

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

mr Snežana P. Jovanović-Ćupić

Konzervirana svojstva proteina virusa
hepatitisa C genotipa 1b kao prognostičkih
markera odgovora na kombinovanu terapiju
pegilovanim interferonom i ribavirinom

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Mr. sci. Snežana P. Jovanović-Ćupić

Conserved properties of Hepatitis C
genotype 1 b proteins as prognostic
markers of response to pegylated
interferon and ribavirin combination
therapy

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori

dr Sanja Glišić, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke “Vinča“

dr Goran Brajušković, docent Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

dr Maja Stanojević, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Darko Nožić, redovni profesor Vojnomedicinske akademije u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku i Laboratoriji za multidisciplinarna istraživanja Instituta za nuklearne nauke "Vinča".

Najveću zahvalnost dugujem dr Sanji Glišić (naučni saradnik INN Vinča), mom mentoru, na ukazanom poverenju, razumevanju, strpljenju, kao i na nesebičnoj pomoći i podršci u svakom segmentu izrade ove teze.

Veliku zahvalnost dugujem dr Goranu Brajuškoviću (docent Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu) na stručnoj pomoći, korisnim savetima, podršci i razumevanju tokom izrade disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Maji Stanojević (docent Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu) na nesebičnoj pomoći u idejnom rešavanju problema, kao i stručnim i prijateljskim savetima prilikom izrade ovog rada.

Zahvalnost dugujem i dr Darku Nožiću (prof. Vojnomedicinske akademije u Beogradu), članu komisije na stručnim savetima.

Želim da se zahvalim i dr Bogomiru Dimitrijeviću (naučni savetnik INN "Vinča"), rukovodiocu projekta na korisnim savetima i podršci da nastavim svoja istraživanja u oblasti hepatitis C virusa.

Zahvaljujem se dr Tanji Maksin (naučni savetnik INN "Vinča"), rukovodiocu projekta na razumevanju i savetima prilikom izrade teze.

Veliku zahvalnost dugujem mojoj kolegici dr Tamari Đurić-Delić (naučni saradnik INN "Vinča") na korisnim i prijateljskim savetima, kao i velikoj pomoći u statističkoj obradi podataka.

Zahvalnost na entuzijazmu, originalnim idejama i podsticanju da problem uvek posmatram sa više različitih strana dugujem dr Vesni Mandušić (naučni saradnik INN "Vinča").

Mojim kolegicama mr Mileni Krajnović i dipl.biolog Ani Božović bez kojih bi sve ovo bilo mnogo teže, zahvaljujem se na strpljenju, savetima i pomoći u svakom trenutku.

Želim da se zahvalim i svim kolegama iz moje laboratorije na prijateljskoj atmosferi i svakodnevnoj podršci, a posebno direktorki laboratorije dr Koviljki Krtolici-Žikić (naučni savetnik INN "Vinča") na korisnim i praktičnim savetima.

Veliku zahvalnost dugujem i kolegama iz Laboratorije za multidisciplinarna istraživanja Instituta za nuklearne nauke "Vinča";

mojoj porodici na razumevanju i podršci

Konzervirana svojstva proteina virusa hepatitisa C genotipa 1b kao prognostičkih markera odgovora na kombinovanu terapiju pegilovanim interferonom i ribavirinom

Rezime

Uvod: Infekcija virusom hepatitisa C (HCV) predstavlja značajan globalni zdravstveni problem koji često vodi ka hroničnoj bolesti jetre i cirozi. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije registrovano je preko 170 miliona ljudi inficiranih virusom HCV. Sadašnja standardna terapija hroničnog HCV-a kod pacijenata inficiranih genotipom *1b*, koji predstavlja najčešći genotip kako u SAD, zapadnoj Evropi i Srbiji, se sastoji od pegilovanog interferona u kombinaciji sa ribavirinom. Međutim, kombinovana terapija je praćena brojnim neželjenim efektima i dovodi do stabilnog virusološkog odgovora samo kod 50% pacijenata inficiranih genotipom *1*. Stoga bi jednostavan i pouzdan test, koji bi pre početka terapije mogao da predvidi virusološki odgovor, bio od velike koristi u kliničkoj praksi. ***Metode:*** Identifikacija konzervirane informacije sadržane u proteinima HCV koja korelira sa odgovorom na standardnu kombinovanu terapiju rađena je bioinformatičkom analizom. Uzorci plazme 48 pacijenata sa hroničnom infekcijom HCV, genotipa *1b* su klasifikovani u odnosu na odgovor na kombinovanu terapiju. Za određivanje primarne strukture proteina HCV primenjene su klasične metode molekularne biologije: reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (Rt-PCR), apsolutna kvantifikacija sa PCR-om u realnom vremenu i automatsko sekvenciranje. ***Rezultati:*** Na osnovu rezultata analize svih proteina virusa HCV utvrđeno je da je informacioni sadržaj proteina p7 u korelaciji sa odgovorom na kombinovanu terapiju. Rezultati dobijeni analizom proteinskih sekvenci, 48 pacijenata sa teritorije Srbije su u saglasnosti sa predloženim bioinformatičkim kriterijumom. Posebna pažnja je posvećena optimizaciji eksperimentalnih protokola i formiranju homogenenih grupa u odnosu na osobenosti virusa (tip i podtip) i odgovora na antivirusnu terapiju pacijenata. ***Zaključak:*** Na osnovu rezultata ove studije predložen je bioinformatički kriterijum koji omogućava procenu odgovora hroničnih HCV bolesnika inficiranih genotipom *1b* na kombinovanu terapiju.

Ključne reči: hepatitis C virus (HCV), bioinformatika, metod informacionih spektara, proteinske sekvence

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna virusologija

UDK broj: 578.2 : 578.833.2 (043.3)

Conserved properties of hepatitis C genotype 1 b proteins as prognostic markers of response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy

Abstract

Background: Hepatitis C virus (HCV) infection is a major and rising global health problem, affecting about 170 million people worldwide, according to WHO data, and often leading to chronic liver disease and cirrhosis. The current standard therapy for chronic HCV infection with pegylated interferon combined with ribavirin in patients with the genotype 1 infection, the most frequent genotype in the USA, Western Europe and Serbia, accompanied by numerous side effects, leads to a successful outcome in only about 50% of individuals. Therefore, simple and accurate prediction of hepatitis C treatment response is of great benefit to patients and clinicians. **Methods:** Identification of the conserved information of the HCV proteins that correlate with the combination therapy outcome was performed by bioinformatics analysis. Plasma samples of 48 chronic HCV patients from Serbia were classified according to the outcome of therapy. To determine primary structure of HCV proteins classical methods of molecular biology: reverse transcription and polymerase chain reaction (Rt-PCR), the absolute quantification-Real Time PCR and DNA sequencing were applied. **Results:** Among the HCV proteins that we have analyzed the informational property of the p7 of HCV genotype 1b was best related to the therapy outcome. Findings obtained from analyzing sequences 48 patients collected from Serbia were in perfect agreement with proposed bioinformatics criterion. Special attention was paid to optimization experimental protocols and forming homogeneous groups of patients regarding HCV genotype (type and subtype) and therapy response. **Conclusions:** On the basis of the results in the present study, a simple bioinformatics criterion that could be useful in assessment of the response of HCV-infected patients to the combination therapy has been proposed.

Keywords: Hepatitis C virus (HCV), Bioinformatics, Informational spectrum method, Protein sequence

Scientific field: Biology

Special topic: Molecular virology

UDC number: 578.2 : 578.833.2 (043.3)

Skraćenice

- ALT:** alanin aminottransferaza (*eng. alanine aminottransferase, ALT*)
- AST:** aspartat aminottransferaza (*eng. aspartate aminottransferase, ALT*)
- bp:** bazni par (*eng. base pairs, bp*)
- BPB:** brom fenol plavo (*eng. brom phenol blue, BPB*)
- BVO:** brzi virusološki odgovor (*eng. rapid virological response, RVR*)
- C-kor:** protein za virusni nukleokapsid (*eng. core protein, C*)-protein for nucleocapsid
- cDNK:** komplementarna DNK (*eng. complementary DNA, cDNA*)
- CLDN1:** transmembranski protein kladin 1 eng. (*eng. Claudine1, CLDN1*)
- DC-SIGN:** receptor na dendritskim ćelijama (*eng. dendritic cell, receptor, DC - SIGN*)
- ddH₂O:** dejonizovana destilovana voda (*eng. deionized water*)
- DEPC:** dietilpirokarbonat (*eng. diethylpyrocarbonate, DEPC*)
- DNK:** dezoksiribonukleinska kiselina (*eng. deoxyribonucleic acid, DNA*)
- DR:** pacijenti sa dobrim odgovorom na kombinovanu terapiju (*eng. marked responders, MR*)
- dsDNK:** dvolančana DNK, (*eng. double strand DNA*)
- ssDNK:** jednolančana DNK (*eng. single strand DNA*)
- E1 i E2:** proteini omotača hepatitis C virusa (*eng. envelope proteins, E1, E2*)
- EDTA:** etilendiaminotetraacetat (*eng. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA*)
- ER:** endoplazmatski retikulum (*eng. endoplasmatic reticulum, ER*)
- ESCRT:** endosomalni sortirajući kompleks zadužen za transport virusnih partikula (*eng. endosomal sorting complex required for transport, ESCRT*)
- EtBr:** etidijum bromid (*eng. ethidium bromide, EtBr*)
- EtOH:** etanol (*eng. ethyl alcohol, EtOH*)
- GTP:** guanozin tri fosfat (*eng. guanosine triphosphate, GTP*)
- HBV:** virus hepatitisa tipa B (*eng. hepatitis B virusa, HBV*)
- HCV:** virus hepatitisa tipa C (*hepatitis C virus, HCV*)
- HDL:** holesterol velike gustine (*eng. high density lipoprotein, HDL*)
- HIV:** virus humane imunodeficijencije (*eng. human immunodeficiency virus, HIV*)
- hnRNPSA1:** heterogeni nuklearni ribonukleoprotein (*eng. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPS A1*)

Hsp90: protein toplotnog šoka (*eng. heat shock protein, Hsp90*)

HVR: hipervarijabilni region (*eng. hypervariable region, HVR1*)

IFN: interferon (*eng. interferon, IFN*)

IRES: unutrašnje ribozomalno ulazno mesto (*eng. Internal Ribosome Entry Site, IRES*)

ISDR: interferon osetljivi region u delu NS5A genoma virusa (*eng. Interferon Sensivity Region, ISDR*)

IVN: intravenozni narkomani (*eng. intravenous drug users*)

LDL: holesterol male gustine (*eng. low density lipoprotein, LDL*)

LR: pacijenti sa lošim odgovorom na kombinovanu terapiju (*eng. poor responders, PR*)

L-SIGN: receptor na endotelnim ćelijama jetre i limfnih čvorova (*eng. liver and lymph node, L-SIGN*)

Met-tRNK: metionil-tRNK (*eng. Met-tRNA-methionine-RNA*)

MHC: veliki histokompatibilni kompleks (*eng. major histocompatibility complex, MHC*)

proteini Mx: (*eng. mixoviruses*)

NK: ćelije ubice (*eng. natural killer cell, NK*)

NS: nestrukturani proteini (*eng. non-structural proteins, NS*)

NR: izostanak odgovora na terapiju (*eng. non-response, NR*)

nt: nukleotid (*eng. nucleotid*)

NTR: netranslirajući region genoma hepatitis C virusa (*eng. non translated region, NTR*)

(2',5'-OAS): 2',5' oligoadenilat sintetaza (*eng. 2',5' oligoadenylate synthetase, 2',5'-OAS*)

OCN: ko-receptor okuldin (*eng. oculdine (co)-receptor, OCLN*)

PAA: poliakrilamid (*eng. poliakrilamide, PAA*)

PASA tehnika: PCR sa prajmerima specifičnim za određenu sekvencu tj. alel (*eng. polymerase amplification of specific alleles, PASA*)

PCR: lančana reakcija polimeraze (*eng. polymerase chain reaction, PCR*)

peg-IFN-α: pegilovani interferon alfa (*eng. pegilated interferon- α, peg-IFN-α*)

PKR: protein kinaza zavisna od dvolančane RNK (*eng. double-stranded (ds) RNA dependent protein kinase, PKR*)

PTB: polipirimidinski lanac (*eng. polypyrimidine tract binding proteins, PTB*)

RNK: ribonukleinska kiselina (*eng. ribonucleic acid, RNA*)

RE: relaps bolesti (*eng. relaps, RE*)

Rt: reverzna transkriptaza (*eng. reverse transcriptase, RT*)

RT-pufer: pufer za reverznu transkriptazu (*eng. RT-buffer*)

RT-PCR: reverzna transkripcija sa lančanom reakcijom polimeraze (*eng. reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR*)

R-TMQ: kvantitativni PCR u realnom vremenu (*eng. Real Time-PCR quantitative, R-TMQ*)

RVO: rani virusološki odgovor (*eng. early virologic response, EVR*)

SP: stablo-petlja (dvolančane strukture nastale na jednom lancu usled pojave palindromskih sekvenci) (*eng. stem-loop, SL*)

SR-BI: receptor čistač-B klase, tipa I (*eng. scavenger receptor class B type I, SR-BI*)

SVO: stabilan virusološki odgovor (*eng. sustained virologic response, SVR*)

TNF: receptor tumor nekrotični faktor (*eng. tumor necrosis factor, TNF*)

tRNK: transportna RNK (*eng. transfer (transport) RNA, tRNA*)

TRIS: tris hidroksimetil aminometan (*eng. tris hydroxymethyl aminomethane, TRIS*)

VAMP: receptor u vezikulama ER (*eng. vesicle - associated membrane protein, VAMP*)

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1.	Epidemiološke karakteristike hepatitisa C virusne infekcije	1
1.2.	Struktura hepatitisa C virusa	2
1.3.	Organizacija genoma HCV-a	2
1.4.	Karakteristike i funkcije proteina HCV	4
1.4.1.	Protein za nukleokapsid ili protein kor (C)	4
1.4.2.	Proteini omotača E1 i E2	5
1.4.3.	Protein p7	5
1.4.4.	Nestrukturirani protein NS2	6
1.4.5.	Nestrukturirani proteini NS3, NS4A i NS4B	6
1.4.6.	Nestrukturirani proteini NS5A i NS5B	7
1.5.	Životni ciklus virusa hepatitisa C	8
1.5.1.	Translacija HCV-a	10
1.5.1.1.	Obrada poliproteina HCV-a	12
1.5.1.2.	Replikacija HCV-a	12
1.5.1.3.	Formiranje i oslobađanje hepatitisa C virusa iz ćelije	13
1.6.	Genotipovi HCV-a	15
1.6.1.	Nomenklatura genotipova HCV-a	15
1.7.	Antivirusna terapija hroničnog C hepatitisa	17
1.7.1.	Mehanizam delovanja interferona i ribavirina	18
1.7.1.1.	Odgovor pacijenata sa hroničnim C hepatitisom na antivirusnu terapiju	19
1.7.1.2.	Faktori koji utiču na uspešnost antivirusne terapije	20
1.7.1.3.	HCV genotipovi i odgovor na terapiju	24
1.8.	HCV proteini i odgovor na antivirusnu terapiju	24
2	Ciljevi	27
3	Materijal i metode	28
3.1.	Materijal	28
3.2.	Metode	29
3.2.1.	Priprema uzoraka plazme za izolaciju ukupne RNK HCV	29
3.2.1.1.	Priprema laboratorijskog pribora za rad sa RNK	29

3.2.1.2.	Izolacija ukupne RNK iz humanih tkiva (plazme)	30
3.2.1.3.	Izolacija ukupne RNK iz plazme pomoću TRIzol™ reagensa.....	30
3.2.1.4.	Izolacija ukupne RNK hepatitis C virusa iz plazme za određivanje koncentracije RNK HCV na instrumentu Cobas Amplicor.....	31
3.2.1.5.	Izolacija RNK HCV iz plazme za kvantitativni PCR u realnom vremenu	32
3.2.1.6.	Određivanje koncentracije RNK HCV u plazmi ispitivanih pacijenata	34
3.3.	Amplifikacija p7 u genomu hepatitis C virusa - manuelna metoda	36
3.3.1.	Reamplifikacija PCR produkta.....	37
3.4.	Genotipizacija HCV-a	39
3.4.1.	Genotipizacija HCV-a pomoću PASA tehnike za C gen	39
3.4.2.	Određivanje HCV genotipova - genotip specifičnim PCR testom.....	42
3.5.	Elektroforetska provera rezultata RT-PCR reakcija i priprema poliakrilamidnog gela.....	43
3.5.1.	Metoda prečišćavanja PCR produkta	44
3.5.2.	Automatsko sekvenciranje p7.....	45
3.6.	Statistička obrada podataka	46
3.7.	Bioinformatička analiza.....	46
3.7.1.	Metod informacionih spektara (ISM).....	46
3.7.2.	Kompjutersko skeniranje proteina peptidima različitih dužina.....	48
3.7.3.	Sekvence HCV preuzete iz baza euHCV i Genbank koje su korišćene u bioinformatičkoj analizi.....	49
3.7.4.	Višestruko poravnavanje sekvenci	50
4	Rezultati.....	51
4.1.	Bioinformatička analiza primenom metode ISM	51
4.1.1.	Analiza ispitanika sa hroničnim C hepatitisom sa teritorije Srbije	58
4.2.	Opšte karakteristike uzorka	59
4.3.	Koncentracija ukupne RNK HCV u plazmi ispitanika sa hroničnim C hepatitisom	62
4.4.	Genotipizacija HCV-a PASA tehnikom.....	63
4.4.1.	Umnožavanje fragmenta P7 u genomu HCV - a (manuelna metoda)..	64

4.5.	Analiza strukture dela p7 genoma hepatits C virusa metodom automatskog sekvenciranja	65
4.5.1.	Bioinformatička analiza virusnih proteinskih sekvenci ispitanika sa teritorije Srbije.....	67
4.5.1.1.	Analiza povezanosti između aminokiselinskih varijanti u proteinu p7 hepatits C virusa i odgovora na kombinovanu terapiju.....	70
4.5.1.2.	Razlike u stepenu varijabilnosti između sekvenci NR i SVO	72
4.5.1.3.	Kompjutersko skeniranje proteina p7 peptidima različitih dužina.....	73
5	Diskusija	74
6	Zaključci.....	87
7	Literatura	88

1 Uvod

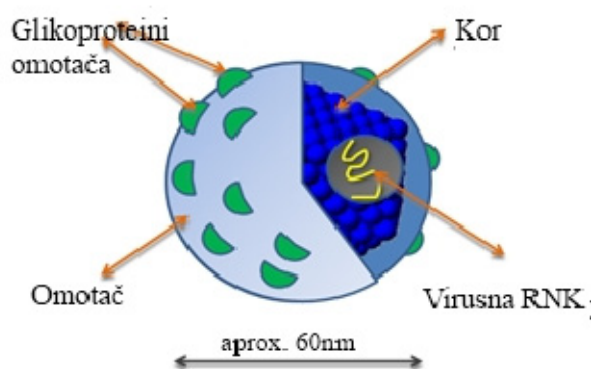
1.1. Epidemiološke karakteristike hepatitis C virusne infekcije

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) oko 170 miliona ili 3% svetske populacije je inficirano hepatitis C virusom (HCV) (Mühlberger i sar., 2009; Seeff i Hoofnagle., 2003; Shepard i sar., 2005). Stopa prevalencije varira u zavisnosti od: područja ili države i rizičnih skupina stanovništva, a kreće se od 0,6% kod dobrovoljnih davalaca krvi do 80% kod intravenskih narkomana IVN (Thorpe, 2000; Gibb i sar., 2000). U faktore rizika za transmisiju HCV-a ubrajaju se: intravensko konzumiranje narkotika, transfuzija krvi (Alter i Klein, 2008; Fischer i sar., 2005; Mathei i sar., 2005), transplantacija organa, hemodijaliza, profesionalni rizik kada se radi o zdravstvenim radnicima (Prus-Ustun i sar., 2005; Yazdanapanah i sar., 2005), seksualna transmisija i vertikalna transmisija sa stopom prenosa od 0 - 20% (Indolfi i Resti., 2009; Tajiri, 2001). Prema podacima SZO procenjuje se da se HCV - om inficira svake godine 3 - 4 miliona ljudi. Hronična HCV infekcija razvija se u 50 - 85% slučajeva (Pawlotsky, 2003; Wiese i sar., 2000) sa često teškim posledicama kao što su ciroza i hepatocelularni karcinom jetre (Chen i Than, 2005). Utvrđeno je da je HCV uzročnik nastanka oko 40% svih ciroza jetre i 60% hepatocelularnih karcinoma (Afdhal, 2004; Alter, 2007). Kofaktori kao što su: alkohol, gojaznost, koinfekcija virusom humane imunodeficijencije (*eng. human immunodeficiency virus, HIV*), bolesti jetre, ubrzavaju napredovanje bolesti ka cirozi jetre (Gheorghe i sar., 2009; McMahon i sar., 2009; Rafi i sar., 2011). Na osnovu dosadašnjih rezultata smatra se da HCV infekcija predstavlja najčešću indikaciju za transplantaciju jetre u razvijenim zemljama sveta (Hoofnagle sar, 2003, Manns i sar., 2012). Prevalenca HCV infekcije je različita i kreće se od 0.01% u Zapadnoj Evropi do 20 % u delovima Afrike i Azije, mada u Egiptu prevalenca dostiže čak i do 26% (Alter i sar., 2007).

Na osnovu dostupnih podataka smatra se da je oko 1% opšte populacije u Srbiji zaraženo HCV-om, a od toga je 3% zdravstvenog osoblja, 50% intravenoznih narkomana i preko 70% osoba na hemodijalizi (Ekspertska radna grupa za HCV, 2003).

1.2. Struktura hepatitis C virusa

Hepatitis C virus je identifikovan i kloniran od strane Choo i saradnika (1989). Po svojoj strukturi HCV je mali RNK virus prečnika 55 - 65 nm, ikozaedarne simetrije, sa omotačem za koji su vezana dva glikoproteina E1 i E2. HCV je klasifikovan u porodicu *Flaviviridae* i rod *Hepacivirus* (**Slika 1.1.**).

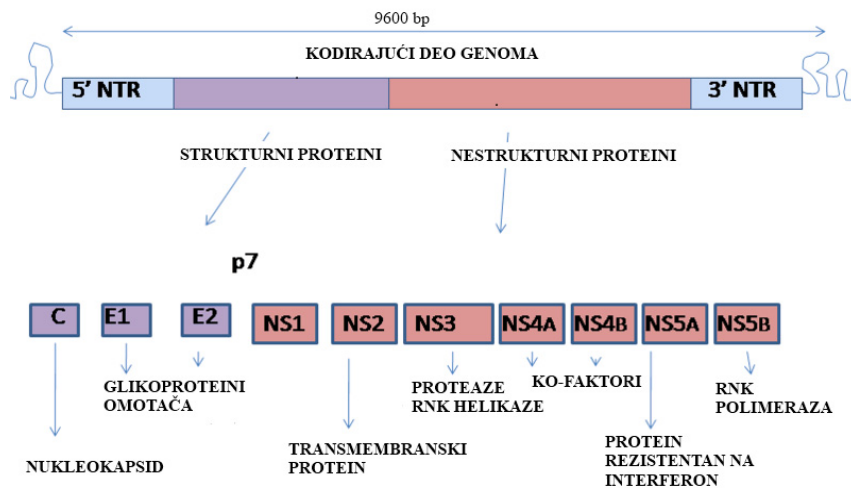


Slika 1.1. Izgled i struktura HCV-a (Colm G., Wikimedia Commons, 2008).

1.3. Organizacija genoma HCV-a

Genom virusa organizovan je u pozitivan jednolančani molekul RNK dužine oko 9600 nukleotida. Sastavljen od nekoliko funkcionalnih regiona (**Slika 1.2.**) i poseduje samo jedan otvoreni okvir čitanja za sintezu velikog poliproteina od 3010 aminokiselina. 5' kraj otvorenog okvira čitanja kodira strukturne proteine, protein kapsida (C) i glikoproteine omotača E1 i E2. 3' kraj otvorenog okvira čitanja kodira nestrukturne proteine: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B (Moradpour i sar., 2002).

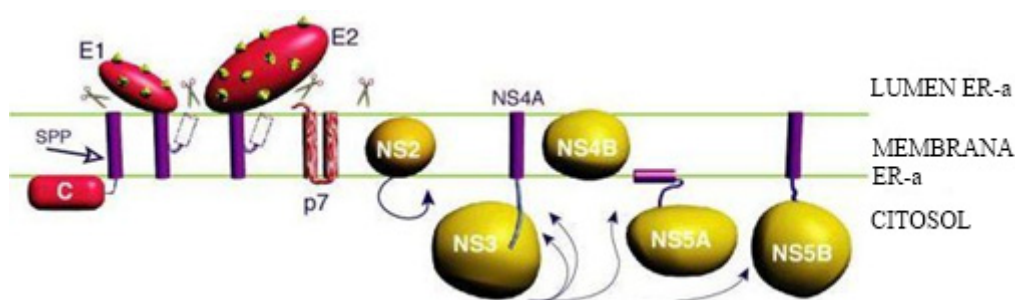
U okviru HCV genoma nalaze se i dva netranslirajuća regiona 5'NTR i 3'NTR, svaki na odgovarajućem kraju genomskog RNK molekula. Ovi regioni regulišu dva osnovna koraka u životnom ciklusu virusa: inicijaciju translacije i replikaciju virusa. Na osnovu analize nukleotidne sekvence R1 do R7 unutar 5'NTR-a određuju se genotipovi HCV-a (Simmonds i sar., 1994; Stuyver i sar., 1996; Okamoto i Mishiro, 1994). 3'NTR je sastavljen iz kratkog varijabilnog regiona, *poli-(U)* repa i visoko konzervativne sekvence od 98 nukleotida, neophodne za replikaciju virusa. Ovaj region igra važnu ulogu u samom početku sinteze negativnog lanca RNK (Friebe i Bartenschlager, 2002; Fraser i Doudna, 2007).



Slika 1.2. Organizacija genoma HCV-a. (Colm G., Wikimedia Commons, 2007).

1.4. Karakteristike i funkcije proteina HCV

Za vreme kao i nakon završetka translacije u obradi prekursorskog poliproteina učestvuju ćelijske i virusne proteaze na nivou membrane endoplazmatičnog retikuluma (ER). Kao rezultat ove obrade nastaje 10 proteina HCV (Lindenbach, 2001): tri strukturalna, protein P7 (između strukturalnih i nestrukturalnih proteina) i šest nestrukturalnih virusnih proteina (*Slika 1.3.*).



Slika 1.3. Izgled HCV poliproteina (euHCVdb, AF009606 - isolate HCV-H77).

1.4.1. Protein za nukleokapsid ili protein kor (C)

Nukleokapsidni ili protein kor (C) je strukturalni protein HCV-a, vezuje se za RNK i učestvuje u formiranju virusnog kapsida. Sastoji se iz tri regiona: amino (N) - terminalni hidrofilni domen D1, karboksilni (C) - terminalni hidrofobni domen D2 i dvadesetak aminokiselina (ak) na C terminalnom kraju koje predstavljaju signalni peptid za E1 (Boulant i sar., 2005; Li i sar., 2003). Domen D1 omogućava nuklearnu lokalizaciju kora i učestvuje u vezivanju za RNK, dok je domen D2 odgovoran za interakciju sa: membranama ER-a i spoljašnjom membranom mitohondrija. Utvrđeno je da se protein kor vezuje za protein E1 HCV-a i da su za ovu interakciju ključni C terminalni regioni interagujućih proteina (Lo i sar., 1996). Protein C zbog svoje visoke baznosti ima tendenciju stvaranja dimera i oligomera, dok N-terminalni deo kora

učestvuje u vezivanju za RNK i pakovanju virusne RNK (Santolini i sar., 1994). Protein C takođe direktno interaguje sa brojnim ćelijskim proteinima i proteinima koji učestvuju u signalnim putevima domaćina (McLauchlan, 2002). Dosadašnja istraživanja ukazuju da se protein kor vezuje za apolipoprotein AII, limfotoksin β receptor (LT β R) i receptor tumor nekrotični faktor (TNF-R1), čime deluje na metabolizam masti, signalnu transdukciju, imuni sistem domaćina i apoptozu (Barba i sar., 1997; Chen i sar., 1997; Zhu i sar., 1998).

