologija

Naslov rada: „**Uticaj stabilnog virusološkog odgovora na tok i ishod bolesti kod pacijenata sa teškom fibrozom ili cirozom jetre uzrokovanom hroničnom hepatitis C virusnom infekcijom**“

Mentor Prof. dr Dragan Delić

Potpisani Jelena Jordović



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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.03.2020.



Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

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

**Uticao stabilnog virusološkog odgovora na tok i ishod bolesti kod pacijenata sa teškom fibrozom ili cirozom jetre uzrokovanom hroničnom hepatitis C virusnom infekcijom, koja je moje autorsko delo.**

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.03.2020.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.