1.4.2. Proteini omotača E1 i E2

Najheterogeniji delovi genoma se nalaze u genima za proteine omotača (E1 i E2). Glikoproteini E1 i E2 su strukturni proteini koji učestvuju u formiranju virusne partikule, a neophodni su za ulazak virusa u ćeliju domaćina. Ove funkcije zahtevaju promenu konformacije proteina i moraju biti strogo kontrolisane u posebnim koracima životnog ciklusa (Bartosch i Cosset., 2006). 5' kraj E2 proteina je najvarijabilniji i označen kao prvi hipervarijabilni region HVR1 (Hijikata i sar., 1991). Region HVR1 proteina E2 sastoji se od oko 90 nukleotida, a za njegov polipeptidni produkt (31 aminokiselina) se smatra da je glavni neutrališući epitop HCV-a (Shimizu i sar., 1996; Kato, 2001). Drugi hipervarijabilni deo na 3' kraju HVR1 dužine 7 aminokiselina se pojavljuje samo kod genotipa *1b*. HVR2 je visoko konzerviran region i poznat je kao mesto fosforilacije protein kinaze (PKR). Ovaj region inhibira protein kinazu direktno delujući na rezistentnost HCV-a na interferon. U karboksilnom delu E2 HCV-a nalazi se mesto za koje se vezuje CD81 (humani receptor). Pretpostavka je da je različito vezivanje CD81 sa E2 posledica aminokiselinskih zamena, što direktno utiče na prognozu lečenja kombinovanom terapijom hroničnog HCV-a (Hijikata i sar., 1991; Roccaseacca i sar., 2003).

1.4.3. Protein p7

Polipeptid p7 nalazi se unutar poliproteina kao spona između strukturnih i nestrukturnih proteina i ima ključnu ulogu u virusnoj infekciji. Posедуje dva

transmembranska domena: amino i karboksilne krajeve orjentisane prema lumenu ER-a. Karboksilni kraj transmembranskog domena zadužen je za translokaciju proteina NS2 unutar lumena ER-a (Carrere- Kremer i sar., 2004). Ovi proteini mogu formirati jonske kanale koji su važni za spajanje virusnih partikula kao i za otpuštanje istih (Griffin i sar., 2003). Uloga p7 nije u potpunosti razjašnjena, međutim utvrđeno je da amino i/ili karboksilni kraj p7 ima funkcionalno važnu genotip specifičnu sekvencu. Interakcija sa drugim delovima genoma HCV-a govori o tome da ovaj poliprotein koji formira jonski kanal igra važnu ulogu u životnom ciklusu virusa i predstavlja atraktivan target u antivirusnoj terapiji HCV-a. Na osnovu dosadašnjih istraživanja potvrđeno je da inhibitori proteina p7 blokiraju virusnu produkciju (Griffin., 2010; Saint i sar., 2009; Sakai i sar., 2003).

1.4.4. Nestrukturani protein NS2

Jedan od membranskih proteina je i NS2 veličine oko 21-23 kDa. Njegov amino -kraj se veže za membranu ER, dok se na karboksilnom kraju nalazi domen odgovoran za proteaznu aktivnost, a zajedno sa proteazom NS3 (kod koje se proteazni domen nalazi na amino kraju), formira aktivnu proteazu koja raskida vezu između proteina NS2 i NS3. Za razliku od proteina p7, replikacija virusa ne zahteva prisustvo NS2 (Tang i Grise., 2009).

1.4.5. Nestrukturani proteini NS3, NS4A i NS4B

Kod proteina NS3 domen za serin proteazu nalazi se na amino kraju dok se na karboksilnom kraju nalaze domeni za RNK helikazu i nukleotid trifosfatazu. Aktivnost proteaze NS3 je pojačana sa aktivnošću kofaktora NS4, a helikaze "raspetljavaju" RNK -RNK veze kidajući sekundarne strukture za vreme replikacije. Pretpostavlja se da domen za helikazu proteina NS3 ima važnu ulogu u ranom stadijumu formiranja virusne partikule. Lekovi koji bi delovali kao inhibitori helikaze proteina NS3 mogli bi biti efikasni u lečenju hronične HCV infekcije (Frick, 2007; Kwong i sar., 2005). Protein NS3 nema transmembranski domen, međutim vezuje se nekovalentnim vezama za

centralni domen proteina NS4. Bez prisustva proteina NS4, protein NS3 se nalazi difuzno rasut u citoplazmi i jedru, a uz prisustvo proteina NS4 vezuje se za ER (Dubuisson, 2007). Aktivnost proteina NS3 može se menjati u zavisnosti od aktivnosti serin proteaze i helikaze (Pang i sar., 2002). Kada govorimo o genotipu 1 i 3 smatra se da nukleotidne izmene u ovom delu genoma HCV-a, nemaju značajan uticaj na krajnji odgovor nakon antivirusne terapije (Sarrazin i sar., 2005).

Nestrukturani protein NS4B je hidrofoban, a amino i karboksilni kraj su lokalizovani u citosolu, mada se delovi karboksilnog kraja proteina NS4B mogu naći i u lumenu ER. Ovaj protein vezuje se za membranu ER i učestvuje u formiranju membranskih struktura kao i replikaciji HCV-a. Unutar proteina NS4B nalazi se nukleotid vezujuće mesto čija je uloga vezivanje i hidroliza GTP-a (guanozin tri fosfat), a narušavanje ovog motiva inhibira replikaciju virusa (Dimitrova i sar., 2003; Einav i sar., 2004). S druge strane promene u ovom motivu dovode se u vezu a neoplastičnom transformacijom ćelija jetre kod genotipa 1b HCV-a (Einav i sar., 2008). Takođe pretpostavka je da protein NS4B zajedno sa drugim ćelijskim proteinima učestvuje u signalnoj transdukciji i regulaciji ćelijske transkripcije (Gouttenoire i sar., 2010; Welsh i sar., 2007).

1.4.6. Nestrukturani proteini NS5A i NS5B

Protein NS5A je vezan za membranu ER i poseduje 3 različite domena. Na amino kraju je cink - vezujuće mesto te spada u metaloproteine. Unutar ovog vezujućeg mesta nalaze se 4 cisteinske rezidue koje su konzervirane među *Hepacivirusima* i *Pestivirusima* (Tellinghuisen i sar., 2004). Eksperimentalni podaci navode da uz prisustvo cinka (Zn), protein NS5A aktivno učestvuje u replikacionom kompleksu, a mutacije u bilo kojoj od cisteinskih rezidua unutar domena I i II utiču na replikaciju HCV-a. Nasuprot tome smatra se da mutacije unutar trećeg domena nemaju značajan uticaj na replikaciju HCV-a (Kim i sar., 2002; Tellinghuisen i sar., 2008). Protein NS5A u interakciji sa dva netranslirajuća regiona genoma virusa (5' NTR i 3' NTR) HCV-a, aktivno učestvuje u translaciji i životnom ciklusu virusa. Takođe, zahvaljujući lokalizaciji u citoplazmi sa drugim nestrukturanim proteinima, predstavlja deo

funkcionalnog replikacionog kompleksa (Hughes i sar., 2009; Quezada i Kane, 2009; Tellinghuisen i sar., 2008). Na karboksilnom kraju proteina NS5A nalazi se sekvenca bogata prolinom koja je konzervirana za nekoliko genotipova i interferon osetljivi region (*eng. Interferon Sensivity Region, ISDR*). Takođe protein NS5A vezuje se za protein kinazu zavisnu od dvolančane RNK (*eng. double-stranded RNA dependent protein kinase, PKR*), koja se aktivira prisustvom interferona čime direktno utiče na interferonsku rezistentnost ćelije. PKR vezuje se za ISDR (*eng. Interferon Sensivity Region, ISDR*) na poziciji od 2009 do 2074 ali pa mutacije unutar ovog dela genoma HCV-a, sprečavaju vezivanje PKR što vodi prema rezistentnosti virusa na interferon. Između ostalog, protein NS5A sprečava dimerizaciju PKR što i dovodi do gubitka njene funkcije i fosforilizacije regulatornog proteina transkripcije eIF-2a. Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se reći da je protein NS5A sa jedne strane sastavni deo replikacionog kompleksa HCV-a, dok sa druge strane blokirajući dejstvo interferona direktno učestvuje u odgovoru na virusnu infekciju (Gale i sar., 1998; Suzuki i sar., 1999).

Protein NS5B veličine oko 65-kD, je RNK zavisna RNK polimeraza (*eng. RNA dependent RNA polymerase, RdRp*) koja vrši sintezu virusne RNK koristeći kao matricu negativni lanac RNK koji predstavlja replikativni intermedijer. Aktivnost RNK polimeraze je usklađena sa proteinima NS3 i NS5A. Aktivnost enzima predstavlja ključnu ulogu u replikaciji, pa su istraživanja u smislu korelacije nukleotidnih izmena u delu NS5B genoma HCV-a i odgovora na terapiju prilično atraktivna (Maekawa i Enomoto, 2009; Pawlotsky, 2000). Može se reći da su svi nestrukturani proteini u stalnoj direktnoj ili indirektnoj interakciji i predstavljaju sastavni deo replikacionog kompleksa.

1.5. Životni ciklus virusa hepatitisa tipa C

Životni ciklus HCV-a, započinje vezivanjem virusa za receptore na površini ćelije i njegovim ulaskom u hepatocite. Ulazak virusa u ćeliju je vrlo složen proces, omogućen interakcijom proteina omotača sa receptorima na ćelijskoj membrani hepatocita. Pomoću različitih eksperimentalnih sistema, identifikovano je nekoliko membranskih molekula tj. receptora na površini ćelije koje učestvuju u vezivanju i ulasku virusa u hepatocite. Receptor dendritskih ćelija (*eng. Dendritic Cell, DC -SIGN*)

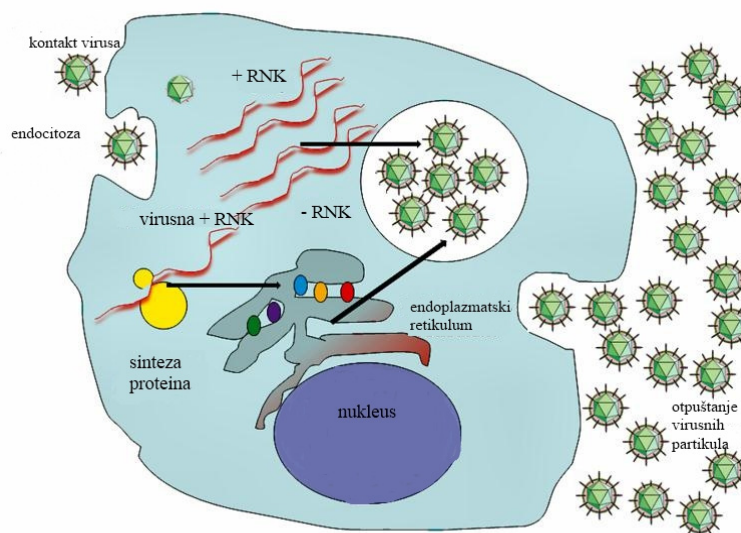
se nalazi na Kupferovim ćelijama jetre i hepatocitima. Receptor jetre i limfnih čvorova (*eng. liver and lymph node, L-SIGN*) vezuje se velikim afinitetom za protein E2 virusa hepatitisa C, što olakšava ulazak virusa u hepatocite (Lozach i sar., 2004; Pohlmann i sar., 2003).

Membranski protein CD 81 je veličine oko 25kDa i spada u familiju tetraspanina. Njegovo prisustvo detektovano je u membranama brojnih tipova ćelija kod čoveka uključujući: hepatocite, limfocite B, monocite, ćelije ubice (*eng. Natural Killer, NK*), a zajedno sa CD19, CD21 i Leu-13 (proteinom na površini leukocita) gradi koreceptorski kompleks na limfocitima B (Bartosch i sar., 2003; Flint i sar., 2001; Scarselli i sar., 2002).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja potvrđeno je da se aminokiseline proteina E2 na pozicijama 415, 420, 527, 529, 530 i 535 vezuju za CD81 (Dhillon i sar., 2010; Owsianka i sar., 2006). Drugi vrlo važan receptor je tzv. receptor čistač klase B, tipa I (*eng. Scavenger Receptor Class B type I, SR-BI*). Osnovna funkcija receptora SR-BI je vezivanje za različite lipoproteine kao što su: holesterol velike gustine (*eng. High Density Lipoprotein, HDL*) ili holesterol male gustine (*eng. Low Density Lipoprotein, LDL*), čime direktno utiče na dvosmerni transport holesterola kroz ćelijsku membranu. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da se SR BI vezuje za HVR1 proteina E2, kao i za protein E1 (Catanese i sar., 2010; Scarselli i sar., 2001). Na osnovu funkcije SR-BI može se reći da ulazak HCV-a, zahteva interakciju između lipoproteina - SR-BI i proteina omotača (Dreux i sar., 2009). Još jedan receptor važan u vezivanju virusa za hepatocit je transmembranski protein kladin 1 (*eng. Claudine1, CLDN1*). CLDN1 nalazi se na površini svih epitelnih ćelija, ali prvenstveno u jetri formirajući tzv. čvrstu vezu između plazma membrana dve susedne epitelne ćelije. Ovim kontaktom, dve epitelne ćelije obezbeđuje se paracelularna propustljivost čime je olakšan ulazak virusa u hepatocite (Evans i sar., 2007; Furuse i sar., 1998). CLDN1 vezuje se za CD81 u različitim tipovima ćelija formirajući kompleks CLDN1-CD81 neophodan za infekciju ćelije HCV-om (Harris i sar 2008; Harris i sar., 2010). Koreceptor OCLN-okuldin (*eng. Ocludine, OCLN*) je takođe transmembranski protein i smatra se da deluje u kasnijoj fazi ulaska virusa u hepatocite (Liu i sar., 2009; Ploss i sar., 2009).

Istraživanja *in vivo*, potvrdila su da receptor heparin sulfat HS (glikozaminoglikan) predstavlja prvo mesto kontakta hepatocita i HCV-a (Barth i sar.,

2003; Barth i sar., 2006; Lohmann i sar., 1999). Nakon interakcije sa nizom drugih receptora kao što su: SR-BI, CD81, CLDN1 i OCLN, virus putem endocitoze posredovane klatrinom prelazi u endozom (Marsh i sar., 2006). Ovaj korak u životnom ciklusu virusa HCV-a, je zavisan od pH vrednosti u endozomima. Kao i kod drugih *Flavivirida* proteini omotača učestvuju u fuziji membrane viriona i membrane endozoma, te dolazi do otpuštanja kapsida i virusne RNK u citosol, nakon čega započinje proces translacije i replikacije. Po zavešetku translacije i replikacije proteini omotača sa virusnom RNK formiraju nukleokapsid nakon čega se virusne partikule otpuštaju iz ćelije domaćina (**Slika 1.4.**) (Moradpour i sar., 2007).



Slika 1.4. Životni ciklus HCV-a (Colm G., Wikimedia Commons, 2007).

1.5.1. Translacija HCV-a

Virus hepatitisa C je karakterističan po cap - nezavisnoj inicijaciju translacije. Takođe HCV poseduje unutrašnje ribozomalno ulazno mesto (eng. *Internal Ribosome Entry Site, IRES*) unutar 5'NTR-a genoma HCV-a. Unutar 5'NTR-a nalaze se četiri

odvojena domena (I do IV) koji se nazivaju stablo-petlja (*eng. stem-loop, SP*) strukture. Visoko konzerviran 5'NTR može se podeliti na dva RNK elementa: kratki proksimalni 5' RNK element (od 1. do 43. nt) i drugi IRES element (od 43. do 341. nt). Brojni dosadašnji rezultati ukazuju da je 5' kraj IRES-a kod HCV-a, oko 40. nukleotida od početka genoma i da ovaj RNK element formira prvu SP (I). Na taj način deluje na proces translacije kao i replikaciju pozitivnog i negativnog lanca RNK HCV-a. Smatra se da prvih 40 nt, dela 5'NTR-a nije neophodno za proces translacije (Honda i sar., 1999; Tang i sar., 1999; Rijnbrand i sar., 1995). Drugi domen predstavlja veliku RNK srstrukturu unutar koje se nalazi prvi polipirimidinski lanac na poziciji od 37. do 45. nt, dok se drugi polipirimidinski lanac nalazi između drugog i trećeg domena na poziciji od 120. do 130. nt. O ulozi ovog domena dosadašnje sudije su dosta kontraverzne. Međutim za sada se zna, da vezivanje ribozomalnog proteina S9 zahteva korektnu orijentaciju ovog domena, kao i da je pojačana translacija uz prisustvo ove strukture (Beals i sar., 2001; Friebe i sar., 2001). Domen III predstavlja jezgro IRES-a i ima najveći stepen strukturne konzerviranosti. Unutar ovog domena nalazi se šest subdomena (IIIa-III f) kao i treći polipirimidinski lanac na poziciji od 191 do 199 nt (Buratti i sar., 1998; Beales i sar., 2001). Subdomen IIIb učestvuje u inicijaciji translacije tako što se vezuje za eukariotski inicijalni faktor 3 (eIF3) (Collier i sar., 2002; Gallego i sar., 2002). U okviru domena IV na poziciji 342 nt nalazi se AUG start kodon. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da su prvih 12 do 40 nt nizvodno od start kodona neophodni za funkciju IRES-a (Friebe i sar., 2001).

Kap nezavisna inicijacija translacije započinje vezivanjem IRES-a za ribozomalnu subjedinicu (40S) uz prisustvo eukariotskog inicijalnog faktora eIF3, i kompleksa od tri komponente koga čine: eIF2, metionil - tRNK (Met-tRNK) i guanozin tri fosfat (GTP), nakon čega se formira ribozomalna subjedinica 48S koju prepoznaje inicijalni AUG start kodon, dok formiranje kompleksa ribozomalne subjedinice 80S zavisi od hidrolize GTP-a i vezivanja subjedinice 60S, nakon čega se formira prva peptidna veza (Otto i Puglisi, 2004).

1.5.1.1. Obrada poliproteina HCV-a

Proizvod translacije genoma HCV-a je veliki prekursorski poliprotein koji se naknadno obrađuje pomoću ćelijskih i virusnih proteaza formirajući zrele strukturne i nestrukturne proteine. Na osnovu hidrofobnosti i u zavisnosti od mikrozomalnih membrana u procesu vezivanja pojedinih delova genoma HCV-a kao što su: C/E1, E1/E2, E2/P7, P7/NS2 učestvuju signalne peptidaze domaćina. Na osnovu analize sekundarne strukture kora došlo se do saznanja da je domen za serin proteazu smešten na karboksilnom kraju proteina, a da su ak na pozicijama od 174 do 191 ekstremno hidrofobne sa tipičnom sekvencom signalnog peptida. Post-translaciona obrada poliproteina podrazumeva približavanje karboksilnog kraja proteina C i delovanje signalne peptidaze čime se efikasno otklanja deo kodirajućeg regiona E1 za signalni peptid (Hüssy i sar., 1999; Lemberg i sar., 2002; McLauchlan i sar., 2002). Obrada nestrukturnih proteina odvija se uz pomoć virusnih serin proteaza koje kidaju veze između odgovarajućih delova nestrukturnih proteina.

Kompleks NS3-NS5B stvara se pre svega uzastopnim deljenjem sledećim redosledom: NS3/4A→NS5A/5B→NS4A/4B→NS4B/5A. Svi nestrukturni proteini obrađuju intermolekularno osim kompleksa NS3/4A čija obrada se odvija intramolekularno (Bartenschlager i sar., 1994; Weihofen i sar., 2002).

1.5.1.2. Replikacija HCV-a

Genom HCV-a, je pozitivno orijentisan jednolančani molekul RNK. Replikacija HCV-a, započinje sintezom negativnog RNK lanca-replikativnog intermedijera. Ovu sintezu katalizuje virusna RNK zavisna RNK polimeraza NS5B. Pošto sinteza "antisense" lanca RNK počinje sa 3' kraja, smatra se da 3' rep dužine 98 nt koji formira strukture stablo-petlja ima ključnu ulogu u replikacionom mehanizmu (Friebe i sar., 2001, Randall i sar., 2007). Između ostalog, pretpostavka je da su različiti virusni i/ili faktori domaćina odgovorni za replikaciju i formiranje replikacionog kompleksa, dok NS5B služi kao katalizator za vreme sinteze RNK HCV. Za vreme replikacije RNK HCV-a, nestrukturni proteini nalaze se na plazma membranama ER i u Goldžijevom

aparatu (Aizaki i sar., 2004; Ali i sar., 2002; Lai i sar., 2003). Vezujući se za ćelijske proteine NS5A igra važnu ulogu u replikaciji virusa. Jedan od takvih proteina je VAMP - membranski protein vezan za vezikulu ER-a (*eng. Vesicle - Associated Membrane Protein, VAMP*), koji ima 2 podtipa (VAMP-A i VAMP-B), a lokalizovan je u plazma membrani i unutarćelijskim vezikulama. VAMP A i B se vezuju za proteine lokalizovane u ER i Goldžijevom aparatu. Tako vezani za proteine NS5A i NS5B predstavljaju osnov replikacije HCV-a. VAMP A i B uzajamno deluju kroz transmembranski domen pa učestvuju u formiranju funkcionalnog replikacionog kompleksa HCV-a (Gao i sar., 2004; Hamano i sar., 2005). Protein NS5A se vezuje i za protein toplotnog šoka (*eng. Heat shock protein, Hsp90*) i na taj način doprinosi procesu replikacije HCV-a (Okamoto i sar., 2006).

S druge strane faktori domaćina koji uzajamno deluju sa proteinom NS5B mogu takođe da utiču na replikaciju virusa. Ciklofilin B je ćelijska peptidil-prolil cis-trans izomeraza, koja sa proteinom NS5B stimuliše vezivanje RNK i olakšava proces replikacije HCV-a (Watashi i sar., 2005).

Heterogen nuklearni ribonukleoprotein hnRNPS A1 (*eng. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs*) deluje sa GTP-azama sa 3' i 5' NTR, obezbeđujući na taj način protein - protein interakciju za vreme replikacije RNK HCV (Kim i sar., 2007). Protein koji se vezuje za polipirimidinski lanac PTB (*eng. Polypyrimidine Tract-Binding Protein, PTB*) deluje na aktivnost IRES-a, tako što se vezuje za nekoliko mesta unutar genoma HCV-a (Ali i sar., 1995; Ito , 1997; Ito, 1999; Murakami i sar., 2001).

1.5.1.3. Formiranje i oslobađanje hepatitis C virusa iz ćelije

Sam mehanizam nastanka virusne partikule HCV-a je složen i još uvek prilično nejasan. Utvrđeno je da u procesu formiranja virusne partikule HCV-a, učestvuju strukturni i nestrukturni proteini (Popescu i sar., 2011). Kao i kod većine virusa, zreli tj. formirani virion HCV-a, sastoji se od: nukleokapsida i spoljašnjeg omotača građenog od lipidne membrane i od proteina omotača. U cirkulaciji inficiranog domaćina mogu se naći različite forme HCV-a uključujući: *a)* slobodne, zrele virione, *b)* virione vezane za LDL i HDL, *c)* virione vezane za imunoglobuline i *d)* nukleokapside sa različitim

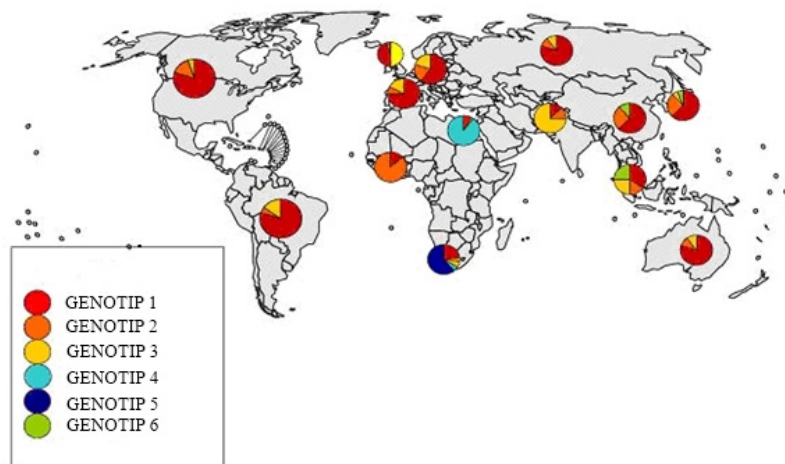
fizičko - hemijskim i antigenim osobinama (Kaito i sar., 1994; Maillard i sar., 2001; Shimizu i sar., 1999). Očekivano je da protein C ima centralnu ulogu u procesu formiranja virusa kao konstitutivna jedinica nukleokapsida (Hourieux i sar., 2007). Amino kraj C proteina je važan za formiranje nukleokapsida (Klein i sar., 2004; Majeau i sar., 2004). Formiranje kapsida se odvija bez obzira na prisustvo ili odsustvo membrane ER i uz odvajanje signalnog peptida na karboksilnom kraju (Klein i sar., 2004). Nakon interakcije kora sa virusnom RNK dolazi do formiranja nukleokapsida. Nukleokapsid se formira oligomerizacijom C proteina i pakovanjem RNK u citoplazmi nakon čega prolazi kroz unutarćelijske membrane. Interakcija kora sa virusnom RNK može biti ključna za proces replikacije i pakovanja RNK. Utvrđeno je da se protein kora vezuje za pozitivni lanac RNK HCV-a, preko SP I, SP III i na pozicijama između 24-41 nt (Tanaka i sar., 2000). Dosadašnja istraživanja ukazuju na činjenicu da interakcija karboksilnog kraja, kora sa proteinima omotača (E1/E2) određuje morfologiju virusa (Lo i sar., 1996; Murakami i sar., 2006). Pretpostavka je da odgovarajuća sekvenca C proteina nije visoko konzervirana među različitim izolatima, tako da interakcija ovih proteina može zavisiti više od njihove hidrofobnosti nego od same sekvence proteina (Nakai i sar., 2006).

Mnogobrojni rezultati potvrđuju da delovi genoma HCV-a, koji kodiraju p7 i NS2 nisu važni za proces replikacije, ali da imaju značajnu ulogu u formiranju, otpuštanju viriona i određivanju morfogeneze HCV-a (Pietschmann i sar., 2008; Popescu i sar., 2011; Steinmann i sar., 2007; Wakita i sar., 2005). Mehanizam oslobađanja infektivnih HCV partikula je prilično nejasan. Smatra se da se partikule virusa otpuštaju iz ćelije sekretornim putem (Serafino i sar., 2003). Strukturni proteini nalaze se u ER i Goldžijevom aparatu, dok je kompleks amino - vezanih glikana koji prolazi kroz Goldžijev aparat detektovan i na površini virusnih partikula (Sato i sar., 1993). Takođe, novija istraživanja ukazuju na postojanje tzv. endozomalnog sortirajućeg kompleksa zaduženog za transport (*eng. Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT*). Može se reći da ovaj sistem učestvuje u prenosu svake novonastale virusne partikule u/iz ćelije, kao i procesu odvajanja infektivne partikule sa ćelijske membrane (Corless i sar., 2011; Henne i sar., 2011; Tamai i sar., 2012).

1.6. Genotipovi HCV-a

1.6.1. Nomenklatura genotipova HCV-a

Danas je opšte prihvaćena Simmonds - ova klasifikacija HCV koja se zasniva na filogenetskoj analizi kompletne genomske sekvence ili subgenomskih fragmenata. Simmonds i sar. su uradili opsežnu filogenetsku analizu u kojoj je analizirano 222 nt iz NS5 regiona kod 76 izolata prikupljenih iz Evrope, Severne i Južne Amerike i velikog broja azijskih zemalja. Region NS5 je odabran zato što mu je varijabilnost vrlo slična varijabilnosti celog genoma (preko 44% divergencije u nukleotidnoj sekvenci između različitih tipova). Na osnovu ove analize proizašla je nomenklatura različitih genetskih varijanti HCV-a. Definisana su 4 genetička hijerarhijska stupnja: *tip*, *podtip*, *izolat* i *kvazivrsta*. Tipovi su obeleženi arapskim brojevima od 1 do 6 i predstavljeni su glavnim granama u filogenetskom stablu. *Podtipovi* pripadaju glavnim granama i pokazuju manju divergenciju a obeleženi su malim latiničnim slovima po vremenskom redosledu kako su utvrđivani *a*, *b*, *c*. *Izolati* predstavljaju varijabilnost genomske sekvence u okviru istog podtipa, a izolovani su iz humanih tkiva većeg broja pacijenata. Termin *kvazivrste* podrazumeva varijabilnosti genoma HCV-a u okviru istog izolata. Kvazivrste se u virusologiji definišu kao heterogene populacije virusnih čestica čiji se genomi međusobno razlikuju u barem jednoj baznoj zameni (Purcell, 1997). Rekombinacija karakteristična za RNK viruse predstavljaju dodatni problem u nomenklaturi HCV-a (Kuiken i Simmonds., 2009; Simmonds i sar., 1994, 2005). Na osnovu podataka iz epidemioloških i molekularno bioloških studija utvrđeno je da su u populaciji Srbije najučestaliji genotipovi *1a*, *1b* i *3a* (Stamenkovic i sar., 2001). U Americi, Evropi i Japanu su takođe najučestaliji navedeni genotipovi, ali značajno prisustvo imaju i genotipovi *2a* i *2b*. Genotipovi *4*, *5* i *6* zastupljeni su na Bliskom Istoku i Africi (Murphy i sar., 2007). Distribucija genotipova širom sveta prikazana je u **Slici 1.5**. U svetu se intenzivno radi sekvenciranje HCV genoma, a sekvence se deponuju u baze podataka kao što su Genebank, EMBL i DDB baza. Neke od baza sadrže isključivo podatke koji se odnose na HCV (**Tabela 1.1**).



Slika 1.5. Globalna distribucija HCV genotipova (WHO, 2009).

Tabela 1.1. Baze podataka sa sekvencama hepatits C virusa.

Baza podataka	Referenca	Web Adresa
euHCVdb	Combet i sar., Nucleic Acids Res, 2007, 35: D363-D366.	http://hepatitis.ibcp.fr
usHCV sequence database (LANL)	Kuiken i sar., Bioinformatics, 2005, 21(3): 379-84.	http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html
jpHCVdatabase	Shin-i i sar., Hepatology Research, 2008, 38: 234-243.	http://s2as02.genes.nig.ac.jp

1.7. Antivirusna terapija hroničnog C hepatitisa

Sadašnja standardna antivirusna terapija hroničnog HCV je kombinovana terapija koja se sastoji iz istovremene primene pegilovanog interferona alfa-2a/alfa-2b (PEG-IFN-alfa-2/alfa-2b) sa nukleozidnim analogom ribavirinom. Dužina primene kombinovane terapije zavisi od genotipa HCV-a (Fried i sar., 2002). Pacijenti inficirani hroničnim C virusom genotipa 1 i 4 primaju terapiju u trajanju od 48 nedelja, dok pacijenti inficirani genotipovima 2 i 3, 24 nedelje, pri čemu se stabilan virusološki odgovor (SVO) kod pacijenata inficiranih genotipom 1b postiže samo u 50% slučajeva, a kod ostalih genotipova do 78% (Friedrich-Rust i sar., 2005; Sethi i sar., 2005; Shiffman i sar., 2004; Zeuzem i sar., 1998). Stabilan virusološki odgovor (SVO) označava odsustvo virusne RNK 6 meseci od kraja terapije. Kriterijumi za primenu antivirusne terapije su: a) povišene vrednosti serumskih transaminaza najmanje 6 meseci (nije obavezno ukoliko je izražena fibroza na biopsiji jetre), b) prisustvo RNK HCV u serumu ili plazmi i c) nalaz biopsije jetre koji ukazuje na hronični hepatitis. Kod bolesnika kod kojih postoje kontraindikacije za primenu ribavirina primenjuje se monoterapija pegilovanim IFN alfa-2a. Ova antivirusna terapija je dugo bila jedini terapijski izbor za postizanje SVO od 8% za terapiju u trajanju od 6 meseci, a do 27% za terapiju u trajanju od 24-48 sedmica (Fried i Hadziyannis., 2004; Yen i sar., 2005). Primena kombinovane terapije rekombinovanim interferonom alfa i ribavirinom dovodi do povećanja SVO do 40%, dok uvođenje pegilovanog interferona dovodi do značajnog povećanja efikasnosti kombinovane terapije čak i pri njegovoj primeni u vidu monoterapije, kao i kombinovane terapije sa ribavirinom (Webster i sar., 2009).

Najnovija istraživanja u polju antivirusne terapije HCV su fokusirana na dizajniranje i upotrebu novih selektivnih inhibitora HCV-a. Proteazni inhibitori (telaprevir i boceprevir) su za sada jedini odobreni HCV inhibitori od strane agencije za kontrolu hrane i lekova FDA (*eng. Food Drugs Administration, FDA*) za terapiju u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (FDA Approves Victrelis., Drugs.com, 2011). Boceprevir je oralni proteazni inhibitor koji se vezuje za nestrukturani protein NS3, inhibirajući virusnu replikaciju. Boceprevir primenjen zajedno sa standardnom kombinovanom terapijom daje bolje rezultate u odgovoru na antivirusnu terapiju kod genotipa 1a i u čak 70% slučajeva postiže se SVO (Foote i sar., 2011; Kwo i sar., 2012;

Trembling i sar., 2012). Telaprevir inhibira virusnu NS3A serin proteazu. U randomizovanoj kontrolnoj studiji kod pacijenata koji nisu odgovorili na standardnu terapiju PEG-IFN alfa-2a/ribavirin-om, ponovna terapija sa dodatim teleprevirom dovodi do boljeg odgovora (McHutchison i sar., 2010; Perry., 2012). Oba leka su odobrena za upotrebu u SAD od strane agencije FDA 2011. godine.

1.7.1. Mehanizam delovanja interferona i ribavirina

Interferoni (IFN) tipa I sadrže dve serološki odvojene grupe proteina (IFN- α i IFN- β). Prva grupa su IFN- α u okviru koje ulazi IFN- α 1 i IFN- α 2 i predstavljaju familiju od 20 poliproteina koji su veličine od oko 18 kD. Virusna infekcija dovodi do aktivacije sinteze interferona (Kumar i Carmichael, 1998). Najveći izvor produkcije IFN- α su mononuklearni fagociti. IFN- α aktivira brojne enzime u ćeliji koji deluju na replikaciju virusne RNK ili DNK. Njegovo delovanje je pre svega parakrino tako da sprečava širenje virusne infekcije na susedne ćelije koje još nisu inficirane. Interferon aktivira NK ćelije, MHC (*eng. Major Histocompatibility Complex, MHC*) molekule, a između ostalog i inhibira proliferaciju ćelija (Pawlotsky, 2000; Samuel, 2001). Interferon- α deluje i na aktivaciju enzima kao što su: 2',5' oligoadenilat sintetaza (2',5'-OAS) i RNK protein kinaza zavisna od dvolančane RNK (PKR), kao i na aktivaciju proteina Mx (*eng. myxovirus. Mx*) (MxA i MxB). Proteini Mx spadaju u interferon inducibilne proteine IFI-78, veličine 78kDa. Navedeni enzimi i proteini učestvuju u uspostavljanju antivirskog stanja u inficiranoj ćeliji (Pawlotsky, 2000; Samuel, 2001). 2',5' oligoadenilat sintetaza je ćelijski enzim sintetisan interferonskom stimulacijom za vreme odgovora organizma. U inficiranoj ćeliji 2',5'-OAS enzimatska aktivnost je indukovana dvolančanom ili jednolančanom virusnom RNK. 2',5'-OAS aktivira brojne ćelijske endoribonukleaze kao što su ribonukleaze L, koje degradiraju ćelijske i virusne jednolančane RNK (Pawlotsky, 2000; Samuel, 2001).

PKR je protein kinaza zavisna od dvolančane RNK, takođe aktivirana delovanjem interferona α . PKR se aktivira autofosforilacijom uz prisustvo dvolančane RNK i inhibira sintezu proteina blokirajući tako i samu replikaciju virusa. Mx proteini pripadaju familiji guanozin trifosfataza i njihova sinteza je stimulirana interferonom α .

Deluju direktno na inhibiciju PKR, zaustavljaju sintezu informacione RNK i blokiraju prelazak virusne polimeraze u nukleus (Pawlotsky, 2000; Samuel, 2001). PEG-IFN α -2a, koji se dobija konjugacijom IFN α -2a, sa polietilen glikolom i proizvodi se biosintetski, upotrebom rekombinantne DNK tehnologije, pri čemu se gen za IFN kloniranog humanog leukocita eksprimira u *E.coli*, nakon čega dolazi do sinteze IFN α -2a.

Ribavirin je sintetski guanozin. Kao monoterapija nema efekat na hronični HCV, međutim u kombinaciji sa IFN α -2a, ribavirin povećava početni odgovor organizma. Delovanje ribavirina zasniva se na inhibiciji virusne RNK polimeraze, mada mehanizam delovanja u monoterapiji ili kombinovanoj terapiji HCV-a, ostaje nejasan (Pawlotsky, 2000).

1.7.1.1. Odgovor pacijenata sa hroničnim C hepatitisom na antivirusnu terapiju

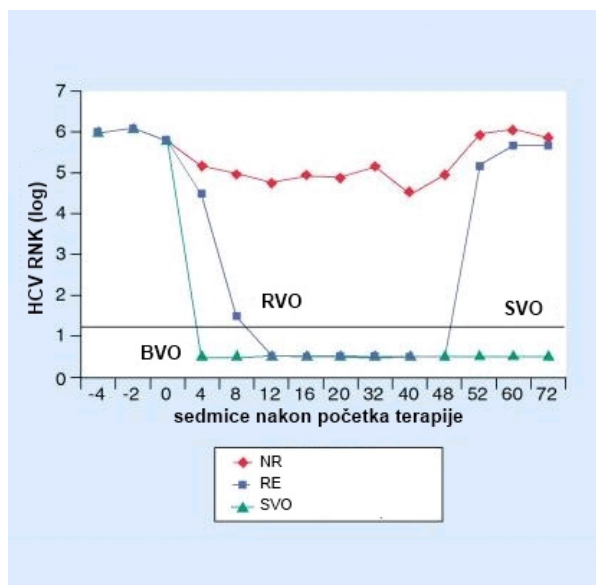
Odgovor organizma na antivirusnu terapiju može se pratiti na 3 različita nivoa: biohemijski - koji podrazumeva normalizaciju nivoa ALT-a (alanin aminotransferaza), virusološki odgovor - odnosno odsustvo detektabilne RNK HCV u plazmi i patohistološki koji podrazumeva poboljšanje stanja jetre (Lindsay, 1997).

U odnosu na početak primene antivirusne terapije definisani su različiti odgovori koji mogu biti značajni za dužinu terapije i predviđanje uspeha terapije. Ukoliko je HCV nedektibilan 4 nedelje od početka terapije radi se o *brzom virusološkom odgovoru* (BVO). Brzi virusološki odgovor označava veliku efikasnost terapije i pod određenim uslovima dozvoljava skraćanje antivirusne terapije hronične HCV infekcije na 24 nedelje kod genotipa 1 i 4, i na 16 nedelja kod genotipa 2 i 3 (ukoliko nema ciroze jetre i ukoliko nije visoka viremija pre početka terapije). Veoma važan za terapiju je i *rani virusološki odgovor* (RVO) koji se odnosi na nivo viremije 12 nedelja od početka terapije. Može da bude *parcijalni i kompletni*. Parcijalni odgovor označava pad viremije za više od sto puta (ili $2 \log_{10}$) u odnosu na viremiju pre početka terapije, a *kompletni odgovor* odsustvo RNK HCV. Pacijentima koji nisu postigli RVO (non-responderi, NR) terapija se prekida, jer je gotovo sigurno da, ukoliko bi im se terapija nastavila ne bi postigli stabilan virusološki odgovor (SVO) koji je cilj terapije. *Relaps* označava

ponovnu pojavu RNK HCV u krvi u periodu od kraja terapije, kada je bio negativan, do 6 meseci od kraja terapije.

Stabilan virusološki odgovor podrazumeva odsustvo detektabilne RNK HCV u plazmi kao i normalan nivo transaminaza u krvi 6 do 12 meseci nakon završetka terapije (EASL, International Consensus Conference on Hepatitis C, 1999).

Varijacije koncentracije RNK HCV-a za vreme terapije prikazane su **Grafikonom 1.1**.



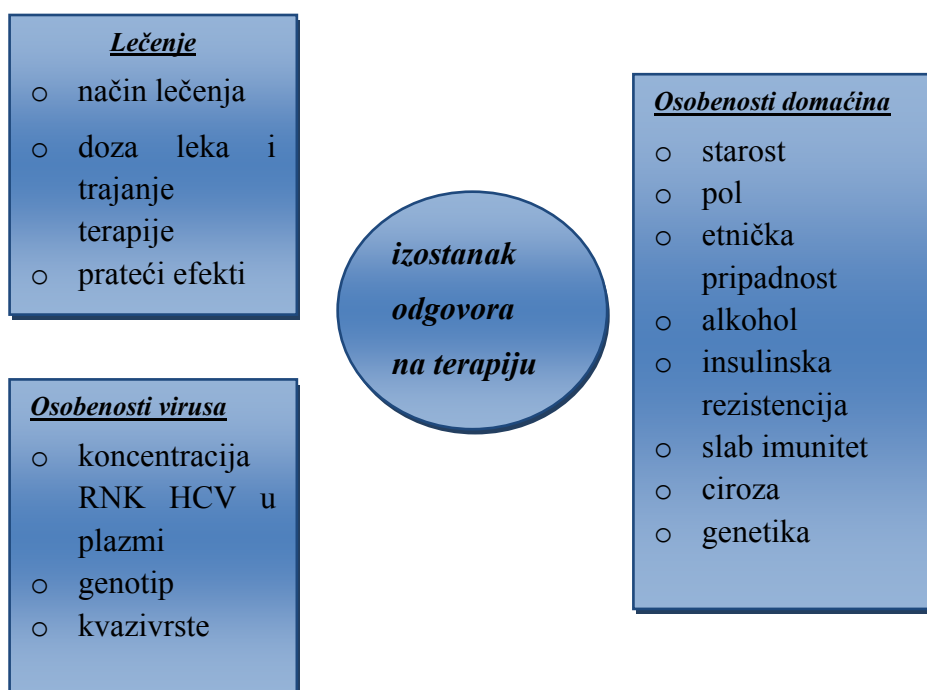
Grafikon 1.1. Vrednosti koncentracije RNK HCV-a u korelaciji sa odgovorom na terapiju.

Skraćenice: BVO-brzi virusološki odgovor; RVO-rani virusološki odgovor; SVO- stabilan virusološki odgovor; NR-izostanak odgovora na terapiju, RE-relaps bolesti.

1.7.1.2. Faktori koji utiču na uspešnost antivirusne terapije

Uspešnost kombinovane antivirusne terapije u lečenju hronične infekcije HCV-om zavisi od faktora domaćina i virusa, kao i molekularnih mehanizama koji pod delovanjem različitih proteina HCV-a zaustavljaju signalni put IFN-a. Lošoj prognozi u lečenju i progresiji fibroze doprinose starost, ciroza i steatoza jetre, insulinska

rezistentnost i gojaznost. Takođe, koinfekcija virusom humane imunodeficijencije (*eng. human immunodeficiency virus, HIV*) i/ili hepatitisa B (HBV), konzumiranje alkohola i opojnih droga se u većini slučajeva dovode u vezu sa izostankom SVO nakon antivirusne terapije (Alberti., 2009; Alvarez i sar., 2009; Asselah i sar., 2006; Moucari i sar., 2008). Između ostalog ishod bolesti nakon kombinovane terapije zavisi od promena i odstupanja u genima odgovornim za imuni sistem domaćina (Nattermann i sar., 2008; Yee, 2004). Faktori u asocijaciji sa izostankom odgovora na terapiju pegilovanim IFN- α i ribavirinom prikazani su u ***Shemi 1.1.***



Shema 1.1. Faktori u direktnoj vezi sa izostankom odgovora na kombinovanu terapiju pegilovanim IFN- α i ribavirinom.

Studije koje se odnose na analizu humanog genoma imaju ulogu da identifikuju i utvrde koji su geni ključni za odgovor na terapiju interferonom. Izmena jednog nukleotida (*eng. Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) u kodirajućem ili nekodirajućem regionu genoma u nekim posebnim slučajevima ima direktan uticaj na

aktivnost ili ekspresiju proteina (Asselah i sar., 2011). Prema rezultatima Lina i sar., (2006) pojava određenog alela u tačkastim polimorfizmima koji su locirani u interferon stimulišućem genu IFI44 zajedno sa genotipom virusa igra veliku ulogu u farmakokinetici IFN- α . Prema istraživanjima Huanga identifikovane su pojedinačne nukleotidne izmene unutar gena koji kodira IFN- α , a varijante nukleotidnih izmena koje su smeštene proksimalno u promotoru IFN- α su u korelaciji sa SVO (Huang i sar., 2007). Razumevanje asocijacije između humane genetike i samog ishoda antivirusne terapije datira od 2009. godine. Tri nezavisne studije, pokazale su da pojava određenih alela u tačkastim polimorfizmima koji su locirani u blizini gena IL28B, koji učestvuje u sintezi jednog od antivirusnih citokina (IFN- λ) su u direktnoj korelaciji sa odgovorom na terapiju kod pacijenata sa hroničnim C hepatitisom i genotipom 1 (Ge i sar., 2009; Sheppard i sar., 2003; Suppiah i sar., 2009; Tanaka i sar., 2009).

Interferon (IFN- λ), uključujući IFN - λ 1, 2 i 3 (poznatih pod imenom IL-29, IL-28A i IL-28B), spada u grupu antivirusnih citokina koji pripadaju interferonima tipa I (IFN-I) i članovima familije interleukina 10 (IL-10). Uloga IFN- λ je da započne antivirusni, antitumorski i imuni odgovor aktivirajući JAK-STAT i MAPK signalne puteve (Sheppard i sar., 2003). Na osnovu *in vitro* istraživanja smatra se da IFN- λ ima slabiju antivirusnu aktivnost u odnosu na IFN- α (Marcello i sar., 2006). Najistraživaniji SNP (rs12979860) nalaze se oko 3kb uzvodno od kodirajućeg regiona IL28B. Na osnovu dosadašnjih rezultata smatra se da pacijenti kod kojih je detektovano prisustvo genotipa CC, češće dostižu SVO u odnosu na pacijente kod kojih je u okviru (rs12979860) prisutan genotip CT ili TT (Ge i sar., 2009). Sve tri nezavisne studije su potvrdile da pojava rizičnog alela (homozigota CCC) u okviru rs12979860 ima snažan uticaj na krajnji odgovor pacijenta na kombinovanu terapiju i to u okviru genotipova 1, 2 i 3 (Mangia i sar., 2010; Thompson i sar., 2010). Istraživanjima Thomasa i sar., (2009) došlo se do zaključka da pacijenti sa ovim polimorfizmom u delu gena IF28B mogu spontano da eliminišu HCV iz organizma. Posledica štetnih efekata ribavirina je pad hemoglobina što vodi ka hemolitičkoj anemiji. U tim slučajevima neophodno je smanjiti dozu leka čime se umanjuje i efikasnost lečenja. Na osnovu istraživanja asocijacije između SNP u humanom genomu i ribavirina dobijeni rezultati ukazuju takođe da pacijenti sa SNP-a u delu gena IF28B imaju manju verovatnoću da dobiju hemolitičku anemiju (Fellay i sar., 2010; Sulkovski i sar., 2003).

Istraživanja su pokazala da pacijenti sa genotipom 1 imaju slabiji odgovor na terapiju, za razliku od pacijenata sa npr. genotipom 2 i 3. Osnovni biološki aspekt HCV-a, je njegova replikacija kojom se stvara veliki broj kvazivirsa. Njihova raznolikost, složenost i njihov uticaj na uspešnost i ishod lečenja je predmet stalnog istraživanja, sa vrlo konfliktnim rezultatima. Neke studije na osnovu rezultata potvrđuju da bolji odgovor na terapiju imaju pacijenti sa manjom učestalošću kvazivirsa pre terapije (Moreau i sar., 2008; Pawlotsky i sar., 1998), dok druge studije potvrđuju sasvim suprotne rezultate (Lopez-Labrador i sar., 1999; Sandres i sar., 2000; Tavis i sar., 2011). Razlog ovako oprečnih rezultata još uvek nije jasan. U pokušaju da se pojasni ovaj fenomen analizirane su izmene unutar sekvence (različitih regiona genoma HCV-a) u odnosu na dominantnu tzv. konsenzus sekvencu. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka najveći broj detektovanih izmena u nukleotidnoj sekvenci koje su u korelaciji sa odgovorom na terapiju nalazi se u NS5A delu genoma (ISDR - regionu), kao i u delu genoma HCV-a, zaduženom za sintezu kapsida virusa. Između ostalog ove sekvence pokazuju veliku sličnost sa konsenzus sekvencom za genotip 1 (Akuta i sar., 2010; Witherell i Beineke, 2001). Takođe, smatra se da su varijacije nukleotidne sekvence u genu koji kodira protein omotača (E2) u asocijaciji sa odgovorom na terapiju (Hung i sar., 2003; Watanabe i sar., 2003). Ova veza između male genetičke raznovrsnosti unutar sekvence duž genoma HCV-a i velika sličnost sa konsenzus sekvencom je u korelaciji sa izostankom odgovora na terapiju. Naime, pacijenti sa ovakvim nukleotidnim sekvencama imaju u neku ruku veću rezistentnost na IFN terapiju (Tavis i sar., 2011).

Pored varijabilnosti samog genoma HCV-a, u odnosu na odgovor na terapiju veliki značaj ima i početna koncentracija ukupne RNK HCV-a u plazmi. Postoje podaci da su pacijenti sa visokom početnom koncentracijom RNK HCV > 800000 UI/mL ili (2000000 kopija/mL) manje osetljivi na terapiju, dok pacijenti sa manjom koncentracijom virusne RNK od navedene imaju veću šansu za uspešno lečenje i postizanje SVO (Jensen i sar., 2006; Martinot-Peignoux i sar., 1998; Zeuzem i sar., 2006).

1.7.1.3. HCV genotipovi i odgovor na terapiju

Određivanje genotipa HCV-a je jedan od važnih preduslova za odgovor organizma na antivirusnu terapiju (Manns i sar., 2001; Fried i sar., 2001). Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se uočiti da pacijenti sa genotipom 4 sporije odgovaraju na terapiju, dok je za pacijente sa genotipom 1 karakteristično da imaju česte relapse HCV infekcije kao i izostanak odgovora na antivirusnu terapiju u odnosu na druge genotipove (Pawlotsky i sar., 2003; Abony i Lakatos, 2005). Jedno od mogućih objašnjenja pojave relapsa bolesti kao i rezistentnosti na antivirusne lekove je upravo velika varijabilnost genoma HCV-a, stoga je neophodno da istraživanja u oblasti molekularne biologije HCV-a daju neophodne informacije za postizanje novih terapijskih dostignuća u lečenju HCV infekcije (Donlin i sar., 2007; Pawlotsky i sar., 2000, Simmonds., 2001).

1.8. HCV proteini i odgovor na antivirusnu terapiju

Dosadašnji rezultati koji se odnose na ispitivanje asocijacije između nukleotidnih izmena u genomu virusa hepatitisa tipa C i hepatocelularnog karcinoma, kao i uspešnosti odgovora na antivirusnu terapiju su oprečna. Smatra se da su zamene ak 70 i/ili 91 proteina za nukleokapsid u direktnoj vezi sa učestalijim obolevanjem od hepatocelularnog karcinoma (Akuta i sar., 2011; Kobayashi i sar., 2011). Najnovija istraživanja ukazuju da izmena ak 70. je u korelaciji sa odgovorom, tako da kod NR sa genotipom 1b ova izmena je učestalija u odnosu na pacijente koji su postigli SVO. Za razliku od izmene ak. 70 u proteinu C, supstitucija ak. 91 javlja se sa mnogo manjom učestalošću i smatra se da nema veći uticaj na uspešnost odgovora nakon kombinovane terapije (Alestig i sar., 2011; Kurbanov i sar., 2010; Kurosaki i sar., 2011). Analizom nukleotidne sekvence C proteina, kod pacijenata inficiranih genotipom 1b nakon završetka terapije utvrđene su takođe nukleotidne izmene na pozicijama između 70. i 106. ak. što ukazuje na smanjenu varijabilnost ovog regiona (El-Shamy i sar., 2011; Gonzales-Horta i sar., 2011). S druge strane, Enomoto i sar., (1995) smatraju da ne

postoji korelacija između nukleotidnih izmena tj. genetičkih varijacija i odgovora na terapiju kod pacijenata sa hroničnim HCV-om genotipa *1*.

Takođe, sa nesigurnošću se tvrdi da mutacije funkcionalnih regiona tj. proteina HCV-a mogu biti u korelaciji sa odgovorom na terapiju interferonom, a dostupni rezultati su prilično kontradiktorni. Moguće je da se ovako oprečni rezultati dobijaju zbog istraživanja na različitim geografskim područjima, a između ostalog većina studija uključuje sve delove genoma HCV-a koji utiču na delovanje IFN-a, dok je veoma mali broj studija sa rezultatima koji se odnose na korelaciju genetičke varijabilnosti E2 regiona i uspešnosti antivirusne terapije (Munoz de Rueda i sar., 2008). Pretpostavka je da su mutacije koje se nalaze u ovom delu genoma u korelaciji sa odgovorom na terapiju (Gupta i sar., 2006; Taylor i sar., 2001; Wohlsland i sar., 2007). U svakom slučaju dostupni podaci su konfliktni jer se radi o visoko konzerviranom regionu u genomu HCV-a (Berg i sar., 2000; Chayama i sar., 2000; Gerotto i sar., 2000).

Najnovija istraživanja odnose se na istraživanja i razvoj malih molekula koje se vezuju za proteine koji učestvuju u životnom ciklusu HCV-a. Ovi antivirusni lekovi direktno deluju inhibirajući NS3/NS4 proteaze, zatim NS5A i NS5B polimeraze. Zbog brze replikacije virusa kao i polimeraze sa slabom preciznošću dolazi do velikog broja mutacija tj. nukleotidnih izmena duž genoma HCV-a, što dovodi do stvaranja različitih kvazivirsa. Ova varijabilnost vodi izmenama ak. unutar ciljanih i određenih proteina čime se smanjuje osetljivost inhibitora proteaze i polimeraze. *In vitro* i *in vivo* istraživanjima utvrđeno je da: 6 nukleotidnih izmena u regionu NS3 polimeraze, zatim 15 izmena u delu NS5B polimeraze i 5 izmena u NS5A delu genoma su u asocijaciji sa različitim stepenom rezistentnosti na inhibitore enzima, a mogu varirati u zavisnosti od genotipa/podtipa HCV - a (Halfon i Sarrazin., 2012).

Jonski kanal p7 igra važnu ulogu za vreme produkcije virusa čime predstavlja atraktivno mesto delovanja antivirusne terapije kao što su inhibitori p7. U okviru istraživanja korelacije nukleotidnih izmena i uspešnosti odgovora na terapiju, identifikovana je mutacija (L20) koja određuje delovanje inhibitora proteina p7 kao i rezistentnost na njih (Foster i sar., 2011).

U okviru NS5A, na osnovu dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da su izmenjene aminokiseline u delu ISDR-a odgovorne za rezistentnost na interferonsku terapiju, što se posebno odnosi na genotip *1b*. Ispitivanje korelacije ISDR-a i uspešnosti odgovora na

antivirusnu terapiju rađeno je na različitim grupama ispitanika u Japanu, Evropi i Americi. Tako studije rađene na ispitanicima sa hroničnim HCV-om u Japanu, potvrđuju jasnu vezu između nukleotidnih izmena u ISDR i odgovorom na antivirusnu terapiju, dok studije koje se odnose na američku i evropsku populaciju potvrđuju manju učestalost nukleotidnih supstitucija u delu NS5A koje su u korelaciji sa odgovorom na terapiju (El-Shamy i sar., 2011; Goyal i sar., 2007; Kitamura i sar., 2010; Macquillan i sar., 2004; Noguchi i sar., 2011; Sarrazin i sar., 2002).

Prema Pfeifferu, *in vitro* istraživanja na ćelijskim linijama pokazala detektovane su dve mutacije odgovorne za rezistenciju na ribavirin za vreme replikacije a to su: G404S i E442G na karboksilnom kraju NS5A (Pfeiffer i Kirkegaard, 2005). U delu NS5B genoma HCV-a, utvrđene nukleotidne supstitucije na pozicijama od 300 - 358 nt su u korelaciji sa odgovorom na kombinovanu terapiju kod pacijenata sa genotipom *1b*. Naime, ispitanici inficirani virusom koji ima supstitucije na navedenim pozicijama u delu NS5B postižu SVO, za razliku od NR-a, kod kojih nema izmena u ovom regionu HCV genoma (Asahina i sar., 2005; Hamano i sar., 2005). Takođe, u asocijaciji sa odgovorom na terapiju je i ak supstitucija na poziciji 415 (Sugihara i sar., 2006; Ward i sar., 2008). Aktivnost enzima predstavlja ključnu ulogu u replikaciji, pa su istraživanja u smislu korelacije nukleotidnih izmena u okviru dela NS5B regiona genoma HCV-a, i odgovora na terapiju prilično atraktivna (Maekawa i Enomoto., 2009; Pawlotsky, 2000).

Nakon svega može se reći da je odgovor na antivirusnu terapiju zavisao od varijacija u humanim genima koji kontrolišu antivirusni imuni odgovor, kao i različitim promenama unutar HCV genoma, koji potiskuju imuni odgovor. Neophodno je u potpunosti razumeti molekularne mehanizme koji se dovode u vezu s tim na koji način kao i koji to humani i virusni geni utiču na ishod lečenja kombinovanom terapijom. Zbog svih štetnih pratećih efekata prilikom lečenja kao i skupe kombinovane antivirusne terapije neophodno je identifikovanje molekularnih markera koji bi mogli da ukažu na verovatnoću postizanja SVO nakon terapije.

2 Ciljevi

- Definisane bioinformatičkog kriterijuma zasnovanog na genetičkim karakteristikama virusa koji omogućava predviđanje odgovora hroničnih HCV bolesnika inficiranih genotipom *1b* na kombinovanu terapiju.
- Testiranje predloženog bioinformatičkog kriterijuma na pretretmanskim proteinskim sekvencama virusa, bolesnika sa hroničnim C hepatitisom genotipa *1b* sa teritorije Srbije.
- Formirati homogenenu grupu u odnosu na: osobenosti hepatitis C virusa (tip, podtip) i odgovora na antivirusnu kombinovanu terapiju.
- Optimizacija primenjenih metoda.
- Utvrditi moguću korelaciju između kliničko-patoloških karakteristika posmatranog uzorka i odgovora na antivirusnu terapiju.

3 Materijal i metode

3.1. Materijal

Uzorci plazme su sakupljeni od 600 osoba koje su bile sero - pozitivne za anti-HCV antitela (3.0 HCV ELISA Test System, Ortho Diagnostic Systems, Germany). Na osnovu podataka o polu, starosnoj dobi, nivoa alanin aminotransferaze (ALT), genotipa HCV, koncentracije RNK HCV i odgovora na antivirusnu terapiju odabrali smo grupu od 100 pacijenata. U dalju analizu uključeno je 48 uzoraka za koje smo uspešno dobili odgovarajući PCR produkt. Svih 48 pacijenata bilo je uključeno u program pripreme za interferonsku terapiju. Indikacije za primenu antivirusne terapije su: povećan nivo ALT i aspartat aminotransferaze (AST) u serumu, prisustvo RNK - HCV u plazmi ili serumu, nalaz biopsije jetre koji ukazuje da se radi o hroničnom hepatitisu C, kao i odsustvo svih drugih kontraindikacija za lečenje antivirusnom terapijom.

Uzorci plazme i kliničko - patološki podaci o pacijentima dobijeni su u saradnji sa Institutom za infektivne i tropske bolesti (Odeljenje za virusne hepatitise), Infektivnom klinikom - Vojnomedicinske akademije, Gastroenterohepatološkom klinikom Kliničkog Centra Srbije u Beogradu i sa D.O.O. F. Hoffman - La Roche predstavništvom u Beogradu.

Histopatološke analize tkiva jetre dobijenih biopsijom rađene su na navedenim klinikama. Klasifikacija nalaza biopsije jetre po METAVIR sistemu. Stadijumi fibroze su obeleženi od F0-F4 gde je: F0: bez fibroze; F1: laka fibroza (portalna fibroza bez septuma); F2: umerena fibroza (portalna fibroza sa nekoliko septi); F3 teška fibroza (septalna fibroza bez ciroze) i na kraju F4: ciroza jetre.

U radu su kao uzorci humanog tkiva korišćeni uzorci plazme, sakupljeni u periodu od juna 2003. godine do maja 2007. godine. Nakon pripreme, uzorci su čuvani na -20°C najviše mesec dana pre izolacije RNK, odnosno analize genomskog materijala HCV-a. Svi analizirani izolati su u našoj laboratoriji evidentirani pod svojim registarskim brojevima, ali radi lakšeg objašnjenja i poređenja sa rezultatima DNK sekvenciranja izolati su obeleženi i arapskim brojevima od 1 do 48.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka plazme za izolaciju ukupne RNK HCV

U našem radu plazma je pripremana rutinskim kliničkim tehnikama na sledeći način: uzeli smo 3 ili 4 mL krvi u vakutajner tube u kojima se nalazi EDTA (*etilendiamintetraacetat*) antikoagulans (0,068 mL, K3 EDTA, 15% rastvor) Becton Dickinson #6454, potom smo odvojili plazmu centrifugiranjem na 2500 g u trajanju od 20 min. na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja jasno smo uočili tamno crvena donja faza (sa eritrocitima) i mutno žuta gornja faza sa krvnom plazmom. Plazma je prenetu automatskom pipetom i sterilnim nastavcima sa filterom u sterilne polipropilenske tube sa poklopcima i sigurnosnom gumom sa unutrašnje strane, i čuvana u frižideru na temperaturi od - 20⁰C do - 80⁰C. Sterilne propilenske tube imaju poklopac sa zavrtnjem i sigurnosnu gumu što olakšava otvaranje tube, čime se smanjuje mogućnost kontaminacije među uzorcima i pojava lažno pozitivnih rezultata, kao i mogućnost rada sa većim brojem uzoraka. Uzorci plazme su prikupljeni na navedenim klinikama i čuvani na - 80⁰C.

3.2.1.1. Priprema laboratorijskog pribora za rad sa RNK

Velika osetljivost RNK na uslove sredine, pogotovo na ribonukleaze (RNK - aze) uslovljava zahtev za posebnim uslovima za rad u laboratoriji. RNK-aze mogu biti prisutne u svakom koraku počevši od izolacije RNK kao i kroz sve naredne tehnike koje se obavljaju u laboratoriji, te je najvažnije inaktiviranje RNK-aza koje se za razliku od DNK-aza vrlo teško inhibiraju, otporne su na temperaturu i sveprisutne su. Pripremali smo laboratorijsko posuđe, vodu i ostalu opremu za izolaciju RNK na sledeći način:

- Stakleni sudovi se izlagažu temperaturi od 200⁰C preko noći, a plastični sudovi se potapaju u 0,1 N NaOH/1 mM EDTA i ispiraju sa DEPC-tretiranom dd H₂O.
- Epruvete i nastavci za jednokratnu upotrebu od polipropilena su predhodno autoklavirane. Destilovana voda koja je potpuno oslobođena RNK-aza pripremljena je dodavanjem DEPCA u ddH₂O u finalnoj koncentraciji od 0,05 do 0,01%. Rastvor je

inkubiran na 37⁰C preko noći i potom autoklaviran u trajanju od 30 min. da bi se potpuno degradirao DEPC. Svi vodeni rastvori za rad sa RNK su pripremani sa DEPC-ddH₂O osim rastvora TRIS-a (Sambrook i sar., 1989).

3.2.1.2. Izolacija ukupne RNK iz humanih tkiva (plazme)

Važan korak za *in vitro* enzimske reakcije, u kojima je matrica RNK je čistoća i integritet izolovane RNK. Da bi se dobila zadovoljavajuća uspešnost ovih reakcija, tehnike za izolaciju RNK bi trebalo da ispune sledeće uslove: da efikasno liziraju ćelije i tkiva, da denaturišu nukleoproteinske komplekse, da inaktiviraju endogene RNK-aze i da oslobode RNK od nečistoća kao što je DNK i proteinske molekule. Jedan od takvih industrijski pripremljenih kitova, namenjen za metodu izolacije ukupne RNK u jednom koraku je TRIzolTM reagens (Chomczynski i Sacchi., 1987; Chomczynski., 1993).

3.2.1.3. Izolacija ukupne RNK iz plazme pomoću TRIzolTM reagensa

TRIzolTM - reagens (GibcoBRL, Life technologies) je posebno pogodan za brzu izolaciju ukupne RNK iz različitih tkiva. Ovaj reagens je industrijski pripremljena smeša guanidin izotiocanata i fenola i predstavlja primenu metode RNK izolacije u jednom koraku po autorima Chomczynski i Sacchi (1987) i Chomczynski (1993). U toku homogenizacije i lize uzorka TRIzolTM-reagens održava integritet RNK i istovremeno degradira ćelijsku membranu ćelije kao i ćelijske komponente. Dodatak hloroforma, posle čega sledi centrifugiranje dovodi do razdvajanja smeše na vodenu i organsku fazu, a RNK ostaje isključivo u vodenoj fazi iz koje se izdvaja precipitacijom sa izopropanolom. Ukupna RNK izolovana na ovaj način je oslobođena od proteinskih i DNK kontaminacija, a dovoljno prečišćena da se može koristiti za različite enzimske reakcije. Ova tehnika je posebno podesna u radu sa malom količinom biološkog materijala (50-100 mg). Ovom tehnikom se dobijaju intaktni molekuli RNK veličine od 15-0,1 kb.

Izolacija ukupne RNK pomoću TRIzolTM - reagensa se pripremana je na sledeći način:

- U obeležene tube dodavano je 100 μ L uzorka (plazme) i 1000 μ L TRIzol-a, nakon čega se rastvor TRIzol-a i plazme inkubira 5 min. na sobnoj temperaturi da se potpuno razbiju nukleoproteinski kompleksi. U tube smo dodali 0,2 mL hloroforma/1mL TRIzol - a, promešali i inkubirali 2 - 3 min. na sobnoj temperaturi.
- Tube sa uzorkom su centrifugirane na 12000 g, na temperaturi od 2 do 8⁰C, 17 min.
- Nakon odlivanja supernatanta u čistu tubu, dodali smo *t-RNK* kao nosač (oko 10 μ g po uzorku), zatim izopropanol u odnosu 1:1 sa vodenom fazom. Uzorci su inkubirani 10 min. na sobnoj temperaturi, zatim centrifugirani na 12000 g u trajanju od 10 min. na temperaturi od 2 do 8⁰C (RNK precipitat je često nevidljiv pre centrifugiranja). Nakon odlivanja supernatanta isprali smo RNK precipitat 2 puta sa 1 mL 75% etanola, zatim su sve tube centrifugirane na 7500 g, 5 min. na temperaturi od 2 - 8⁰C. Uzorci su sušeni 5 - 10 min. na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja u tube je dodavano 25 μ L DEPC - H₂O sa 15 U RNK-aznog inhibitora.

3.2.1.4. Izolacija ukupne RNK hepatitis C virusa iz plazme za određivanje koncentracije RNK HCV na instrumentu Cobas Amplicor

Cobas Amplicor (CA) - (Roche Molecular Systems, Nemačka) je instrument koji obavlja automatsku amplifikaciju i detekciju. Određivanje koncentracije RNK HCV na ovom instrumentu zahteva primenu standardizovanog HCV monitor testa, (v.20) (Roche Molecular Diagnostics, Nemačka). Ovaj test jedan je od *in vitro* testova u kojem se putem amplifikacije nukleinskih kiselina određuje količina RNK HCV-a u humanoj plazmi. Izolacija ukupne RNK HCV iz plazme podrazumevala je:

Priprema radnog reagensa za lizu ćelija:

- HCM LYS, v2.0 (pufer za lizu ćelija) pripreman je mešanjem uz blago grejanje na temperaturi od 20 do 37⁰C.
- Pripreman je HCM QS, v2.0 (standard za kvantifikaciju) i potom mešan vorteksovanjem.
- Dodavanjem 100 μ L HCM QS, v2.0 u HCM LYS, v2.0 dobijen je radni reagens za lizu ćelija koji je stabilan 4 sata na sobnoj temperaturi, potom je u obeležene tube dodavano je 400 μ L radnog reagensa za lizu ćelija.

Priprema kontrola za monitor test

- Pripremane su tri tube za kontrole : HCV C (-), v2.0, HCV L (+) C, v2.0 i HCV H(+)C, v2.0. U sve tri kontrolne tube dodavano je 100µL NHP i 100µL svake kontrole, nakon čega su ovako pripremljene tube kratko vorteksovane.

Izolacija RNK HCV iz plazme uzoraka sa Roche-ovim kitom za izolaciju:

- Tube sa uzorcima plazme kratko su vorteksovane a potom i centrifugirane da se tečnost spusti sa poklopca.

- 100µL plazme prebacivano je u obeležene tube u kojima se nalazi radni reagens za lizu ćelija, nakon čega su tube kratko vorteksovane.

- Tube su inkubirane u suvom bloku za grejanje, 10 min. na $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, a potom i vorteksovane.

- U svaku tubu dodavano je po 500µL izopropanola na sobnoj temperaturi i ostavljene 2 min. na sobnoj temperaturi.

- Tube sa sadržajem su centrifugirane na 15000 g, 15 min. na sobnoj temperaturi.

- Nakon odlivanja supernatanta dodavan je po 1 mL 70% etanola, a dobijena smeša je kratko vorteksovana.

- Uzorci su sušeni 5 - 10 min. na sobnoj temperaturi.

- Nakon sušenja u tube je dodavano 1000µL HCV DIL, v2.0. Pelet je razbijan nastavkom, a zatim vorteksovao 10s. Najduže 3 sata od pripreme, materijal se koristi za amplifikaciju, ili se čuva na -70°C do jednog meseca i to ne sa više od 2 odmrzavanja. Za amplifikaciju pomoću CA HCV MONITOR test, v2.0 koristilo se 50µL izolata.

3.2.1.5. Izolacija RNK HCV iz plazme za kvantitativni PCR u realnom vremenu

Drugi *in vitro* test koji je primenjen u okviru naše studije za određivanje koncentracije RNK HCV je i kvantitativni PCR u realnom vremenu za kojeg smo u okviru našeg istraživanja koristili HCV kvantitativni test (*HCV R - TMQ test, Sacace biotechnologies, Como, Italija*). Izolacija ukupne RNK HCV u našem radu podrazumevala je rad sa standardizovanim kitom za izolaciju RNK (*Sacace biotechnologies, Como, Italija*), a sastoji se iz sledećih koraka:

Priprema radnog reagensa za lizu ćelija:

- HCV LYS (pufer za lizu ćelija) pripreman je mešanjem uz blago grejanje na temperaturi od 60 - 65⁰C.
- Pripremana je i HCV IC (interna kontrola) mešanjem na vorteksu u tajanju od 5-10s.
- Dodavanjem 120μL HCV IC u bočicu sa HCV LYS dobijen je radni reagens za lizu ćelija. U obeležene tube dodavano je po 450μL radnog reagensa za lizu ćelija.

Priprema kontrola za kvantitativni test na HCV R-TM:

- Pripremane su tri tube za kontrole: HCV Rec IC (-), HCV Rec Pos 1 C+ i HCV Rec Pos 2 C+.
- U tubu obeleženu za negativnu kontrolu izolacije dodavano je 100μL HCV Rec IC (-), potom smo dodali po 90μL ostale dve kontrole u obeležene tube, zatim promešali vorteksovanjem i kratko centrifugirali na sobnoj temperaturi.

Izolacija RNK HCV iz plazme uzoraka:

- U tube sa radnim reagensom dodavano je 100μL plazme, zatim kratko vorteksovano.
- U sve obeležene tube je dodavano po 25μL sorbenta koji smo pre dodavanja snažno vorteksovali.
- Tube su inkubirane 10 min. na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje i vorteksovanje.
- Nakon inkubacije sve tube sa sadržajem su centrifugirane 1min. na 10000 g na sobnoj temperaturi.
- Nakon odlivanja supernatanta u tube je dodavano 500μL HCV WB (pufer za pranje), nakon čega su sve tube kratko vorteksovane.
- Tube sa sadržajem su centrifugirane 1min. na 10000 g. na sobnoj temperaturi.
- Nakon odlivanja supernatanta dodavano je po 500μL 70% etanola u sve tube. Sve tube sa sadržajem su vorteksovane a potom centrifugirani na 10000 g 1min. i sobnoj temperaturi. Predhodni korak smo ponovili.
- Nakon odlivanja supernatanta dodavano je 500μL acetona u svaku tubu. Sve tube sa sadržajem su vorteksovane, zatim centrifugirane na 10000 g u trajanju od 1min.
- Uzorci su sušeni oko 10 min. na termo - bloku (suvo kupatilo) pri temperaturi od 56⁰C.
- Nakon sušenja pelet je rastvoren u 50μL RNK eluenta (rastvarača). Sve tube sa sardržajem su inkubirane 10 min. na 56⁰C u termo bloku, zatim centrifugirane 12-14000 g. Materijal koji smo na ovaj način dobili se koristio za amplifikaciju isti dan nakon

izolacije ili je čuvan na -70°C . Kvantitativni test može da se radi na R-TM-u isti dan nakon izolacije. Kvantitativna interna kontrola (*HCV Rec IC*) predstavlja rekombinantnu RNK i služi kao kontrola uspešnosti svih koraka izolacije nukleinskih kiselina, amplifikacije i detekcije svakog uzorka ponaosob. Uz pomoć *HCV Rec IC* prati se mogući gubitak RNK kao i moguća inhibicija PCR-a za vreme izolacije.

3.2.1.6. Određivanje koncentracije RNK HCV u plazmi ispitivanih pacijenata

Određivanje koncentracije HCV RNK u plazmi rađeno je pomoću CA HCV monitor testa, (v.2.0) i zasniva na 5 osnovnih procesa: priprema reagenasa, uzoraka i kontrola, reverzne transkripcije, amplifikacije i detekcije. Reverzna transkripcija, amplifikacija i detekcija se automatski obavljaju na PCR delu aparata CA Analyser. Nakon reverzne transkripcije sledi amplifikacija HCV Kvantitativnog standarda i dela genomske RNK-HCV. Za CA HCV monitor Test, v2.0. se takođe koriste prajmeri koji su specifični za 5'NTR (244bp). Za svaki uzorak i kontrolu CA Analyser određuje koncentraciju RNK HCV-a. Koncentracija RNK-HCV se izražava u *IU/mL*. Internacionalni standard je određen od strane SZO gde *1 IU* odgovara 5 genom ekvivalenata, međutim ovaj test je tako pripremljen da *1 IU* odgovara 2,7 genom ekvivalenata, što može da varira u zavisnosti od date serije reagenasa i određeno je na uputstvu proizvođača. Nakon izolacije ukupne HCV RNK, pripreman je Radni reagens (Master Mix) za naredni korak - amplifikaciju.

Priprema radnog reagensa za amplifikaciju RNK HCV podrazumevala je sledeće korake:

- Određen je odgovarajući broj tubica na A ringu, a dodavanjem $100\ \mu\text{L}$ HCM Mn^{2+} , v2.0 u bočicu označenu sa HCM MMX, v2.0. dobijen je radni reagens, koji može biti stabilan 4 sata na temperaturi od $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Radni reagens
- stavljeni A prsten, dodavano je $100\ \mu\text{L}$ radnog reagensa za svaki uzorak i $50\ \mu\text{L}$ izolata. Ovako pripremljen A prsten se postavljao na CA Analyser.

Određivanje koncentracije ukupne virusne RNK (RNK HCV), urađeno je i metodom RT - PCR-a u realnom vremenu. Koncentracije RNK HCV-a i koncentracije interne kontrole (HCV IC) su određene simultano u jednoj reakciji ("duplex PCR"), a kvantifikacija je obavljena preko standardne krive komercijalnim reagensima baziranim

na TaqMan tehnologiji. U našem radu smo koristili HCV R-TMQ kita (*Sacace biotechnologies, Como, Italija*).

Esej za kvantitativni test HCV-a dizajniran je tako da su prajmeri i probe specifični za 5'NTR HCV. Koncentracija RNK HCV-a i kontrola HCV IC određena je posebno za svaki uzorak očitavanjem fluorescence na dve različite talasne dužine (*Fam* i *Joe*), izračunata na osnovu serije standardnih razblaženja, a izražena u *IU/mL*. Izgled standardne krive interne kontrole HCV IC i kvantitativnih standarda HCV dat je u **Prilogu 1a**. *Grafikon A. i grafikon B.*, a amplifikacioni plotovi QS HCV, HCV IC i nepoznate koncentracije RNK HCV uzoraka su dati u *Grafikonu C. i Grafikonu D.* Prilikom izračunavanja koncentracije RNK HCV koristi se sledeća formula:

$$\frac{\text{HCV DNK kopija/uzorku}}{\text{IC DNK kopija/uzorku}} \times \text{koeficijent}^* = \text{IU HCV/mL}$$

* koeficijent je specifičan za svaki lot koji se nalazi u kitu.

Preporučeni faktor konverzije IU HCV/mL u broj kopija/mL za dati reagens je 4.

Nakon izolacije ukupne RNK HCV pripreman je radni reagens za amplifikaciju RNK HCV, a rađen je na sledeći način:

-U tubu sa DTT, dodavano je 300 μ L RT - PCR smeše - 1, zatim 200 μ L RT - PCR smeše - 2, 20 μ L Hot Start Taq Polimeraze i 10 μ L M - MLV reverzne transkriptaze (radni reagens DTT, RT - PCR 1 i 2 smeše, stabilan je mesec dana na temperaturi od -20 $^{\circ}$ C).

- U obeležene tube je dodavano 25 μ L radnog reagensa i 25 μ L izolovane RNK. Potom je pripremano 6 standarda i 1 negativna kontrola. U obeležene tube je dodavano po 25 μ L standarda za kvantifikaciju RNK HCV (*QS1 HCV, QS2 HCV i QS3 HCV*) i kvantitativnih standarda IC (*QS1 IC, QS2 IC i QS3 IC*). U tubu za negativnu kontrolu dodavano je 25 μ L TE - pufera. Reverzna transkripcija i PCR rađeni su u reakcionoj smeši od 25 μ L. Svi uzorci kojima je određena koncentracija RNK HCV-a, ovom metodom rađeni su na aparatu (*SDS 7500, Applied Biosystems*).

3.3. Amplifikacija p7 u genomu hepatitis C virusa - manuelna metoda

Amplifikacija p7 dela genoma HCV-a podrazumevala je prethodno urađenu reverznu transkripciju kojom se RNK prevodi u molekul cDNK. Pri amplifikaciji cDNK smo koristili kit za RT - PCR u jednom koraku (*One Step RT - PCR Kit, proizvođač QIAGEN, Nemačka*), koji omogućava da u jednoj tubi završimo reakciju reverzne transkripcije i reakciju PCR-a. Ova procedura povećava specifičnost reakcije i smanjuje mogućnost za pojavu kontaminacije koja predstavlja veliki problem kod amplifikacije HCV-a. Reverzna transkripcija i PCR rađeni su sa prajmerima čije su dužine, sekvence i pozicije prikazane u **Tabeli 3.1**. Prajmeri korišćeni pri amplifikaciji dela genoma koji kodira p7 HCV-a dizajnirani su pomoću programa Primer - BLAST za dizajniranje PCR prajmera koji je baziran na programu *Primer 3* (Rozen i Skaletsky., 2000).

Komercijalni kit za odvijanje RT-PCR u jednom koraku, je mešavina koja sadrži optimalnu kombinaciju tri enzima: *Omniskript reverznu transkriptazu, Sensiskript reverznu transkriptazu i Hot Start DNA polimerazu*. *Omniskript i Sensiskript* reverzna transkriptaza su heterodimerni enzimi koji su eksprimirani u *E.coli*, dok je *HotStart* DNK polimeraza modifikovana forma rekombinantne 94-kDa DNK polimeraze izolovane iz *Thermus aquaticus*, eksprimiranoj u *E.coli*. *Reverzna transkripcija i PCR RNK HCV sa One Step RT - PCR Kitom (QIAGEN) i prajmerima za p7 deo genoma HCV-a*. Reverzna transkripcija i PCR rađena je u reakcionoj smeši od 25 μ L čije su komponente prikazane u **Tabeli 3.1**.

Tabela 3.1. Komponente reakcione smeše za RT-PCR.

Komponenta	Zapremina μL	Finalna koncentracija
<i>ddH₂O (0,01% DEPC)</i>	-	-
<i>5 x Qiagen One Step RT-PCR pufer</i>	<i>5μL</i>	<i>1 x</i>
<i>5x Q rastvor</i>	<i>5μL</i>	<i>1x</i>
<i>mešavina dNTP-ova (10 mM)</i>	<i>1μL</i>	<i>400 μM i</i>
<i>sense prajmer (P72F)</i>	<i>0.37μL</i>	<i>0.6 μM</i>
<i>antisense prajmer (P72R)</i>	<i>0.37μL</i>	<i>0.6 μM</i>
<i>QIAGEN One Step RT – PCR mešavina enzima</i>	<i>1μL</i>	-
<i>Ribonukleazni inhibitor (40 U/ μL)</i>	<i>0.125μL</i>	<i>5 U/reakciji</i>
<i>matrica</i>	<i>5μL</i>	-

Komponente QIAGEN - OneStep RT-PCR Kit-a:

QIAGEN OneStep RT - PCR pufer je 5x koncentrovan koji sadrži i Tris·Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12,5 mM Cl₂, DTT; pH 8.7,

Q - rastvor: 5x koncentrovan, sadrži aditiv koji povećava specifičnost i olakšava amplifikaciju u PCR reakciji,

Mešavina dNTP-ova: sadrži ekvimolarnu koncentraciju: dATP, dCTP, dGTP i dTTP.

Voda oslobođena od RN-aza,

Za izvođenje reakcije RT - PCR u aparatu za PCR korišćen je sledeći temperaturni profil: 50⁰C 30 min. (kada se odigrava reverzna transkripcija sa *Omniskript i Sensiskript reverznom transkriptazom*), potom sledi aktivacija *HotStart Taq polimeraze* na 95⁰C u trajanju 15 min. nakon čega se reakcija reverzne transkripcije inaktivira.

Nakon reverzne transkripcije, cDNK se umnožavala PCR reakcijom PCR - om u 38 ciklusa na sledećim temperaturama: 94⁰C→45s. (denaturacija matrice), 54⁰C→45s., (hibridizacija prajmera), 72⁰C→60s. (elongacija prajmera), i sa finalnom elongacijom u trajanju od 7 min. (na kraju hlađenje na 4⁰C u trajanju od 5 min.).

3.3.1. Reamplifikacija PCR produkta

Pored reakcije RT - PCR bila je neophodna reamplifikacija gde produkti koje smo dobili RT - PCR-om (I) služe kao matrica za drugi PCR. U slučaju slabe PCR osetljivosti, reamplifikacija može povećati prinos PCR produkta. Za analizu metodom kapilarne gel elektroforeze (automatskog sekvenciranja), koncentracija amplifikovanog produkta mora biti veća od 30 ng/100bp. Takođe, da bi se kapilarnom gel elektroforezom dobio validan rezultat, nespecifični DNK produkti mogu biti prisutni u količini manjoj od 10% u odnosu na specifični ampikon koji se sekvencira.

Reamplifikacija je rađena takođe u reakcionoj smeši zapremine od 25µL, a komponente reakcione smeše za reamplifikaciju PCR produkta su date u ***Tabeli 3.2.***

Tabela 3.2. Komponente reakcione smeše za reamplifikaciju PCR produkta.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina μL</i>	<i>Finalna koncentracija</i>
<i>ddH₂O (0,01% DEPC)</i>	-	-
<i>PCR pufer (10 x)</i>	<i>2.5μL</i>	<i>1 x</i>
<i>MgCl₂ (25 mM)</i>	<i>0.5μL</i>	<i>2.5 mM</i>
<i>mešavina dNTP-ova</i>	<i>2μL</i>	<i>0.2 mM</i>
<i>sense prajmeri (P72F i P73F)</i>	<i>0.25μL</i>	<i>0.4 μM</i>
<i>antisense prajmeri (P73R i P72R)</i>	<i>0.25μL</i>	<i>0.4 μM</i>
<i>Taq polimeraza (5 U/μL)</i> <i>1.5 UμL</i>	<i>0.2μL</i>	<i>1.5 U/μL</i>
<i>RT-PCR templet kao matrica</i>	<i>1μL</i>	-

Za reamplifikaciju željenog PCR produkta koristili smo *Dream Taq polimerazu* (MBI, Fermentas, Litvanija). Sastav PCR 10 x koncentrovanog pufera (*Dream Taq* polimeraze) je sledeći: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 50% (v/v) glicerol.

PCR reakcija se odvijala u mašini za PCR u 28 ciklusa na sledećim temperaturama: 94⁰C→45s., 60⁰C→45s., 72⁰C→60s. U prvom ciklusu inicijalna denaturacija vršena je na 94⁰C u trajanju od 5 min., a finalna elongacija je trajala 7 min., zatim hlađenje na 4⁰C u trajanju od 5 min. Produkti RT - PCR (I) reakcije su se koristili kao matrica za reamplifikaciju tj. PCR-II reakciju. Prilikom reamplifikacije temperatura hibridizacije je varirala od 58⁰C do 64⁰C. Kod nekih uzoraka smo uspešno amplifikovali fragment dužine od 488bp sa prajmerima *P72F* i *P7R*. Međutim, za većinu uzoraka (zbog degradirane virusne RNK arhiviranih uzoraka) u reamplifikaciji smo koristili parajmere čija dužina amplifikovanog fragmenta je manja: *P72F/P73R* (354bp) i *P73F/P72R* (267bp). Prajmeri koji se koriste u drugom PCR-u ili reamplifikaciji nalaze se u **Tabeli 3.3**. Uz svaku reakciju RT - PCR-a kao i prilikom reamplifikacije radili smo pozitivnu i negativnu kontrolu. Kao pozitivnu kontrolu koristili smo plazmu izolata sa koncentracijom ukupne RNK većom od 660.000 IU/mL, a za negativnu kontrolu upotreбили smo HCV negativnu plazmu (bez detektovane virusne RNK). Sve reakcije RT - PCR-a, kao i ostale PCR reakcije su rađene na PCR aparatu model *Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 2700* i *9700*.

Tabela 3.3. Prajmeri za amplifikaciju dela genoma p7 - manuelna metoda.

<i>reakcija</i>	<i>pozicija</i>	<i>naziv</i>	<i>Sekvenca prajmera (5'→3')</i>	<i>dužina amplikona (bp)</i>	<i>izvor</i>
amplifikacija regiona P7	2369-2388	P72F/+	CACCCTACCGGCCCTGTCCA	P72F/P73R (354) P72F/P72R (488)	Primer- BLAST
	2722-2703	P73R/-	AGGAGCAACGGCCATACGCC		Primer- BLAST
	2590-2609	P73F/+	TCAATGCGGCGTCTGTGGCC	P73F/P72R (267)	Primer- BLAST
	2856-2835	P72R/-	TGAGCCTAGCGAGGAACACC TT		Primer- BLAST

3.4. Genotipizacija HCV-a

3.4.1. Genotipizacija HCV-a pomoću PASA tehnike za C gen

Za genotipizaciju HCV-a koriste se tehnike kojima se određuju bazne zamene u odnosu na izabranu konsenzus sekvencu. Sve tehnike za genotipizaciju koje se zasnivaju na PCR tehnikama u osnovi imaju tri pristupa u identifikaciji baznih zamena i to na osnovu: određivanja primarne strukture cDNK, sekundarne strukture cDNK i na osnovu primarne i sekundarne strukture istovremeno.

Jedna od tehnika koja utvrđuje bazne zamene u odnosu na određenu konsenzus sekvencu je i *PASA* tehnika za *C* gen (eng. “*Polymerase Amplification of Specific Alleles*”). Genotipizaciju HCV-a pomoću *PASA* tehnike za *C* gen konstruisao je Okamoto sa saradnicima (Okamoto i sar., 1992). Tehnika se zasniva na postojanju regiona specifičnih za genotip u *C* genu ovog virusa tako, da za svaki genotip postoji mogućnost konstrukcije specifičnog prajmera (**Tabela 3.4.**). U PCR smešu se dodaju sense prajmeri za sve genotipove, koji će se hibridizovati sa matricom i dati amplifikovani produkt u zavisnosti od genotipa ispitivanog izolata HCV-a.

Kao i u predhodnoj metodi smo koristili RT-PCR Kit (*OneStep*), sa istim finalnim koncentracijama PCR reakcione smeše za amplifikaciju dela P7 HCV-a u volumenu od 25µL.

RT - PCR i PCR (I) rađen je sa: sense prajmerima *G1* i *G1a* i antisense prajmerom *G2* u finalnoj koncentraciji 0,4 μM. Za izvođenje reakcije RT - PCR u aparatu za PCR korišćen je sledeći temperaturni profil: 50⁰C 30 min. (kada se odigrava reverzna transkripcija), potom sledi aktivacija *HotStart Taq polimeraze* na 95⁰C u trajanju od 15 min. nakon čega se dolazi do inaktivacije reverzne transkripcije.

Nakon završetka reverzne transkripcije cDNK se umnožava u aparatu PCR u 28 ciklusa na sledećim temperaturama: 94⁰C→45s., 56⁰C→45s., 72⁰C→45s., a finalna elongacija je trajala 3 min. (Reakcija se završava na kraju hlađenjem na 4⁰C u trajanju od 5 min.). Reakcije RT - PCR-a i PCR (I) smo uradili sa istim finalnim koncentracijama PCR reakcione smeše za amplifikaciju dela p7 HCV-a, u volumenu od 25μL.

Druga PCR reakcija (PCRII) je rađena sa sense prajmerima *G3* i *G3a* i antisense prajmerima *G1*, *G1a*, *GII*, *GIII*, *GIV*, *GV*, *GVII*, *GVIII'* i *GVIII''* u finalnoj koncentraciji od 0,4 μM.

Ostale komponente PCR (II) reakcione smeše su rađene sa istim finalnim koncentracijama PCR reakcione smeše kao i za reamplifikaciju dela P7 HCV u volumenu od 25μL. Za izvođenje reakcije PCR (II) u aparatu za PCR, u 26 ciklusa korišćen je sledeći profil: početna denaturacija na temperaturi 94⁰C u trajanju od 3 min, 94⁰C→45s. (denaturacija matrice), 54⁰C→45s. (hibridizacija prajmera), 72⁰C→60s. (elongacija prajmera), a u poslednjem ciklusu finalna elongacija je trajala 3 min. na temperaturi od 72⁰C i na kraju hlađenje u trajanju od 5 min. na temperaturi od 4⁰C. Prajmeri korišćeni za genotipizaciju RNK HCV-a prikazani su u **Tabeli 3.4**.

Tabela 3.4. Prajmeri korišćeni u RT-PCR-u za genotipizaciju HCV-a.

<i>reakcija</i>	<i>pozicija</i>	<i>naziv</i>	<i>sekvenca prajmera (5'→3')</i>	<i>dužina amplikona (bp)</i>	<i>Literatura</i>
Genotipizacija					
I PCR	480 do 500	G1/+	CGCGCGACTAGGAAGACTTC		Okamoto i sar., 1992.
	480 do 500	G1a/+	CGCGCGACGCGTAAAACCTTC		Okamoto i Mishiro,
	731 do 751	G2/-	ATGTACCCCATGAGGTCGGC	272	Okamoto i Mishiro,
II PCR	489 do 509	G3/+	AGGAAGACTTCCGAGCGGTC		Okamoto i sar., 1992.
	489 do 509	G3a/+	CGTAAAACCTTCTGAACGGTC		Okamoto i Mishiro,
	517 do 537	GI/-	TGCCTTGGGGATAGGCTGAC	57 (1a)	Okamoto i sar., 1992.
	185 do 204	GIa/-	GGATAGGCTGACGTCTACCT	49 (1a)	Okamoto i Mishiro,
	612 do 632	GII/-	GAGCCATCCTGCCACCCCA	144 (1b)	Okamoto i Mishiro,
	641 do 662	GIII/-	CCAAGAGGGACGGGAACCTC	174 (2a)	Okamoto i Mishiro,
	591 do 611	GIV/-	ACCCTCGTTTCCGTACAGAG	123 (2b)	Okamoto i Mishiro,
	556 do 576	GV/-	GCTGAGCCCAGGACCGGTCT	88 (3a)	Okamoto i Mishiro,
	333 do 352	GVII/-	TGCGGGACCTCCGCCGGGA	205 (4)	Spada i sar., 1998.
	318 do 337	GVIII'	GGGGGTCAGTGGGGCCCCAT	106 (2c)	Spada i sar., 1998.
	233 do 253	GVIII''	GGGGCCAAGGGTATCCTGGCC	191 (2c)	Spada i sar., 1998.

-Sekvenca prajmera komplementarna delovima iz 5'NTR-a, pozicija nukleotida po Choo i sar., 1991.

-Sekvenca prajmera komplementarna delovima iz C gena, pozicija nukleotida po citiranim autorima, a polarnost je obeležena kao sense “+” i antisense “-”.

3.4.2. Određivanje HCV genotipova - genotip specifičnim PCR testom

Pored PASA tehnike za HCV genotipizaciju koristili smo i komercijalni *in vitro* test za određivanje HCV genotipova putem reverzne transkripcije i PCR-a, sa genotip specifičnim prajmerima (*HCV Genotype Kit, Sacace biotechnologies, Italija*). Kao i kod prethodnih testova postoji nekoliko glavnih koraka koji podrazumevaju: izolaciju ukupne RNK HCV, reverznu transkripciju RNK i amplifikaciju. U okviru ovog kita nalaze se genotip specifični prajmeri za najučestalije genotipove, a to su: *1a, 1b, 2 i 3a*. Protokol za izolaciju RNK je isti kao za HCV R-TMQ test. Nakon izolacije RNK HCV-a, urađena je reverzna transkripcija. Reverzna transkripcija je podrazumevala pripremu radnog reagensa (Master Mix) na sledeći način:

- U tubu sa RT mixom dodali smo 5 μ L *RT-G- mixa - 1 (smeše)*, zatim vorteksovali i kratko centrifugirali na sobnoj temperaturi. Master mix pripremljen na ovaj način stabilan je mesec dana na temperaturi od - 20 $^{\circ}$ C.
- Zatim 6 μ L M-MLV (reverzne transkriptaze) je dodavano je u tubu sa Master mixom, potom kratko vorteksovano i centrifugirano u trajanju od 3 do 5s.
- U obeležene tube dodavano je 10 μ L reakcionog mixa i 10 μ L izolovane RNK, nakon čega je sledila reakcija reverzne transkripcije u aparatu za PCR na temperaturi od 37 $^{\circ}$ C u trajanju od 30 min.
- Nakon reverzne transkripcije rastvorena je cDNK sa TE puferom u odnosu 1:2. Ovako pripremljena cDNK može da se čuva u frižideru na temperaturi od -20 $^{\circ}$ C mesec dana, a na - 80 $^{\circ}$ C i do godinu dana.

Sledeći korak je *amplifikacija*:

- Pripremane su tube sa komercijalno napravljenim PCR smešama za *genotipove 1a/ 1b* i PCR smešama za *genotipove 2 i 3a*. Potom je dodavano 10 μ L *PCR-mix-a 2* i 5 μ L *cDNK* (uzorka) nakon reakcije RT. U tubu za (-) kontrolu amplifikacije dodavno je 5 μ L DNK pufera.
- 5 μ L HCV cDNK (uzorka) je dodavano u tubu sa PCR smešom koja sadrži genotipove *1a i 1b*, zatim u tubu sa PCR smešom za genotip *2 i 3a*. genotip *3a* dodavana je ista količina cDNK.

Reakcija amplifikacij je strogo kontrolisana uslovima proizvođača. Temperaturni uslovi pod kojima se odvijala reakcija su bili sledeći: 95⁰C→5 min. (početna denaturacija), potom u 42 ciklusa cDNK se umnožavla na: 95⁰C→10s., 68⁰C→10s., 72⁰C→10s. U poslednjem ciklusu finalna elongacija je trajala 1 min. Na kraju reakcija se završavala hlađenjem na temperaturi od 4⁰C u trajanju od 5 min. Amplifikovani produkti su se čuvali na temperaturi od - 20⁰C. Sve reakcije RT - PCR - a sa *Sacace* - ovim kitovima su takođe rađene na PCR aparatu model *Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 2700 i 9700*.

Rezultati su bazirani na prisustvu ili odsustvu specifičnih traka amplifikovane DNK i proveravali su se na 8% PAA gelu. Dužina amplifikovanih fragmenata DNK u zavisnosti od genotipova je bila sledeća: za genotip *1a* dužina fragmenta iznosila je 338 bp, a 395 bp za genotip *1b*. Dužina fragmenta od 286 bp odgovarala je genotipu 2, a za genotip *3a* dužina fragmenta iznosila je 227 bp.

3.5. Elektroforetska provera rezultata RT-PCR reakcija i priprema poliakrilamidnog gela

Analiza rezultata PCR, postignuta je elektroforezom na 8% poliakrilamidnom (PAA) gelu u nenedenurišućim uslovima. Komponente za pripremu gela mogu se videti u *Tabeli 3.5*.

Tabela 3.5. Komponente 8% poliakrilamidnog gela.

<i>procenat (količina) gela</i>	<i>8.0% (25 ml)</i>
PAA štok 40% (38:2;akrilamid: bis-akrilamid)	5.0 mL
10 x TBE*	2.5 mL
10% amonijum persulfat	210 µL
N, N, N',N' TEMED	16.0 µL
ddH ₂ O	17.5 mL

* *Sastav 10 x TBE pufer, pH 8.3 je: 108 g Tris, 55 g H₃BO₃, 40 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0; ddH₂O do 1000 mL.*

Elektroforeza se odvijala u vertikalnom polju u kadama sa 1x TBE puferom, u trajanju od 2 sata na 8V/cm. Na gel smo nanosili 6 μ L uzorka pomešanog sa 2 μ L boje (0,25% bromfenol plavo, 0,25% ksilen cianol u 30% glicerolu). Vizuelizacija razdvojenih DNK fragmenata na gelu se izvodila postupkom bojenja srebro nitratom (AgNO_3) (Hiort i sar., 1994).

Postupak bojenja DNK na PAA gelu sa srebronitratom AgNO_3 je rađen po sledećem protokolu:

- Gel je bio potopljen 10 minuta u 10% etanol, zatim 3 minuta u 1% HNO_3 . Nakon toga gel je ispran u ddH₂O (4x). Nakon ispiranja, gel je potopljen u 0,2% AgNO_3 u trajanju od 20 do 30 min., nakon čega smo ponovno isprali gel u ddH₂O (4x). Na kraju gel je potopljen u 30% Na_2CO_3 sa 0,02% formaldehidom do momenta pojave traka, zatim ispran u 10% CH_3COOH , potom u ddH₂O (4x).

3.5.1. Metoda prečišćavanja PCR produkta

Nakon amplifikacije PCR produkt mora da se prečisti od zaostalih komponenti reakcije. U ovom radu je korišćen Kit za ekstrakciju DNK (MBI Fermentas, Litvanija). Prečišćavanje se zasniva na sledećem principu: u prisustvu haotropnih soli, 6 M rastvora natrijum jodida (eng. *Binding Solution, BS*), DNK se prvo vezuje za specijalno dizajnirane staklene čestice, a zatim da bi se dobila prečišćena DNK, ove soli i zaostale nečistoće uklanjaju se ispiranjem u odgovarajućim puferu koji sadrži u jednakom odnosu supstance (Tris, NaCl, EDTA) i 95% etanol (eng. *Washing Buffer, WB*). Nakon ispiranja, DNK se eluira sa staklenih čestica pomoću ddH₂O ili odgovarajućeg pufera.

Metoda prečišćavanja se izvodila na sledeći način:

-Sadržaj PCR produkta u tubi podeljen je na dva jednaka dela i potom je dodavano 3 volumena BS rastvora i odgovarajuće zapremine resuspendovane silika-puder suspenzije koja sadrži staklene čestice za vezivanje DNK (2 μ L suspenzije vezuje 1 μ g DNK). Tube su inkubirane na temperaturi od 55⁰C u trajanju od 5 - 15 min, sa kratkim vorteksovanjem svaka 2 min, potom su sve tube centrifugirane 5s. na 10000 g.

- Nakon odlivanja supernatanta dodavano je 500 μ L hladnog WB. Pelet je razbijan nastavkom automatske pipete, zatim su tube centrifugirane 5s. na 10000 g, nakon čega je ponovo odliven supernatant. Navedeni postupak je ponovljen još 2 puta.

- Uzorci u tubama su sušeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 - 15 min.
- Ispiranje cDNK je rađeno dodavanjem 40 μ L 1 mM TRIS-HCl, pH 8.0, potom je pelet razbijan nastavkom automatske pipete, nakon čega su tube sa uzorcima inkubirane u trajanju od 5 min. na 55⁰C.
- Nakon inkubacije sve tube su centrifugirane 30s. na 11000 g, nakon čega je supernatant odliven u novu tubu. Ovaj postupak je ponovljen još 2 puta sa istom količinom 1 mM TRIS- HCl, pH 8.0.

Ispiranje i rastvaranje cDNK

- Nove tube sa odlivenim supernatantom centrifugirane su u trajanju od 20 min. na 13000 g pri temperaturi od 4⁰C, nakon čega smo ponovo preneli supernatant u čiste tube i dodali 1/2 volumena 70% etanola, potom centrifugirali 10 min. na 13000 g na temperaturi od 4⁰C. Nakon odlivanja supernatanta uzorci su sušeni u trajanju od 15 - 30 min. dok sav etanol ne upari.
- cDNK je rastvorena u 40 μ L ddH₂O ili 1 mM TRIS-HCl, pH 8.0 i može se čuvati na temperaturi od - 20⁰C. Ovako prečišćen PCR produkt je bio spreman za automatsko DNK sekvenciranje.

3.5.2. Automatsko sekvenciranje p7

Automatsko sekvenciranje amplifikovanog fragmenta iz p7 dela genoma HCV-a rađeno je na automatskom sekvenatoru metodom završetka lanca (ABI 310, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Svi virusni izolati su sekvencirani na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Institut za mikrobiologiju i imunologiju i u MWG - Biotech Company u Nemačkoj. Metoda je bazirana na kapilarnoj elektroforezi sa fluorescentno obeleženim ddNTP-ovima (Sanger i sar., 1997). Rezultat automatskog sekvenciranja dobija se u vidu grafičkog i slovnog zapisa, nakon čega se može pristupiti detaljnoj analizi sekvence primenom različitih metoda. Sekvenciranje je rađeno sa kombinacijom prajmera: *P72F/P72R* (488bp), *P72F/P73R* (354bp) i sa *P73F/P72R* (267bp) u oba smera: sense i antisense lanac.

3.6. Statistička obrada podataka

Za ispitivanje razlika u distribuciji dobijenih frekvencija između dve ili više kategorijskih varijabli korišćen je *Pirsonov χ^2 test*. Normalna distribucija kontinualnih varijabli testirana je *Kolmogorov - Smirnovim* testom sa Lilliefors' korekcijom.

Za utvrđivanje razlike srednjih vrednosti kontinualnih varijabli koje su u normalnoj raspodeli između dve grupe korišćen je *t - test* za nezavisne uzorke ili *Mann Whitney U-test* kao neparametrijski test za kontinualne varijable koje nisu bile u normalnoj raspodeli.

Za utvrđivanje razlike srednjih vrednosti kontinualnih varijabli koje su u normalnoj raspodeli između tri ili više grupa korišćen je test analize kovarijanse (ANCOVA) sa odgovorom na terapiju kao kovarijatom i odgovarajućim *post - hock testom*. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (*SD*).

U svim testovima vrednost verovatnoće od $p < 0.05$ smatrana je značajnom, a sve statističke analize su urađene korišćenjem programa *Statistica 8.0 Software* i *Microsoft Excel 7.0*.

3.7. Bioinformatička analiza

3.7.1. Metod informacionih spektara (ISM)

Za analizu informacionog sadržaja proteina virusa hepatitisa tipa C i uspostavljanje bioinformatičkog kriterijuma za procenu odgovora na kombinovanu terapiju, primenjen je *metod informacionih spektara*. Metod informacionih spektara (*ISM*) predstavlja virtuelnu spektroskopsku tehniku koja omogućava analizu raspodele aminokiselinskih ili nukleotidnih motiva koji određuju biološku funkciju proteinskih i nukleotidnih sekvenci (Veljkovic i Cosic, 1987; Veljkovic i Lalovic, 1990).

U okviru ovog metoda svaka sekvenca od N aminokiselina ili nukleotida tretira se kao linearni niz od N članova, pri čemu se svakom članu pridružuje određena težinska vrednost. Težinski faktor koji se pridružuje komponentama sekvence predstavlja vrednost potencijala elektron-jon interakcije koji određuje elektronske

osobine aminokiselina i nukleotida koje su bitne za njihovu biološku funkciju (Veljkovic i Slavic, 1972; Veljkovic, 1973; Veljkovic i sar., 1985). U **Tabeli 3.6.** date su vrednosti potencijala elektron-jon interakcije izračunate za 20 ak. Na taj način alfabetski kod kojim je prvobitno bila predstavljena primarna struktura, transformiše se u numerički niz.

Tabela 3.6. Vrednosti potencijala elektron - jon interakcije za aminokiseline (Veljkovic, 1990).

Aminokiselina	PEJI (Ry)
Leu (L)	0
Ile (I)	0
Asn (N)	0.0036
Gly (G)	0.005
Val (V)	0.0057
Glu (E)	0.0058
Pro (P)	0.0198
His (H)	0.0242
Lys (K)	0.0371
Ala (A)	0.0373
Tyr (Y)	0.0516
Trp (W)	0.0548
Gln (Q)	0.0761
Met (M)	0.0823
Ser (S)	0.0829
Cis (C)	0.0829
Thr (T)	0.0941
Phe (F)	0.0946
Arg (R)	0.0959
Asp (D)	0.1263

Za određivanje parametara koji korelira sa biološkom funkcijom sekvenci bitno je odrediti zajedničke karakteristike sekvenci sa zajedničkom biološkom funkcijom.

Kros - spektralna funkcija (KS) definiše zajedničke frekventne karakteristike dva signala. Kod izračunavanja multiple kros spektralne funkcije javlja se problem množenja spektara sekvenci različite dužine. Poznato je da se spektar numeričkih nizova uvek nalazi u frekvencionom opsegu od 0 do 0.5. Međutim, rezolucija spektra zavisi od ukupnog broja tačaka polazne sekvence. Zato je nemoguće množiti spektre, tačku po tačku, u slučaju sekvenci različite dužine. U tom slučaju je potrebna interpolacija unutar spektra manje rezolucije. S druge strane, poznato je da se dodavanjem nula na originalni niz, ne menja oblik odgovarajuće spektralne funkcije, ali se broj tačaka u spektralnoj funkciji povećava. Za računsku realizaciju IS metoda korišćena je brza *diskretna Furijeova transformacija (DFT)*, koja zahteva da dužina analiziranog niza bude jednaka nekom stepenu broja dva. Da bi se ovo postiglo, čak i za određivanje spektara pojedinačnih sekvenci potrebno je dodavanjem nula podesiti dužinu sekvence. Na isti način se unutar grupe sekvenci dužina pojedinih sekvenci podešava na dužinu najduže sekvence. Za proteinske sekvence korišćene su standardne dužine nizova od 32, 64, 128, 256, 512 i 1024 tačaka.

Osnovne prednosti spektralnog predstavljanja primarne strukture bioloških makromolekula su: (i) mogućnost poređenja makromolekula sa veoma različitom primarnom strukturom, (ii) mogućnost analize odnosa između strukture i funkcije makromolekula bez informacije prethodno dobijene iz eksperimenta i (iii) mogućnost međusobnog poređenja informacionog sadržaja nukleotidnih i proteinskih sekvenci.

3.7.2. Kompjutersko skeniranje proteina peptidima različitih dužina

Kompjuterskim skeniranjem peptida različitih dužina identifikuju se linearni regioni proteina koji najviše doprinose vrednosti amplitude na karakterističnoj frekvenci. Kompjuterskim skeniranjem primarne strukture proteina p7 preklapajućim peptidima različitih dužina je određen domen koji najviše doprinosi informaciji reprezentovanoj karakterističnom frekvencom $F(0.0625)$.

3.7.3. Sekvence HCV preuzete iz baza euHCV i Genbank koje su korišćene u bioinformatičkoj analizi

Sekvence HCV preuzete su iz euHCVdb i Genbank baze sekvenci u standardnom fasta formatu. FASTA format je standardan format je u bioinformatici kojim se predstavljaju nukleotidne i peptidne sekvence sa nukleotidima ili aminokiselinama predstavljenim jednim slovom. Prikaz sekvence u FASTA formatu počinje počinje simbolom veće od (" $>$ "), sledi identifikaciona oznaka sekvence, zatim opcionalno opis, potom sekvenca proteina ili nukleotida predstavljena jednim slovom. UniProt je univerzalna proteinska baza koja sadrži proteinske sekvence i brojne podatke o proteinima i sastoji se iz 2 odeljka UniProtKB/SwissProt i UniProtKB/TrEMBL.

Pretrajanske sekvence virusnih proteina analizirane ISM bioinformatičkom metodom dobijene su u okviru ispitanika inficiranih HCV-om genotipa *1b* koji su učestvovali u Virahep - C virusnoj genetičkoj studiji. Ispitanici iz ove studije su bili na terapiji pegilovanim interferonom i ribavirinom, u periodu koji je maksimalno trajao 48 nedelja (Donlin i sar., 2007; Mihm i sar., 2006).

Navedene sekvence HCV genotipa *1b* iz studije Donlina i sar, (2007), korišćene kao trening set, preuzete su iz baze GenBank sa sledećim identifikacionim brojevima: [EF407458] do [EF407472] - preterapijske proteinske sekvence virusnih izolata, ispitanika koji su nakon 28 dana od početka terapije dobro odgovarali ; [EF407473] do [EF407488] - preterapijske proteinske sekvence virusnih izolata ispitanika sa lošim odgovorom na terapiju 28. dan nakon početka terapije. Kod dobrih respondera (DR) pad koncentracije RNK HCV je bio veći od $3.5 \log_{10}$ ili nedektabilan od početka terapije do 28. dana, a kod loših respondera (LR) pad koncentracije RNK HCV je bio manji od $1.4 \log_{10}$ (Aurora i sar., 2009; Donlin i sar., 2007). Pretrajanske sekvence HCV-a, su grupisane i u odnosu na terapijski ishod SVO ili NR (Donlin i sar., 2010).

Sekvence HCV-a, genotipa *1b* proteina p7 iz studije Mihma i sar, (2006) sa poznatim odgovorom na kombinovanu terapiju IFN/ ribavirin koje su korišćene kao test set su preuzete iz baze GenBank sa sledećim identifikacionim brojevima: [AM263232], [AM263233], [AM263235], [AM263239], [AM263240], [AM263241], [AM263245], [AM263246], [AM263247], [AM263248], [AM263249], [AM263250], [AM263260],

[AM263261], [AM263262], [AM263264], [AM263269], [AM263274], [AM263276], [AM263277], [AM263278], [AM263287], [AM263288], [AM263289].

3.7.4. Višestruko poravnavanje sekvenci

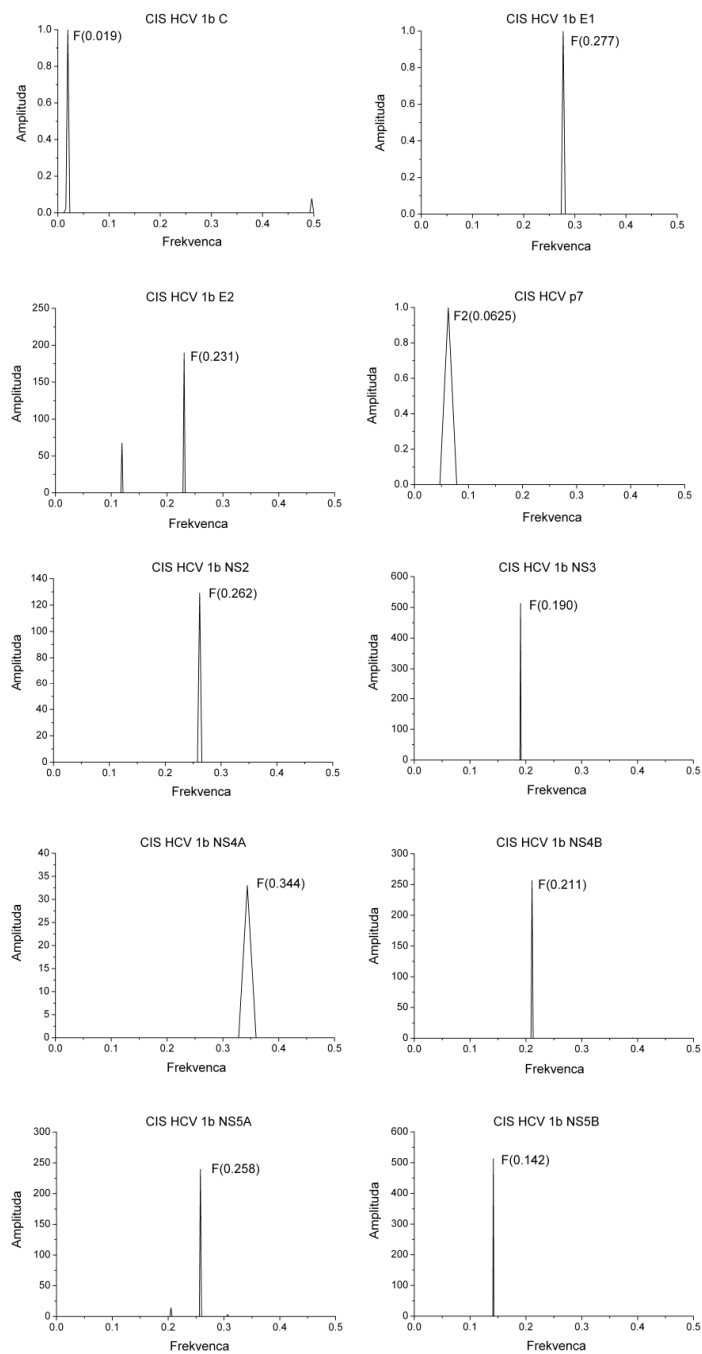
Višestruko poravnavanje sekvenci je poravnanje tri ili više sekvence proteina ili nukleinskih kiselina slične dužine. Iz rezultata analize može se izvesti zaključak o evolutivnoj vezi između proučavanih sekvenci. Razvijeni su brojni bioinformatički alati za višestruke poravnavanje sekvenci. Clustal serija programa ima široku primenu u molekularnoj biologiji za višestruko poravnavanje nukleinskih kiselina i proteina i za pripremu pravljenja filogenetskih stabala (Chenna i sar., 2003). Clustal je sada dostupan na brojnim web serverima. U našem radu smo koristili server Evropskog Bioinformatičkog Instituta (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

4 Rezultati

4.1. Bioinformatička analiza primenom metode ISM

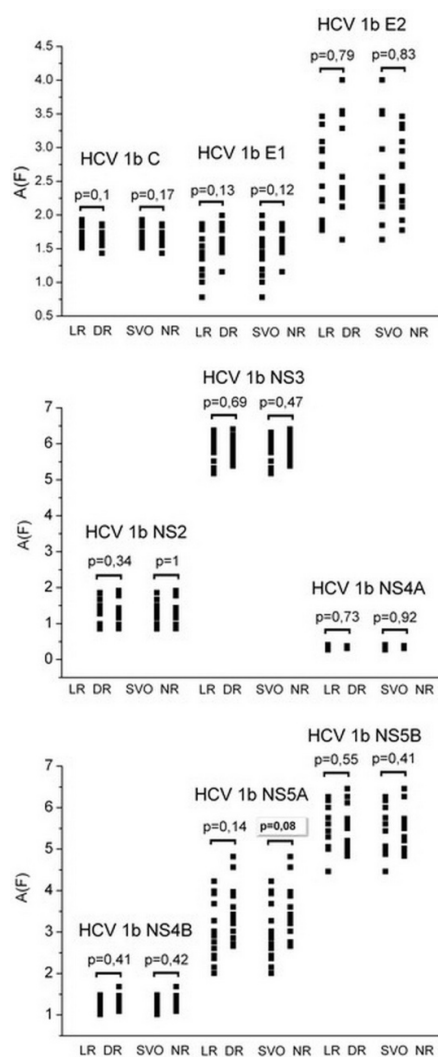
Pre početka primene kombinovane interferon/ribavirin terapije je važno proceniti odgovor na terapiju, kako bi se izbegla primena ove toksične terapije kod pacijenata inficiranih rezistentnim HCV izolatima. Naša studija se bavila analizom proteinskih sekvenci hepatitis C virusa, genotipa *1b* sa ciljem da se identifikuju bioinformatički parametri koji koreliraju sa odgovorom na kombinovanu terapiju.

Prvi korak ove studije je bio određivanja IS frekvenci karakterističnih za svaki od deset proteina HCV i zato je izvršena višestruka kros spektralna analiza svih HCV proteina: C; E1; E2; p7; NS2; NS3; NS4A; NS4B; NS5A, NS5A i NS5B). Zatim su upoređene vrednosti amplituda na dominantnim frekvencama zajedničkih konsenzus spektrara (CIS) proteina između sledećih grupa sekvenci: *a*) preterapijskih sekvenci proteina virusnih izolata ispitanika za koje smo imali podatke o uspešnosti lečenja nakon 28 dana od početka terapije a to su: pacijenti koji su dobro odgovarali na terapiju (DR) 28 dana posle početka terapije i pacijenti sa lošim odgovorom na terapiju (LR) 28 dana posle početka terapije i *b*) između pretretmanskih sekvenci proteina HCV, grupisanih u odnosu na terapijski ishod (SVO ili NR). ISM analizom su određene dominantne frekvence u CIS za molekule: C; E1; E2; p7; NS2; NS3; NS4A; NS4B; NS5A, NS5B predstavljene glavnim frekventnim komponentama: 0.0195, 0.277, 0.231, 0.0625, 0.262, 0.190, 0.344, 0.211, 0.258, 0.142 (*Slika 4.1.*).

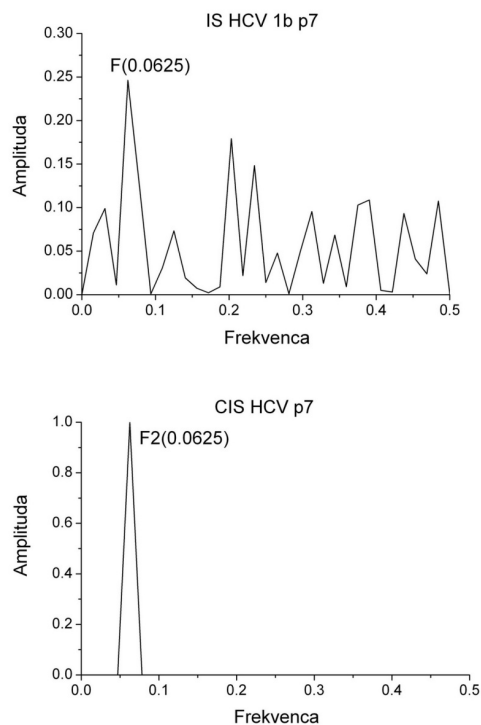


Slika 4.1. CIS HCV 1b protena: C; E1; E2; p7; NS2; NS3; NS4A; NS4B; NS5A, NS5B.

Prvo su poređene vrednosti amplituda na karakterističnim frekvencama za svaki navedeni protein između grupe DR i LR, a zatim i SVO i NR. Utvrđeno je da se vrednosti amplituda koje odgovaraju karakterističnoj frekvenci F (0.0625) u IS HCV proteina p7, statički značajno razlikuje između grupa koje dobro i loše odgovaraju na terapiju ($P < 0.05$). CIS analiziranih p7 proteina je predstavljen na *Slici 4.3*. Razlike u vrednosti amplituda između grupa DR i LR, kao i SVO i NR za ostalih devet proteina nisu pokazale statističku značajnost (*Slika 4.2*).



Slika 4.2. HCV 1b vrednosti amplituda na karakterističnim zajedničkim frekvencama za sledeće proteine: C; E1; E2; NS2; NS3; NS4A; NS4B; NS5A, NS5B. Vrednosti amplituda se nisu razlikovale statistički značajno između LR i DR, kao ni između sekvenci SVO i NR.



Slika 4.3. Informacioni spektar a) **HCV 1b p7** [EF407465] b) **CIS HCV 1b p7**.

Kod analizirane grupe pacijenata srednja vrednost amplituda na karakterističnoj frekvenci F(0.0625) u IS HCV p7 *1b* viša je kod rezistentnih ($A_{\text{mean}}^R = 0.356 \pm 0.068$) nego kod osetljivih izolata ($A_{\text{mean}}^S = 0.299 \pm 0.073$) (**Tabela 4.1.**). Granična vrednost (eng. *cut-off*) (GVP) amplitude na karakterističnoj frekvenci $A_{F(0.0625)} = 0.272$, izračunata je na osnovu jednačine $A_{\text{mean}}^R - Sd^R - \Delta Sd^R$, ΔSd^R koja definiše interval poverenja $0.25\Delta Sd^R$.

Vrednost amplitude ispod praga imalo je 9 od 15 (60%) sekvenci iz virusa izolovanih, iz grupe pacijenata koja dobro odgovara na terapiju (DR), a iznad praga 14 od 15 (93.3%) pacijenata koji loše (LR) odgovaraju na terapiju 28. nakon početka lečenja. Primena ovog kriterijuma kod sekvenci grupisanih u odnosu na krajnji ishod terapije (**Tabela 4.1. i Slika 4.4.**), pokazala je da 14 od 15 NR imaju amplitudu iznad zadatog praga (93.3%), a 10 od 15 (66.7%) SVO ispod graničnog praga. Poređenjem vrednosti amplituda p7 između grupa DR i LR utvrđena je statistički značajna razlika u vrednosti amplituda između dve analizirane grupe ($P=0.036$). Ova razlika postaje još

izraženija kada se porede grupe SVO i NR ispitanika ($P=0.004$) (*Tabela 4.1., Slika 4.4. i Slika 4.5.*).

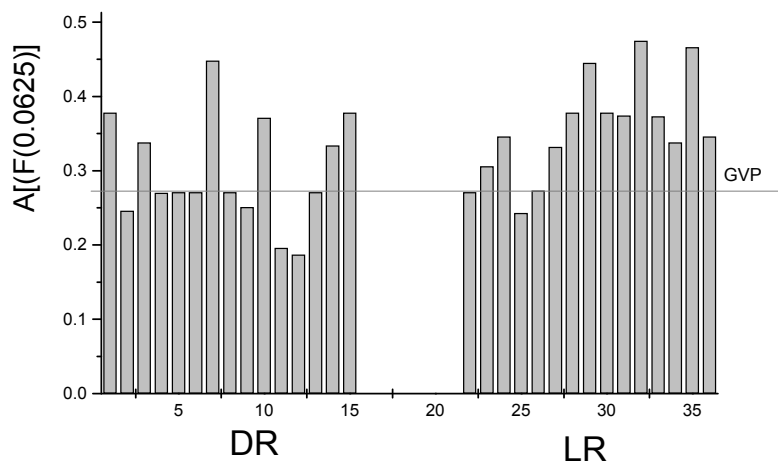
Tabela 4.1. Vrednosti amplitude na $F(0.0625)$ u IS HCV p7 kod MR, PR, SVR i NR.

Genbank identifikaciona oznaka	odgovor nakon 28 dana	ishod terapije (TO)	A[(F(0.0625))]	A[(F(0.0625)) u odnosu na graničnu vrednost
EF407458	DR	SVO	0.378	+
EF407459	DR	SVO	0.246	-
EF407460	DR	SVO	0.338	+
EF407461	DR	SVO	0.27	-
EF407462	DR	SVO	0.271	-
EF407463	DR	SVO	0.271	-
EF407464	DR	SVO	0.448	+
EF407465	DR	NR	0.334	+
EF407466	DR	SVO	0.271	-
EF407467	DR	SVO	0.251	-
EF407468	DR	SVO	0.371	+
EF407469	DR	NR	0.378	+
EF407470	DR	SVO	0.196	-
EF407471	DR	SVO	0.187	-
EF407472	DR	SVO	0.271	-
EF407473	LR	NR	0.346	+
EF407474	LR	NR	0.243	-
EF407475	LR	NR	0.273	+
EF407476	LR	NR	0.332	+
EF407477	LR	NR	0.378	+
EF407478	LR	NR	0.445	+
EF407479	LR	SVO	0.271	-
EF407480	LR	SVO	0.306	+
EF407481	LR	NR	0.378	+
EF407482	LR	NR	0.374	+
EF407483	LR	NR	0.475	+
EF407484	LR	NR	0.373	+
EF407485	LR	NR	0.338	+
EF407487	LR	NR	0.466	+
EF407488	LR	NR	0.346	+

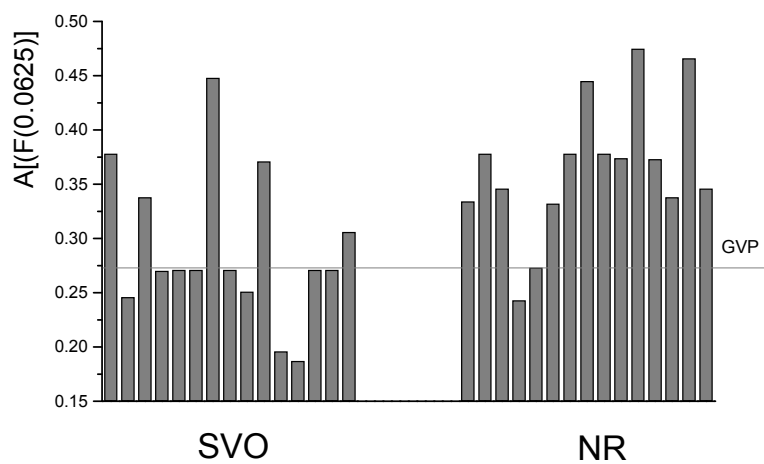
+, vrednost amplitude na karakterističnoj frekvenci iznad granične vrednosti praga

-, vrednost amplitude na karakterističnoj frekvenci ispod granične vrednosti praga

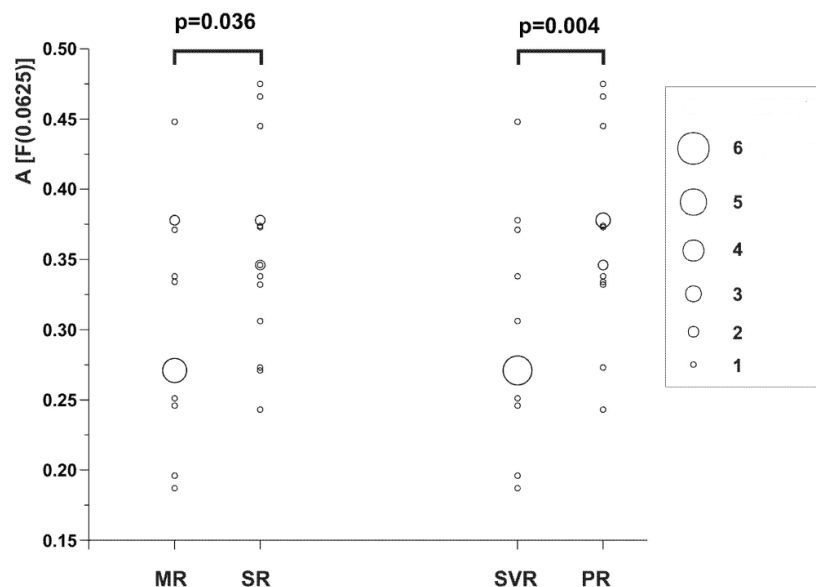
a)



b)



Slika 4.4. Prikaz vrednosti amplitude HCV 1b p7 na $F(0.0625)$ kod a) DR, LR, b) SVO i NR sekvenci.



Slika 4.5. Vrednosti amplitude HCV 1b p7 na F(0.0625) kod DR, LR, SVO i NR sekvenci. Vrednosti amplitude su statistički značajno veće kod SR u odnosu na ($P=0.036$) kao i kod NR u poređenju sa SVO ($P=0.004$).

Da bi potvrdili rezultat naše studije i uspostavili bioinformatički kriterijum za procenu ishoda terapije pre njenog početka, analizirali smo i 24 HCV 1b p7 pretretmanske sekvence NR i SVO ispitanika iz studije Mihma (**Tabela 4.2.**). Analizom drugog seta sekvenci p7 utvrđeno je da 8 od 12 (66.7%) sekvenci virusnih izolata ispitanika koji pripadaju NR ima vrednosti amplitude na F(0.0625) iznad definisanog praga. Sa druge strane, 8 od 12 (66.7%) sekvenci virusnih izolata, onih pacijenata koji su postigli SVO ima vrednosti amplitude ispod praga. Razlike vrednosti amplituda u Mihmovom setu sekvenci na F(0.0625) između NR i SVR nisu bile statistički značajne.

Tabela 4.2. Vrednosti amplitude na F (0.0625) u IS HCV p7 kod SVO i NR (Mihm i sar., 2006).

Genbank identifikaciona oznaka	ishod terapije (TO)	A(F(0.062))	A[(F(0.0625)] u odnosu na graničnu vrednost
AM263232	SVO	0.41412	+
AM263233	SVO	0.18309	-
AM263235	SVO	0.32604	+
AM263239	SVO	0.27082	-
AM263240	SVO	0.27082	-
AM263241	SVO	0.27082	-
AM263245	SVO	0.53401	+
AM263246	SVO	0.25529	-
AM263247	SVO	0.26549	-
AM263248	SVO	0.3298	+
AM263249	SVO	0.27082	-
AM263250	SVO	0.22681	-
AM263260	NR	0.34016	+
AM263261	NR	0.31623	+
AM263262	NR	0.2893	+
AM263264	NR	0.27461	+
AM263269	NR	0.37806	+
AM263274	NR	0.24323	-
AM263276	NR	0.25233	-
AM263277	NR	0.26528	-
AM263278	NR	0.25405	-
AM263287	NR	0.27743	+
AM263288	NR	0.51022	+
AM263289	NR	0.45619	+

+, vrednost amplitude na karakterističnoj frekvenci iznad granične vrednosti praga

-, vrednost amplitude na karakterističnoj frekvenci ispod granične vrednosti praga

4.1.1. Analiza ispitanika sa hroničnim C hepatitisom sa teritorije Srbije

U cilju odredjivanja primarne strukture proteina p7 analizirano je 48 pacijenata inficiranih virusom hepatitisa tipa C, genotipa *1b* sa teritorije Srbije. Svaki uzorak karakteriše: pol, starosna dob, put prenosa infekcije (transmisija), stepen fibroze, nivo ALT i koncentracija ukupne RNK HCV ili viremija. Od pretretmanskih virusnih sekvenci navedene grupe ispitanika formiran je validacioni set sekvenci.

4.2. Opšte karakteristike uzorka

Opšte karakteristike kompletnog ispitivanog uzorka ispitanika uključenih u program pripreme za kombinovanu terapiju su prikazane u **Tabeli 4.3**. Prosečna starosna dob celog uzorka je 43.40 godina, a muškarci su zastupljeni u nešto većem procentu od 56.25% u odnosu na žene.

Tabela 4.3. Opšte karakteristike uzorka.

<i>Karakteristika</i>	<i>Kompletan uzorak ispitanika</i>
<i>Starost (godine)</i>	43,4±12.05
<i>Muški pol n (%)</i>	27 (56,25)
<i>Put prenosa infekcije</i>	
Nepoznat n (%)	24 (50)
Transfuzija n (%)	12 (25)
Hemodijaliza n (%)	1 (2)
IVN n (%)	8 (16)
Operativno n (%)	1 (2)
Profesionalno n (%)	2 (4.2)
<i>Stepen fibroze</i>	
F0 n (%)	5 (10.4)
F1 n (%)	6 (12.5)
F2 n (%)	14 (29.2)
F3 n (%)	9 (18.8)
F4 n (%)	14 (29.2)
<i>ALT</i>	88,6±59.95 U/L
<i>Viremija</i>	367,29±270,63 IU/mL

IVN - intravenozni narkomani; SVO - pacijente sa stabilnim virusološkim odgovorom; NR - pacijentima koji nisu odgovorili na terapiju, ALT - alanintransferaze.

U odnosu na put prenosa HCV infekcije 50% ispitanika ima nepoznat put infekcije, dok je čak 25% pacijenata inficirano HCV-om putem transfuzije. U ostalih 25% spadaju intravenozni narkomani, pacijenti na hemodijalizi i pacijenti koji su operativnim zahvatom ili profesionalno bili u kontaktu sa HCV-om.

U posmatranom uzorku bez obzira na uspešnost terapije i krajnji odgovor možemo uočiti da najveći broj pacijenata ima umerenu fibrozu (F2) sa 29% kao i cirozu jetre (F4) sa istim procentom od 29.2%, potom tešku fibrozu (F3) sa 18,8% i na kraju 10.4% pacijenata je bez dijagnostifikovane fibroze (F0).

Kliničko-patološke karakteristike pacijenata u odnosu na odgovor na kombinovanu terapiju prikazani su u ***Tabeli 4.4.*** Analizirani pacijenti podeljeni su u 2 podgrupe u zavisnosti od odgovora na antivirusnu terapiju: SVO i NR.

Analiza odgovora na kombinovanu terapiju pokazala je da je SVO učestaliji kod mlađih pacijenata (38.29 ± 12.38), za razliku od pacijenata koji nisu odgovorili na terapiju čije srednje vrednosti starosne dobi iznose 48.50 ± 9.43 . Statističkom obradom rezultata pomoću χ^2 - testa, utvrđena je statistička značajnost između odgovora na terapiju i starosti pacijenata, te možemo konstatovati da je u našem uzorku starosna dob u korelaciji sa odgovorom (***Tabela 4.4.***).

Tabela 4.4. Kliničko - patološke karakteristike posmatranog uzorka s obzirom na odgovor na kombinovanu terapiju.

	NR (n = 24)	SVO (n =24)	p χ^2	
Starost (godine)	48.50 ± 9.43	38.29 ± 12.38	0.002^s	
Muški pol n (%)	14 (58.33)	13 (54.17)	0.77	
Put prenosa infekcije				
Nepoznat n (%)	13 (54.17)	11 (45.83)	0.48	
Transfuzija n (%)	7 (29.17)	5 (20.83)		
Hemodijaliza n (%)	1 (4.17)	0 (0.00)		
IVN n (%)	2 (8.33)	6 (25.00)		
Operativno n (%)	0 (0.00)	1 (4.17)		
Profesionalno n (%)	1 (4.17)	1 (4.17)		
Stepen fibroze				
Bez fibroze n (%)	4 (16.67)	1 (4.17)		0.64
Laka fibroza n (%)	3 (12.50)	3 (12.50)		
Umerena fibroza n (%)	6 (25.00)	8 (33.00)		
Teška fibroza n (%)	3 (12.50)	6 (25.00)		
Ciroza jetre n (%)	8 (33.33)	6 (25.00)		
ALT	89.25 ± 52.23 U/L	87.92 ± 67.93 U/L	0.94 ^s	
Viremija	395.462 ± 286.232IU/mL	339.114 ± 57.051 IU/mL	0.72 [#]	

s- students t-test; # Mann Whitney U test; p-Pearson χ^2 test.

IVN- intravenozni narkomani; SVO- pacijente sa stabilnim virusološkim odgovorom; NR - pacijentima koji nisu odgovorili na terapiju, ALT - alanin aminotransferaze

S obzirom na vrednosti ALT i odgovora na antivirusnu terapiju (**Tabela 4.4.**) iako grupa ispitanika sa SVO ima manje srednje vrednosti enzima (87.92 ± 67.93 U/L) u odnosu na NR čija srednja vrednosti iznosi 89.25 ± 52.23 U/L nije utvrđena statistička značajnost te u okviru posmatranog uzorka vrednost ALT nije u korelaciji sa odgovorom na terapiju.

Uspeh lečenja, tok i ishod bolesti zavise između ostalog i od koncentracije ukupne RNK HCV ili viremije. U cilju ispitivanja moguće asocijacije između viremije pacijenata sa odgovorom na kombinovanu terapiju nije dobijen statistički značajan rezultat. Takođe statistički značajan rezultat nije dobijen ni poređenjem između različitih vrednosti viremije i starosne dobi pacijenata, kao i nivoa ALT-a, što bi ujedno značilo da u posmatranom uzorku nivo viremije nije u korelaciji sa navedenim parametrima.

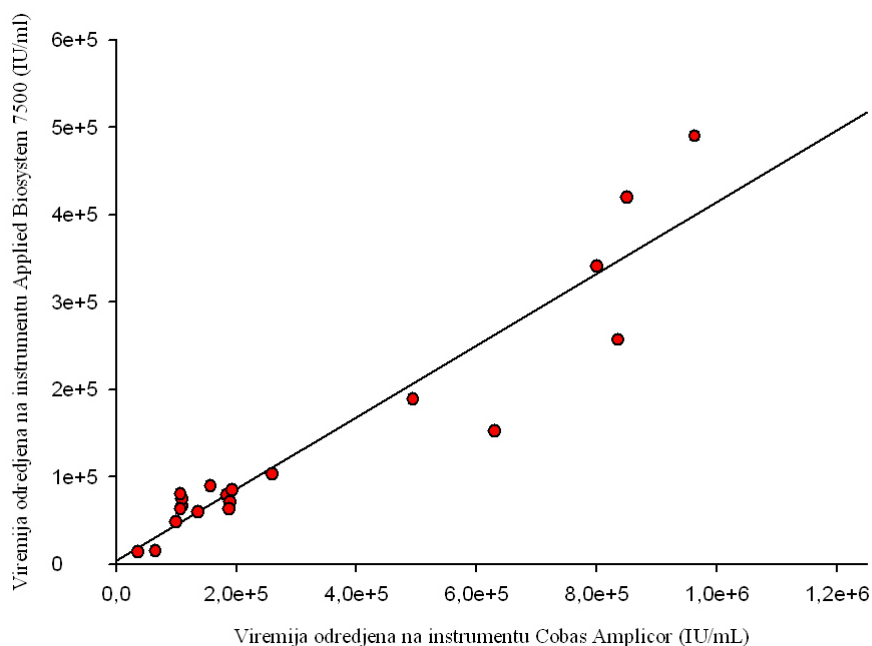
U analiziranoj grupi pacijenata pokazana je statistički značajna asocijacija nivoa viremije i stepena fibroze. Najniža viremija (u proseku 150.800 IU/mL) registrovana je kod pacijenata sa konstatovanom teškom fibrozom jetre (F3).

4.3. Koncentracija ukupne RNK HCV u plazmi ispitanika sa hroničnim C hepatitisom

Na osnovu dobijenih rezultata u okviru posmatranog uzorka najniža utvrđena viremija rađena CA - monitor testom bila je 36000 IU/mL, dok je najviša određena viremija iznosila je 962000 IU/mL.

Za uporednu analizu određivanja koncentracije RNK HCV pomoću kvantitativnog PCR-anasumično smo odabrali 20 uzoraka, čije su se viremije kretaleu rasponu od 14000 - 490000 IU/mL, što je 2 - 3 puta niže u odnosu na rezultate dobijene pomoću CA monitor testa. Ova razlika u vrednostima viremije posledica je toga što su navedene metode rađene u različitom vremenskom periodu tj. viremija na CA određena je neposredno nakon vađenja plazme pacijenata, dok je za određivanje viremije pomoću kvantitativnog RT - PCR-a upotrebljena arhvirana plazma. Međutim, i pored odstupanja vrednosti koncentracije RNK HCV-a, rezultati koje smo dobili metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu su u korelaciji sa rezultatima dobijenim pomoću CA monitor testa što je potvrđeno Spearman-ovim testom korelacije (koeficijent korelacije $p=0.905$,

$p < 0.0005$, $n = 20$). Korelacija između vrednosti viremije određene HCV monitor testom na aparatu CA i kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu na instrumentu *Applied Biosystems 7500* prikazana je **Grafikonom 4.1.** Neophodno je napomenuti, da su za statističku obradu podataka u okviru posmatranog uzorka uzete u obzir samo vrednosti viremije određene na CA. Kvantitativnim testovima određen je broj virusnih partikula u mL plazme i potvrđena je infekcija HCV-om kod ispitivanih pacijenata.



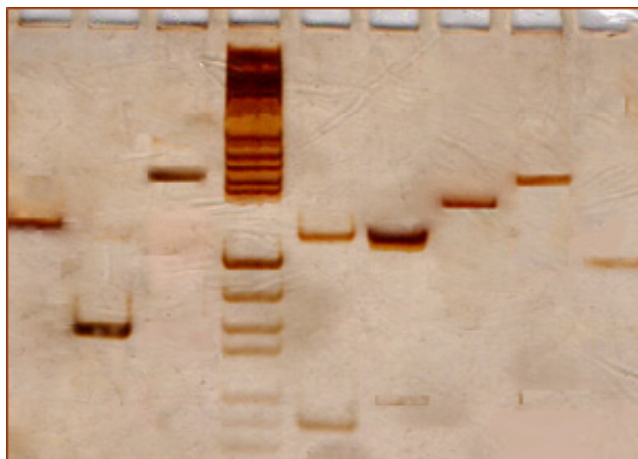
Grafikon 4.1. Korelacija između vrednosti viremije rađene na instrumentu Cobas AmpliCor i Applied Biosystem 7500-kvantitativni testovi.

4.4. Genotipizacija HCV-a PASA tehnikom

Optimizacija uslova za genotipizaciju HCV-a, PASA tehnikom za C gen pre svega obuhvata izbor i kombinaciju odgovarajućih prajmera, a dužina amplifikovanog fragmenta koja je specifična za različite genotipove može se videti na **Slici 4.6.**

Prilikom određivanja tipa *I* PASA tehnikom detektovano je prisustvo traka različitih dužina. Dužina amplifikovanih fragmenata u zavisnosti je od genotipa. Trake na visini od 144 bp odgovaraju genotipu, dok pojava dve trake na visini od 49 bp i 144 bp

odgovara genotipovima *1a* i *1b*. Dve trake na visini od 57 bp i 144 bp odgovaraju genotipovima *1a* i *1b* (**Slika 4.6.**).

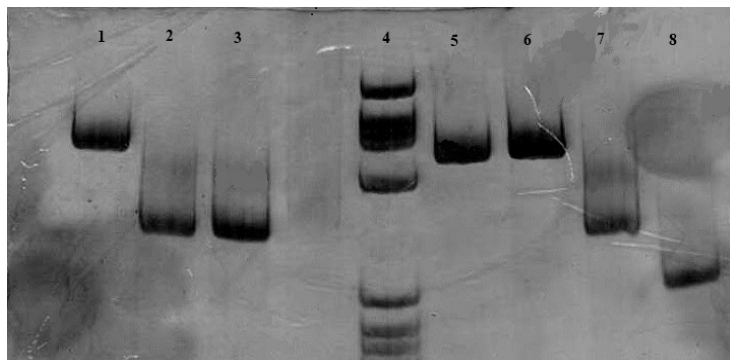


Slika 4.6. Genotipovi rađeni PASA tehnikom za *C* gen na 8% PAA gelu.

Uzorak 1, genotip 1b (144bp); uzorak 2, genotip 3a (88bp); uzorak 3, genotip 4 (205bp); uzorak 4, genotip 1a/b (49bp i 144bp); uzorak 5, genotip 1a/b (57bp i 144bp); uzorak 6, genotip 2a (174bp); uzorak 7, genotip 2c (191bp); uzorak 8, genotip 2b (123bp) i ST-molekularni marker pBR 322/*HaeIII*.

4.4.1. Umnožavanje fragmenta P7 u genomu HCV - a (manuelna metoda)

U slučaju slabe osetljivosti metodom RT - PCR-a, reamplifikacija je metod kojim se može povećati prinos PCR produkta, a u našem slučaju svi analizirani uzorci su reamplifikovani zbog arhivirane plazme pacijenata kao i degradirane RNK HCV. Za amplifikaciju dela p7 koristili smo specijalno dizajnirane prajmere: *sense P72F* i *antisense P72R* čiji je umnoženi fragment na visini od 488 bp, zatim *sense P72F* i *antisense P73R* od 354bp i na kraju amplifikovani fragment na visini od 267bp dobijen sa *sense P73F* i *antisense P72R* prajmerima. Amplifikovani fragmenti na različitim visinama dobijeni navedenim kombinacijama prajmera mogu se videti na **Slici 4.7.** Ovako dobijene produkte smo koristili za gensko sekvenciranje.



Slika 4.7. Rezultati amplifikacije dela P7 rađene pomoću RT – PCR-a i metodom reamplifikacije.

Amplifikacije uzoraka 1, 5 i 6 odgovaraju dužini od 488bp, amplifikacije uzoraka 2, 3 i 7 odgovaraju dužini od 354bp, amplifikacija uzorka 8 odgovara dužini od 267bp i ST-molekularni marker pBR 322/HaeIII

4.5. Analiza strukture dela p7 genoma hepatits C virusa metodom automatskog sekvenciranja

Za analizu proteinske sekvence dela p7 genoma HCV-a, odabrano je 48 virusnih izolata, kod kojih je uspešnost bila sekvenciranja 100%. Na **Slici 4.8.** dat je prikaz proteinskih sekvenci p7, analiziranih uzoraka:

```
>SVO1
ALENLVVVNAASVAGVHGIFSFVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO2
ALENLVVLNAASLAGVHGILSFVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO3
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO4
ALENLVVLNAASVAGAHGLLSFVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO5
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO6
ALENLVVLNAASVAGAHGILSFVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO7
ALENLVVLNAASVAGAHGILSFVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO8
ALENLVVLNAASVAGAHGILSFVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO9
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO10
ALENLVVLNAASVAGAQTLPFLVFFCAAWYITGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO11
ALENLVVLNAASLAGAHGTLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
```

>SVO12
ALENLVVLNAASLAGAHGTLVFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO13
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO14
ALENLVILNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO15
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO16
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO17
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVLFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO18
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO19
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO20
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO21
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO22
ALENLVVLNAASLAGAHGVLVFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA
>SVO23
ALENLVVLNAASVAGTHGYVSLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>SVO24
ALENLVVLNASSVAGTHGLVSLVFFCAAWYIKGRWVPGAAYVLYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR1
ALENLVVLNAASVAGTHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR2
ALENLVVLNAASVAGAHGTLVFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR3
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA
>NR4
ALENLVVLNAASLAGVHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPQRAYA
>NR5
ALENLVVINAASVAGVHGISSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR6
ALENLVVLNAASVAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR7
ALENLVVLNAASVAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR8
ALENLVVLNAASVAGTHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR9
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAARYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR10
ALENLVVINAASVAGVHGISSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR11
ALENLVVINAASVAGAHGLLSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR12
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
>NR13
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA
>NR14
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA
>NR15
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA
>NR16
ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYATYGVWPLLLLLLALPQRAYA

>NR17
 ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLAPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA
 >NR18
 ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA
 >NR19
 ALENLVVLNAASVAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
 >NR20
 ALENLVVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLAPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYT
 >NR21
 ALENLVVLNAASVAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA
 >NR22
 ALENLVVLNAASVAGTHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVTYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
 >NR23
 ALENLVVLNAASVAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA
 >NR24
 ALENLVVLNAASVAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA

Slika 4.8. Proteinske sekvence p7 pacijenata sa hroničnim C hepatitisom.

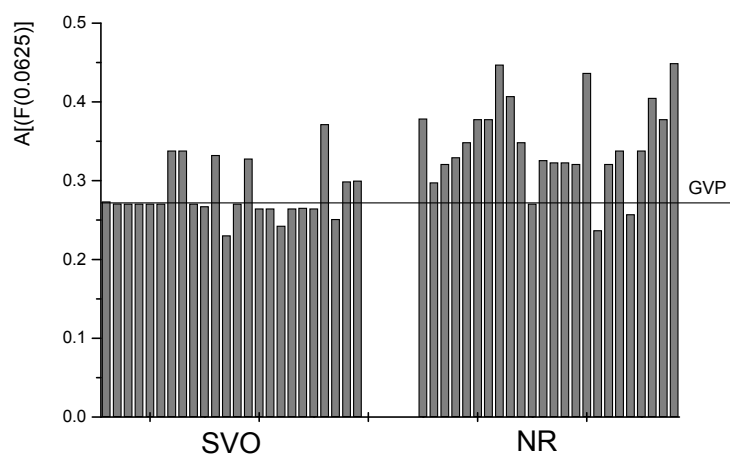
4.5.1. Bioinformatička analiza virusnih proteinskih sekvenci ispitanika sa teritorije Srbije

Da bi potvrdili rezultat naše studije i definisali bioinformatički kriterijum za procenu preterapijskih sekvenci HCV-a genotipa *1b* u odnosu na odgovor na kombinovanu terapiju interferonom i ribavirinom, analizirali smo 48 proteinskih sekvenci virusnih izolata, pre početka standardne IFN-ribavirin terapije. Za svih 48 analiziranih ispitanika sa hroničnim C hepatitisom genotipa *1b* sa teritorije Srbije imali smo podatke o odgovoru nakon kombinovane terapije. Analizom sekvenci proteina HCV p7 genotipa *1b* (**Tabela 4.5.**) iz na ovaj način formiranog validacionog seta utvrdili smo da 21 od 24 (88%) sekvenci NR ima vrednosti amplitude na F(0.0625) iznad definisanog praga, a 16 od 24 (66.7%) sekvenci SVR ima vrednosti amplitude ispod praga (**Slika 4.9.**). Utvrđena je statistička značajnost razlike ($p < 0.001$) između vrednosti amplituda u ovom setu podataka na F(0.0625) između NR i SVO (**Slika 4.10.**).

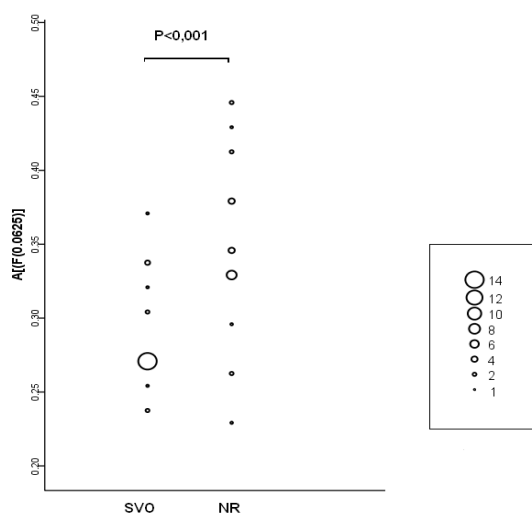
Tabela 4.5. Vrednosti amplitude na $F(0.0625)$ u IS HCV p7 kod SVO i NR iz izolata sa teritorije Srbije.

ISPITANICI	ISPITANICI U ODNOSU NA ISHOD TERAPIJE (TO)	$A[(F(0.0625))]$	$A[(F(0.0625))]$ U ODNOSU NA GRANIČNU VREDNOST
SVO 1	SVO	0.27363	+
SVO 2	SVO	0.271	-
SVO 3	SVO	0.27077	-
SVO 4	SVO	0.27082	-
SVO 5	SVO	0.27077	-
SVO 6	SVO	0.27082	-
SVO 7	SVO	0.33839	+
SVO 8	SVO	0.33839	+
SVO 9	SVO	0.27077	-
SVO 10	SVO	0.26751	-
SVO 11	SVO	0.33256	+
SVO 12	SVO	0.23063	-
SVO 13	SVO	0.27077	-
SVO 14	SVO	0.32804	+
SVO 15	SVO	0.26488	-
SVO 16	SVO	0.26488	-
SVO 17	SVO	0.2428	-
SVO 18	SVO	0.26488	-
SVO 19	SVO	0.26549	-
SVO 20	SVO	0.26488	-
SVO 21	SVO	0.37173	+
SVO 22	SVO	0.25138	-
SVO 23	SVO	0.29911	+
SVO 24	SVO	0.29993	+
NR 1	NR 1	0.3789	+
NR 2	NR 2	0.29785	+
NR 3	NR 3	0.32128	+
NR 4	NR 4	0.32974	+
NR 5	NR 5	0.34896	+
NR 6	NR 6	0.37806	+
NR 7	NR 7	0.37806	+
NR 8	NR 8	0.44741	+
NR 9	NR 9	0.40748	+
NR 10	NR 10	0.34896	+
NR 11	NR 11	0.27082	-
NR 12	NR 12	0.32604	+
NR 13	NR 13	0.32317	+
NR 14	NR 14	0.32317	+
NR 15	NR 15	0.32128	+
NR 16	NR 16	0.4367	+
NR 17	NR 17	0.237	-
NR 18	NR 18	0.32128	+
NR 19	NR 19	0.33839	+
NR 20	NR 20	0.25747	-
NR 21	NR 21	0.33839	+
NR 22	NR 22	0.40502	+
NR 23	NR 23	0.37806	+
NR 24	NR 24	0.44927	+

+, vrednost amplitude na karakterističnoj frekvenci iznad granične vrednosti praga
 -, vrednost amplitude na karakterističnoj frekvenci ispod granične vrednosti praga



Slika 4.9. Prikaz vrednosti amplitude HCV 1b p7 na $F(0.0625)$ kod SVO i NR sekvenci sa teritorije Srbije.



Slika 4.10. Vrednosti amplitude HCV 1b p7 na $F(0.0625)$ kod SVO i NR sekvenci sa teritorije Srbije. Vrednosti amplitude su bile statistički značajno veće kod NR u poređenju sa SVO ($P < 0.001$).

4.5.1.1. Analiza povezanosti između aminokiselinskih varijanti u proteinu p7 hepatitis C virusa i odgovora na kombinovanu terapiju

Da bi u okviru našeg uzorka utvrdili da li se zastupljenost neke aminokiseline u proteinu p7 razlikuje u zavisnosti od odgovora na terapiju, poravnali smo sve sekvence i analizirali aminokiseline koje su konzervirane najmanje 60% u svakoj grupi. Utvrđeno je da nijedna od ovih aminokiselina u sekvencama SVO i NR iz našeg uzorka ne zadovoljava ovaj kriterijum. Uočeno je samo da postoji konzerviranosti $\geq 60\%$ i istovremeno prisutnost dominantne aminokiselinske varijante u više od 60% samo u jednoj grupi u odnosu na odgovor i to na samo pozicije u primarnoj strukturi L13V kod SVO i A40V kod NR (**Tabela 4.6.**). Takođe izdvojili smo i poziciju 44 u proteinu p7 kao najvarijabilniju sa čak 5 aminokiselinskih varijanti različito zastupljenih F, L, I, V, T. Procentualna zastupljenost ovih varijanti je prikazana u **Tabeli 4.7.**

Tabela 4.6. Prikaz zastupljenosti analiziranih mutacija u HCV p7 1b sekvencama sa teritorije Srbije.

aminokiselinske varijante	ceo uzorak %	SVO %	NR %
L13V	L(56)V(43)	L(66)V(33)	L(45) V(54)
A40V	A(62) V(37)	A(50) V(50)	A(75) V(25)
F44V, I, L, T	F(27) L(25) I(22) V(22) T(2)	F(12) L(29) I(25) V(33) T(2)	F(41) L(20) I(20) V(12) T(4)

Tabela 4.7. Varijante aminokiselina koje snižavaju ili povećavaju vrednosti amplitude u HCV p7 1b konsenzus sekvenci na karakterističnoj frekvenci $F=0.0625$ više od 10%.

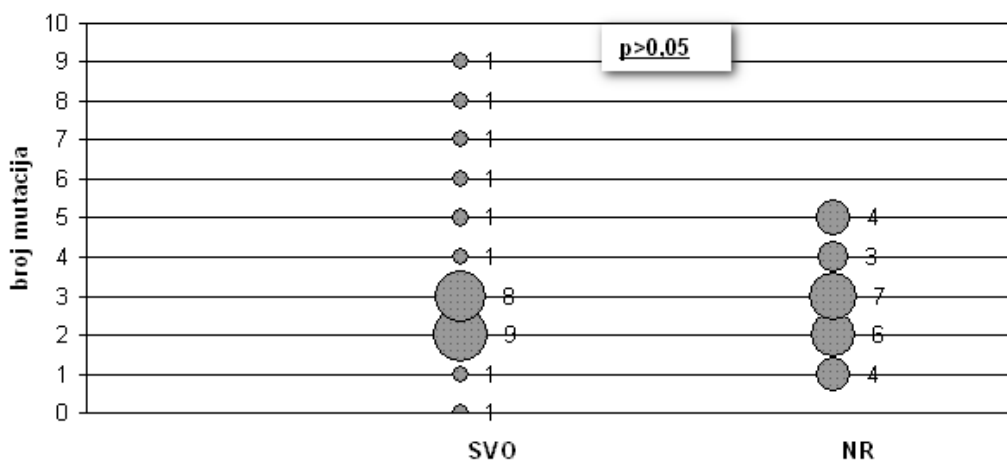
Varijante AK	A (0.0625)
R35K	+
F44V	-
F44I	-
F44L	-
L20F	-

[1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	666]
[1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123]
Cons	ALENLVVLNA	ASLAGAHGIL	SFLVFFCAAW	YIKGRLVPGA	AYAFYGVWPL	LLLLLALPPR	AYA
SVO1 V V . . V . . . F
SVO2 V V	. . . V
SVO3 V	. . . V
SVO4 V L L
SVO5 V	. . . V
SVO6 V L
SVO7 V K V
SVO8 V K V
SVO9 V	. . . V
SVO10 V . . Q . T . P T . K L
SVO11 T K
SVO12 T V	. . . I
SVO13 V	. . . V
SVO14 I K L
SVO15 V	. . . I
SVO16 V	. . . I
SVO17 L V V
SVO18 I V I
SVO19 L
SVO20 V	. . . I
SVO21
SVO22 V S V	. . . I Q
SVO23 V . . T . YV . L L
SVO24	S . V . . T . LV . L W VL
NR1 V . . T
NR2 V T . P K L
NR3 V	. . . I Q
NR4 V V	. . . V Q
NR5 I V . . V . . S K
NR6 V
NR7 V
NR8 V . . T K
NR9 R
NR10 I V . . V . . S K
NR11 I V L . . I L
NR12 K L
NR13 I Q
NR14 I Q
NR15 L V	. . . I Q
NR16 V	. . . T Q
NR17 A L
NR18 V	. . . I Q
NR19 V K V
NR20 A L T
NR21 V K V
NR22 V . . T V	T
NR23 V
NR24 V K

Slika 4.11. Proteinske sekvence SVO i NR posle višestrukog poravnavanja.

4.5.1.2. Razlike u stepenu varijabilnosti između sekvenci NR i SVO

Da bi utvrdili da li postoji varijacija u ukupnom broju mutacija između HCV proteinskih sekvenci NR i SVO, sekvenca svakog ispitanika je poređena sa referentnom HCV *Ib* p7 konsenzus sekvencom. Nije pronađena statistički značajna razlika u ukupnom broju mutacija između NR i SVO, takođe ni posle podele grupa na percentile (*Slika 4.12.*).



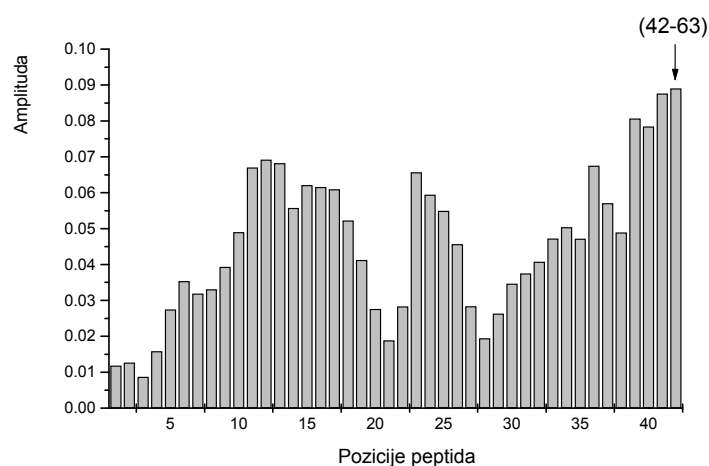
Slika 4.12. Broj mutacija kod SVO i NR sekvenci.

-veličina balona i broj pored označava broj sekvenci sa određenim brojem mutacija

Višestrukim poravnavanjem sekvenci svih analiziranih proteina p7 tokom naše studije, sa podacima koje su objavili Donlin i sar., (2010) i Mihm i sar., (2006) pomoću programa Clustal W (Thompson i sar., 1994), utvrđeno je prisustvo 28 potpuno konzerviranih aminokiselina u proteinu p7 (*Prilog 2a.*). Pomoću metode ISM izvršili smo analizu svih aminokiselinskih varijanti na svim nekonzerviranim pozicijama u proteinu HCV *Ib* p7. Ovim postupkom su izdvojene aminokiselinske zamene R35K, F44V, F44I, F44L, L20F koje povećavaju ili snižavaju amplitudu na karakterističnoj frekvenci F(0.0625) više od 10%. Prema rezultatima naše analize, ove aminokiselinske zamene mogu imati značajan efekat na terapijski odgovor (*Tabela 4.7.*). Pozicija 44 u proteinu p7 je najvarijabilnija (*Tabela 4.6. i Tabela 4.7.*) i aminokiselinske varijante na ovoj poziciji značajno menjaju vrednost A na F(0.0625) u spektru proteina p7.

4.5.1.3. Kompjutersko skeniranje proteina p7 peptidima različite dužine

Kompjuterskim skeniranjem primarne strukture proteina p7 *1b* preklapajućim peptidima različite dužine utvrđeno je da domen koji obuhvata aminokiseline na poziciji od 42 do 63 najviše doprinosi informaciji reprezentovanoj karakterističnom frekvencom $F(0,0625)$ (*Slika 4.13.*).



Slika 4.13. Određivanje domena koji daje najveći doprinos informaciji reprezentovanoj frekventnom komponentom $F(0.0625)$ u IS HCV p7 *1b*.

5 Diskusija

Hronična HCV infekcija jedan je od glavnih uzročnika bolesti jetre i predstavlja globalni zdravstveni problem. Standardna terapija hroničnog hepatitisa C danas je kombinovana antivirusna terapija PEG-IFN/RBV. Ovaj vid terapije je dugotrajan i težak, praćen ozbiljnim neželjenim efektima kao što su depresija, anoreksija, anemija, limfopenija, pojave simptoma gripa pa čak i autoimunih poremećaja. Navedene komplikacije su dovoljne za obustavljanje terapije pacijenata (Sulkowski i sar., 2003; Younossi i sar., 2007). Ograničavajući faktor u njenoj primeni je i visoka cena koja je čini nedostupnom za veliki broj pacijenata (McHutchison i sar., 2007). Istovremeno uspeh standardne kombinovane terapije je daleko od idealnog. Stabilan virusološki odgovor se postiže kod 70 - 80% pacijenata genotipa 2 i 3 posle 24 nedelja terapije (Mangia i sar., 2005; Shiffman i sar., 2007), a samo kod 50 % bolesnika inficiranih genotipom 1, najzastupljenijim genotipom HCV kako kod nas, tako i u Evropi i SAD, pri tretmanu od 48 nedelja daje najbolje rezultate (Zeuzem., 2004).

Iako je došlo do velikog napretka u razvoju manje toksičnih i efikasnijih alternativa standardnoj kombinovanoj terapiji, karakteristike virusa, pre svega visok nivo virusne replikacije i veliki broj grešaka HCV polimeraze uzrokuju pojavu virusnih varijeteta rezistentnih na terapiju koji predstavljaju problem u razvoju novih vidova tretmana HCV (Shimakamii sar, 2009; Webster i sar; 2009). Stoga je verovatno da će u doglednoj budućnosti ovaj standardni vid terapije ostati dominantan. Navedeni problemi u razvoju novih lekova i slabosti standardne terapije naglašavaju potrebu za razvojem prognostičkih testova virusološkog odgovora pacijenta na primenjenu terapiju.

Mnogobrojni faktori u koje spadaju klinički, epidemiološki, faktori domaćina i virusa su povezani sa odgovorom na kombinovanu terapiju. Varijacija virusne sekvence u okviru otvorenog okvira čitanja, unutar NS5A i njegovih specifičnih regiona ISDR, IRRDR i V3, varijacije unutar virusnog kapsida su pokazale asocijaciju sa odgovorom na kombinovanu terapiju kod pacijenata inficiranih virusom HCV genotipa 1b (Donlin i sar., 2007; El-Shamy i sar., 2008; Enomoto i sar; 1996; Sarrazin i sar., 1999, Wohnsland i sar., 2007). Različita genetička asocijacija sa odgovorom na terapiju kod

genotipa *1a* i *1b* sugeriraju da prognostički testovi moraju biti specifični za podtip virusa HCV-a (Donlin i sar., 2007). Proteklih godina, predloženi su brojni markeri za predviđanje terapijskog odgovora koji su zasnovani na varijacijama virusnih sekvenci, profilima ekspresije i varijanti u genima domaćina, ili na kombinaciji različitih faktora. Uprkos svim nastojanjima, do sada nije razvijen model koji bi bio primenljiv u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Zahvaljujući napretku u razvoju tehnika za sekvenciranje omogućeno je po prihvatljivoj ceni komercijalno sekvenciranje pojedinačnih gena u cilju identifikacije mutacija koje predstavljaju prognostičke markere za različite hronične bolesti. Rutinskom primenom metode automatskog sekvenciranja u kliničkoj praksi biće omogućena predikcija optimalne personalizovane terapije kod pacijenata sa hroničnim hepatitisom C.

Cilj ovoga rada bio je utvrđivanje modela, zasnovanog na genetičkim karakteristikama virusa HCV koji bi omogućio da se predvidi odgovor hroničnih HCV bolesnika inficiranih genotipom *1b* na kombinovanu terapiju, kao i provera validnosti ovog modela analiziranjem proteinskih virusnih sekvenci, ispitanika sa teritorije Srbije.

Prema konceptu informacionih spektara (IS) primarna struktura proteina kodira informaciju koja je odgovorna za biološku funkciju proteina i predstavljena je karakterističnom frekvencom u IS proteina (Veljkovic i sar, 2008). Ova informacija je konzervirana i kod visoko varijabilnih proteina uprkos velikom broju mutacija (Veljkovic i sar, 2008, Veljkovic i sar, 2009a, Veljkovic i sar, 2009b). Predmet naše studije je bila analiza preterapijskih sekvenci virusa HCV genotipa *1b* sa ciljem određivanja konzervirane informacije koja korelira sa odgovorom na interferon/ribavirin kombinovanu terapiju. Pretretmanske sekvence genotipa *1b*, analizirane u ovom radu potiču iz Virahep-C virusne genetičke studije (Donlin i sar., 2010). Navedene HCV sekvence genotipa *1b* korišćene su u ovoj analizi kao trening set podataka.

Prvi korak ove studije predstavljala je analiza informacionog sadržaja proteina HCV-a, odnosno identifikacija njegovih informacionih komponenata koje imaju dominantan uticaj na njegove dugodosežne interakcije sa drugim molekulima.

Rezultati bioinformatičke analize zasnovana na metodu informacionih spektara su pokazali da primarne strukture 10 proteina virusa HCV kodiraju konzervirane informaciju predstavljene karakterističnim frekvencama u njihovim zajedničkim informacionim spektrima (Glisic i sar., 2012).

Analizom dve grupe pretretmanskih proteinskih sekvenci genoma virusnih izolata, genotipa *1b*: a) pacijenata koji su dobro odgovarali (DR), kao i onih sa lošim odgovorom (LR) 28. dan nakon početka lečenja kombinovanom terapijom (Donlin i sar., 2007) i b) između pretretmanskih proteinskih sekvenci grupisanih u odnosu na krajnji terapijski ishod (SVO ili NR) (Donlin i sar., 2010) utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika samo u vrednosti amplituda proteina p7 virusa hepatitisa C na karakterističnoj frekvenci $F(0.0625)$, dok razlike u vrednosti amplituda između analiziranih grupa za ostalih devet proteina nisu dostigle statističku značajnost.

Preterapijske sekvence genotipa *1b*, analizirane u ovom radu, predstavljaju jedine javno dostupne sekvence celog kodirajućeg dela genoma HCV za koje postoji podaci o odgovoru na kombinovanu terapiju. Sekvence su izolovane i sekvencirane iz pretretmanskih virusnih izolata tokom Virahep-C virusne genetičke studije (Donlin i sar., 2007). Utvrđeno je da vrednost amplitude ispod definisanog praga ima 60% analiziranih sekvenci iz grupe koja dobro odgovara na terapiju, a iznad praga 93.3% onih koji loše odgovaraju na terapiju 28 dana posle početka terapije, kao i 93.3% NR imaju amplitudu iznad zadatog 66.7% SVO ispod graničnog praga. Važno je naglasiti da analizirane poliproteinske sekvence sa poznatim ishodom kombinovane terapije predstavljaju jedine za sada slobodno dostupne sekvence u bazama. Iako, u nedostatku drugog seta sekvenci svih HCV proteina nije bilo moguće ispitati bioinformatički kriterijum na svim HCV proteinima, analizirane su pretretmanske sekvence proteina p7 virusa HCV genotipa *1b* iz studije Mihma (Mihm i sar 2006). Ove sekvence proteina p7 su takođe jedine javno dostupne sekvence u bazama sa poznatim ishodom kombinovane terapije. Navedene sekvence smo koristili kao set sekvenci za testiranje i uspostavljanje bioinformatičkog kriterijuma koji smo definisali tokom naše studije (Glisic i sar., 2012). Rezultati dobijeni analizom Mihmovog seta sekvenci sa stabilnim virusološkim odgovorom i sekvenci izolovanih is ispitanika kod kojih nije detektovan virusološki odgovor pri čemu je utvrđeno da 66.7% sekvenci NR ima vrednosti amplitude na $F(0.0625)$ iznad definisanog praga, a 66.7% sekvenci kod ispitanika kod kojih je detektovan SVO ima vrednosti amplitude ispod praga. Dobijeni rezultati potvrdili su valjanost našeg kriterijuma.

Analizom 10 proteina virusa HCV na sekvencama dostupnim u otvorenim bazama podataka izdvojena je konzervirana informacija proteina p7 virusa HCV, koja je

u korelaciji sa odgovorom na kombinovanu terapiju. Da bi potvrdili rezultat naše studije definisani bioinformatički kriterijum je zatim testiran na našem uzorku, sekvencama p7 proteina virusa izolovanim iz baza uzoraka bolesnika sa hroničnim hepatitisom C genotipa *1b* sa standardizovanom klasifikacijom u odnosu na terapijski odgovor sa teritorije Srbije. Analizirali smo 48 HCV p7 *1b* pretretmanske sekvence virusnih izolata za koje smo imali podatke o krajnjem odgovoru na terapiju (NR i SVO).

Analizom sekvenci proteina HCV p7 genotipa *1b*, na ovaj način formiranog validacionog seta utvrdili smo da 88% sekvenci NR ima vrednosti amplitude na F (0.0625) iznad definisanog praga, a 66.7% sekvenci SVR ima vrednosti amplitude ispod praga. Utvrđena je statistička značajnost ($p < 0,001$) između vrednosti amplituda u validacionom setu podataka F (0.0625) između NR i SVO. Kriterijum za odgovor na kombinovanu terapiju definisan na osnovu analize proteina virusa HCV metodom ISM (Glisic i sar., 2012) testiran je na sekvencama p7 proteina virusa koje smo dobili iz formirane baze uzoraka bolesnika sa hroničnim hepatitisom C genotipa *1b* i standardizovanom klasifikacijom u odnosu na terapijski odgovor sa teritorije Srbije. Da bi se odredila primarna struktura proteina p7 HCV, urađena je analiza 48 HCV izolata, genotipa *1b* sa teritorije Srbije. Istovremeno je formirana homogena grupa ispitanika i optimizacija primenjenih metoda u cilju dobijanja proteinskih sekvenci HCV, koje će biti podvrgnute automatskom DNK sekvenciranju.

U okviru naše studije izvršena je analiza kliničko-patoloških karakteristika ispitanika inficiranih virusom HCV genotipa *1b* sa teritorije Srbije posmatranog u odnosu na odgovor na kombinovanu terapiju. Analizom asocijacije faktora domaćina i uspešnosti kombinovane terapije uočena je asocijaciju između starosne dobi pacijenta i odgovora pacijenta nakon kombinovane terapije. Statistički značajna razlika u odgovoru na kombinovanu terapiju između dve grupe ispitanika - grupe mlađih i grupe starijih od 40 godina ukazuje da postoji korelacija između starosti pacijenata i postizanja SVO. Naime, pacijenti mlađi od 40 godina u većini slučajeva postižu SVO, čime se naši rezultati podudaraju sa većinom dosadašnjih objavljenih rezultata (Antonucci i sar., 2007; Fried i sar., 2002; Idrees i Riazuddin., 2009; Ijaz i sar., 2011; Izumi i sar., 2010), pa možemo smatrati da starosna dob pacijenta može biti dobar prognostički faktor za uspešan odgovor nakon terapije. Prema dostupnim podacima broj obolelih od hroničnog HCV-a u Srbiji kreće se od 100-150000, a smatra se da je najveći broj inficiranih u

populaciji intravenoznih narkomana, zatim kod bolesnika sa hemofilijom i osoba na hemodijalizi (Kostić i sar., 2003, 2009; Svrtlih i sar., 2006). Međutim, u našem uzorku ispitanika inficiranih HCV-om 50% pacijenata ima nepoznat put prenosa infekcije, dok je 25% pacijenata inficirano putem transfuzije. Intravenozni narkomani sa konstatovanom hepatitis C virusnom infekcijom su zastupljeni sa 16%, zatim u ostalih 9% spadaju pacijenti koji su inficirani putem hemodijalize, operativnim zahvatom ili profesionalno. Slični rezultati su dobijeni sa područja Južne Italije gde je 27.6% inficirano HCV-om putem transfuzije, a u populaciji IVN inficirano je 27.8% pacijenata (Fusco i sar., 2008). U zemljama kao što je Turska putem transfuzije je inficirano 38.8% pacijenata, u Izraelu čak 42% pacijenata dok je u Rusiji 26% pacijenata inficirano transfuzijom, što se objašnjava velikim migracijama stanovništva u navedenim zemljama (Marcus i sar., 2011). Za razliku od prethodno navedenih rezultata gde je transfuzija glavni rizik transmisije HCV-a, u većini zemalja je potvrđeno da je vodeći faktor rizika prenosa infekcije populacija IVN. Tako u okviru Češke populacije najveći broj inficiranih pacijenata su IVN sa 16%, dok je putem transfuzije inficirano 15% pacijenata. Operativnim putem je inficirano 14%, hemodijalizom 12%, dok u ostalih 43% spadaju pacijenti koji su inficirani profesionalno, seksualnim putem, tetovažom itd. (Urbanek i sar., 2002). Prema podacima Instituta za javno zdravlje u Francuskoj u periodu od 2001-2007. godine registrovani su pacijenti sa novo-nastalom infekcijom, a vodeći faktor transmisije u populaciji IVN je sa čak 32%, dok je putem transfuzije inficirano 26.5% pacijenata (*French Institute for Public Health Surveillance*, 2010). Za razliku od naših rezultata kao i nekih do sada objavljenih, najmanji procenat inficiranih putem transfuzije u odnosu na druge faktore rizika imaju razvijene zemlje kao što je Nemačka, Švedska i Velika Britanija. Na osnovu dostupnih epidemioloških podataka može se uočiti da je trenutno najveći broj inficiranih HCV-om, u populaciji IVN i da je upravo ta populacija glavni faktor transmisije i rizika infekcije (Markus i sar., 2011). Navedeni epidemiološki podaci upozoravaju i ističu HCV infekciju kao vrlo značajan klinički problem. Rešavanje ovog problema odnosi se pre svega na multidisciplinarno ispitivanje mehanizama prenosa i razvoja HCV infekcije, kao i neophodnu saradnju različitih oblasti medicinskih i bioloških nauka.

Epidemiološki podaci i faktori rizika transmisije HCV-a, su veoma važni za prevenciju i skrining infekcije. Stoga, većina studija se bazira na mogućoj asocijaciji

između distribucije genotipova i razlikih puteva transmisije HCV-a. Iako je naša grupa ispitanika homogena u odnosu na genotip virusa (*1b*), može se reći da su naši rezultati približno slični većini rezultata do sada objavljenim. Prema Estebanu i sar., (2008) u populaciji IVN su najučestaliji genotipovi *1a* i *3*, dok genotip *1b* je upravo u asocijaciji sa transmisijom infekcije putem transfuzije i krvnih produkata. Prema rezultatima Alonsa i sar, utvrđeno je da 63% pacijenata sa HCV-om, ima nepoznat put transmisije infekcije, a da 50% pacijenata inficiranih putem transfuzije ima genotip *1b* (Alonso i sar., 1998a; 1998b). Takođe slični rezultati su dobijeni u većini drugih epidemioloških studija gde je najveći broj pacijenata sa genotipom *1b* inficiranih putem transfuzije (Altuglu i sar., 2008; Dal Molin i sar., 2002 ; Idrees i Riazudin., 2008; Ijaz i sar., 2011).

U okviru našeg istraživanja ispitivali smo moguću korelaciju između alanin aminotransferaze (ALT) i odgovora na terapiju. Serumske transaminaze predstavljaju indikator oštećenja jetre i od velikog su značaja za potvrđivanje bolesti jetre kao što je hepatitis. Obe transaminaze (AST i ALT) normalno se nalaze u serumu u niskim koncentracijama (Craxi i sar., 1996; Piton i sar., 1998). Najveća koncentracija ALT je u jetri i ona je specifičniji pokazatelj oštećenja hepatocita u odnosu na AST. Prilikom oštećenja membrane hepatocita oba enzima prelaze u krv, međutim smatra se da nekroza hepatocita nije neophodna za oslobađanje transaminaza i da između stepena oštećenja hepatocita i nivoa transaminaza postoji veoma slaba korelacija (Piton i sar., 1998). Pre početka proučavanja asocijacije između nivoa ALT i pato-histološkog nalaza smatra se da je neophodno definisati normalne vrednosti u grupi zdravih osoba. Prema podacima koja se odnose na populaciju Srbije, oko 5% rezultata dobijenih od zdravih osoba nalazi se van tzv. normalnih granica. Razlog varijacija transaminaza najčešće je fiziološki (trudnoća, povećana fizička aktivnost itd) (Simonović - Babić i sar., 2005). Takođe postoji mišljenje da se ne poštuje preporuka definisanja normalnog nivoa transaminaza u zavisnosti od pola i indeksa telesne mase (Craxi i sar., 199; Piton i sar., 1998). Dosadašnjim studijama je utvrđeno je da oko 25% pacijenata inficiranih sa HCV-om ima normalne vrednosti transaminaza (Dienstag i Alter., 1986; Pratt i Kaplan., 1999). U našoj studiji nije nađena korelacija između odgovora na terapiju i nivoa ALT bez obzira što su vrednosti enzima povišene 2 - 3 puta u odnosu na referentne vrednosti (referentna vrednost ALT koja se odnosi na naše pacijente je < 30U/L, a zavisi delom od laboratorije i metode). Takođe razlike u vrednosti enzima između pacijenata sa SVO

i NR su minimalne. Naši rezultati su slični nekim do sada objavljenim rezultatima. Prema istraživanjima Van Thiela i sar., (1997) i Rosinija i sar., (1995) utvrđeno je da odgovor na terapiju kod pacijenata sa normalnim vrednostima enzima se malo razlikuje u odnosu na odgovor pacijenata sa povišenim vrednostima ALT. U studiji Gordona i saradnika (Gordon i sar., 2000), analiziran je odgovor na kombinovanu terapiju između pacijenata čije su vrednosti enzima povišene samo 1 do 2 puta u odnosu na normalne vrednosti i pacijenata sa visokim vrednostima ALT. Nakon završetka terapije uočeno da je odnos odgovora između ovih pacijenata vrlo sličan. Prema rezultatima Berga potvrđen je izostanak korelacije između nivoa transaminaza i odgovora na kombinovanu terapiju pegilovanim IFN- α 2a i ribavirinom (Berg i sar., 2006). Na osnovu navedenih kao i do sada objavljenih rezultata koji se odnose na ispitivanje korelacije između nivoa ALT i odgovora na kombinovanu terapiju smatra se da je vrednost nivoa enzima nezavisan prediktivni faktor za postizanje SVO (Hui i sar., 2003; Hsu i sar., 2009; Kim i sar., 2011). Suprotno našim rezultatima pojedini autori smatraju da niske vrednosti ALT, ili dva puta veće od normalnih vrednosti su učestalije kod pacijenata bez fibroze jetre (F0) ili kod pacijenata sa lakom fibrozom (F1), čime se postiže bolji odgovor nakon lečenja kombinovanom terapijom, te da su u direktnoj povezanosti vrednosti ALT sa odgovorom na terapiju (Fried i sar., 2002; Kau i sar., 2008). Takođe, postoji mišljenje da pacijenti sa normalnim vrednostima imaju manju proliferaciju hepatocita i pokazuju tendenciju prema nižoj stopi apoptoze u poređenju sa pacijentima koji imaju visoke vrednosti ALT-a (Kronenberger i sar., 2000). U populaciji Srbije utvrđeno je 58.1% pacijenata sa perzistentno normalnim nivoom ALT i lakom fibrozom (F1) (Simonović-Babić i sar., 2005). Razlika naših rezultata od navedenih verovatno su posledica veličine uzorka.

Poređenjem različitih stepena fibroze (od F0 do F4) i odgovora na terapiju pacijenata inficiranih HCV - om nismo dobili statistički značajan rezultat. Na osnovu toga možemo se zaključiti da u posmatranom uzorku nema asocijacije između ova dva parametra. Rezultati i nekih drugih studija potvrđuju da nema značajne asocijacije između ciroze jetre (F4) i izostanka odgovora na kombinovanu terapiju. Smatra se da u svakom slučaju pacijenti sa ili bez fibroze teže postižu SVO. Međutim u ovim studijama kao, i u našoj mali je broj pacijenata sa cirozom. Time se može objasniti izostanak

korelacije između odgovora na primenjenu terapiju sa različitim stepenom fibroze (Fried i sar., 2002; Manns i sar., 2001).

Predmet naše studije bila je i moguća korelacije koncentracije RNK HCV i različitih stadijuma fibroze. Analiza je pokazala postojanje statistički značajne korelacije između dijagnostifikovane teške fibroze (F3) i najniže izmerene viremije čija prosečna vrednost iznosi (150.800 IU/mL). Razlog pada koncentracije RNK HCV u serumu pacijenata sa teškom fibrozom (F3), verovatno je posledica redukcije broja hepatocita (Ijaz i sar., 2011). Međutim, određeni broj autora smatra da nema asocijacije između stepena fibroze ili progresije bolesti jetre i koncentracije RNK HCV, već da je samo početna viremija esencijalna za uspešnost kombinovane terapije. U početku istraživanja viremija od 800000 IU/mL predstavljala je granicu između niske i visoke viremije (Pawlotsky i sar., 2000). Međutim novijim istraživanjima utvrđeno je da početna koncentracija RNK HCV od 400000 IU/mL predstavlja granicu ili tzv “*cut-off point*“ između niske i visoke viremije kod genotipa *1b*, a koja je ujedno u asocijaciji sa odgovorom na terapiju (Berg i sar.,2006; Fried i sar 2006).

Kada govorimo o testovima za određivanje koncentracije RNK HCV (kvantitativni testovi) i genotipizaciji HCV-a, možemo reći da mnogobrojni faktori doprinose varijabilnosti reakcije RT - PCR-a, uključujući pripremu i čuvanje materijala, prisustvo PCR inhibitora, ispravnog dizajniranja prajmera za amplifikaciju, različitih biohemijskih uslova reakcije, prisustva DNK kontaminacije i efikasnosti primenjenih metoda za vizuelizaciju produkta amplifikacije. Zbog toga je neophodno da se za skrining populacije i korektnu dijagnozu prisustva HCV infekcije koriste standardizovani komercijalni testovi koji su strogo kontrolisani, a vrednosti su univerzalne (Nolte i sar., 2001; Forman i Valsamakis, 2004).

U poređenju sa ostalim regionima genoma HCV-a, 5'NTR se odlikuje najmanjom varijabilnošću i predstavlja jedan od najkonzervativnijih delova genoma HCV-a, pa se samim tim najveći broj dijagnostičkih testova zasniva upravo na amplifikaciji 5'NTR-a. Umnožavanje dela 5'NTR-a u našem uzorku je rađeno u cilju: određivanja koncentracije RNK HCV u plazmi izolata kvantitativnim testovima rađenim pomoću CA monitor (v.2.0) i R-TMQ. Prema našim rezultatima, koncentracije ukupne RNK HCV-a koje su dobije kvantitativnim RT - PCR-om iz arhiviranih uzoraka su 2 do 3 puta niže u odnosu na vrednosti koncentracije RNK HCV rađene na CA. Ovo

je u skladu sa rezultatima drugih studija koji potvrđuju da se arhiviranjem i odmrzavanjem uzoraka smanjuje koncentracija ukupne RNK HCV (Gary i sar., 1994; Grant i sar., 2000; Richmond i McKinney., 1999). Bez obzira na manja odstupanja koncentracije RNK HCV u okviru našeg istraživanja može se reći da su vrednosti koncentracije HCV RNK izmerene na instrumentu CA u korelaciji sa rezultatima dobijenim na R - TMQ. Prednost rada na RT - PCR-u, u realnom vremenu je: senzitivnost, brzina i ušteda novca, a minimalne razlike u vrednostima koncentracije između testova CA monitor (v.2.0) i R-TMQ su zanemarljive čak i u dijagnostici HCV-a (Gerken i sar., 2000; Sarrazin i sar., 2004; Sarrazin i sar., 2006; Suzuki i sar., 2005; Sa'bato i sar., 2008).

Većina tehnika za HCV genotipizaciju se zasnivaju na identifikaciji tačkastih mutacija tj. nukleotidnih supstitucija između konsenzus sekvence (Parsons i Heflich, 1997; Chen i sar., 2002a). Specifičnost testova za genotipizaciju pomoću određivanja "tačkastih mutacija" u određenom regionu genoma HCV-a, pre svega zavisi od varijabilnosti sekvence izabranog regiona. Varijabilnost sekvence postoji duž celog genoma HCV-a, tako da bi se bilo koji region mogao koristiti za određivanje genotipova (Shukla i sar., 1995; Simmonds, 1994a). Međutim, pošto varijabilnost nije ista u različitim regijama, sekvenca različitih regiona pokazuje genotip sa različitom preciznošću. S obzirom na to, najviša specifičnost dobija se analizom proteina E2, NS2, NS5B, E1, NS4A, NS4B i NS5A (Shukla i sar., 1995). Sličnost sekvence gena C kod različitih genotipova je viša od navedenih regiona i iznos u proseku 76,8-90,1% po Okamoto-u i sar. (1996). Po Simmonds-u i sar. (1994) sličnost sekvence gena C između različitih tipova je 81-88%, a između podtipova je 88-93%. Za 5'NTR se ističe vrlo visok stepen konzervativnosti, a razlike između tipova su manje od 10%, dok se razlike između podtipova svode svega na nekoliko nukleotida (Smith i sar., 1995; Shukla i sar., 1995). Regioni kao što su gen C i 5'NTR su najčešće korišćeni regioni za određivanje genotipa, zbog mogućnosti primene brzih i jednostavnih metoda osobito kada se radi o epidemiološkim studijama na velikom broju uzoraka. Koristeći PASA tehniku za genotipizaciju analizirali smo svih 48 uzoraka koji su bili RNK-HCV pozitivni. Veliki problem u dijagnostici predstavlja upravo određivanje podtipova genotipa *1a* ili *1b*. U pokušajima za objašnjenje ove dileme dosadašnja istraživanja ukazuju na to da 5'NTR-a virusa genotipa *1a* ima veću efikasnost u translaciji u odnosu na genotip *1b* (Honda i

sar., 1999). IRES virusa genotipa *1a* je oko dva puta aktivniji od IRES-a virusa genotipa *1b* (Honda i sar., 1999). Genetička osnova razlike u translatornoj aktivnosti između ova dva genotipa je razlika na sedam pozicija u nukleotidnoj sekvenci unutar 5'NTR-a. Tako AG dinukleotidna sekvenca na poziciji 34 i 35 nt kod virusa genotipa *1a* je odgovorna za pojačanu aktivnost translacije. Ova dinukleotidna sekvenca je izmenjena kod virusa genotipa *1b* (AG→GA). Ostale nukleotidne izmene genotipa *1a* u odnosu na genotip *1b* su: C→A na 204 nt, G→A na 243 nt (Honda i sar., 1999).

Deo p7 u genomu HCV-a, pokazuje značajnu genetičku heterogenost među različitim genotipovima. Mutacije u pojedinim regionima, kao i delovanje inhibitora mogu dovesti do gubitka njegove funkcionalnosti čime ovaj region predstavlja jedno od ciljnih mesta za delovanje antivirusne terapije. Istraživanja koja se odnose na analizu sekvence jonskog kanala imaju za cilj da se precizno mapiraju najosetljivija mesta za delovanje antivirusne terapije (StGelais i sar., 2009; Khaliq i sar., 2010).

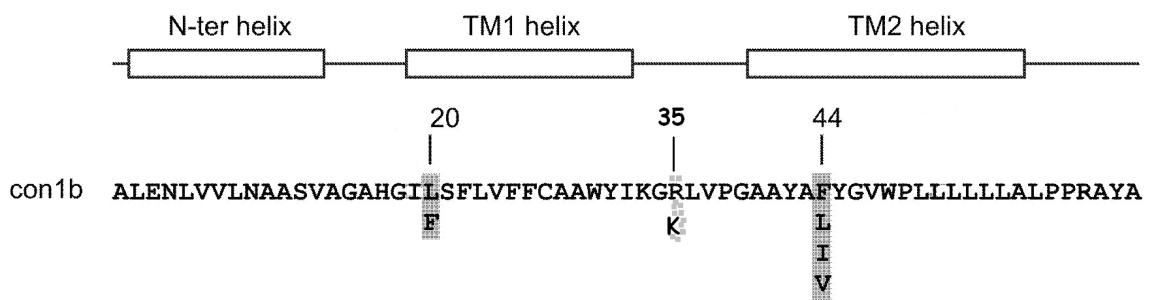
Jedan od ciljeva ovog rada bio je da se nakon iščitavanja sekvence dela genoma HCV izvrši analiza njene povezanost sa odgovorom na terapiju u uzorku naše populacije, kao i analiza ovih sekvenci sa aspekta bioinformatičkog kriterijuma.

Na osnovu analize sekvenci proteina p7 u genomu HCV-a, primenom metode ISM definisan je kriterijum za odgovor na kombinovanu terapiju (Glisic i sar., 2012). Ovaj kriterijum je potvrđen na sekvencama proteina p7 virusnih izolata pacijenata sa HCV infekcijom genotipa *1b* sa teritorije Srbije. Svi pacijenti su imali standardizovanu klasifikaciju u odnosu na terapijski odgovor. Molekularna analiza sekvenci dela p7 genoma HCV-a, je imala za cilj da se identifikuje korelacija sa odgovorom na terapiju. Analizom sekvenci proteina p7 virusa HCV, naših virusnih izolata posle višestrukog poravnavanja želeli smo da utvrdimo karakteristične aminokiselinske varijante koje karakterišu rezistenstnost, odnosno senzitivnost virusa.

Prvi korak u analizi povezanosti određenih mutacija sa odgovorom na IFN/ribavirin terapiju je bio utvrđivanje varijanti aminokoselina koje su konzervirane najmanje 60% u svakoj grupi, a da se istovremeno dominantna aminokiselina na toj poziciji razlikuje između dve grupe. Ni na jednoj poziciji proteina p7 aminokiseline se nisu razlikovale u ovako značajnoj meri, da bi se mogla ustanoviti povezanost određene varijante i odgovora. Jedino je uočena veća zastupljenosti jedne aminokiseline na dve pozicije (13 i 40) u proteinu p7, na osnovu čega se može zaključiti da ni jedna

pojedinačna aminokiselinska varijanta nije u asocijaciji sa većom verovatnoćom odgovora na terapiju. S obzirom na konzerviranost informacije predstavljene frekventnom komponentom F(0.0625) kod svih proteina p7 virusa HCV genotipa *1b*, može se zaključiti da je ona bitna za osnovnu biološku funkciju p7 molekula. To dalje znači da mutacije koje utiču na ovu informaciju mogu da modulišu biološku aktivnost p7 molekula (Glisic i sar., 2012). Mera uticaja mutacija na informacioni sadržaj virusnog p7 molekula predstavlja promenu vrednosti amplituda koje odgovaraju frekventnim komponentama F(0.0625) u informacionom spektru ovog molekula. Analizom svih pozicija u proteinu p7 koje nisu potpuno konzervirane i svih utvrđenih varijanti kod sekvenci naših izolata, kao i svih sekvenci preuzetih iz Uniprot proteinske baze izdvojene su samo one mutacije koje povećavaju ili snižavaju amplitudu na F(0.0625) više od 10% i kao takve mogu imati značajan efekat na terapijski odgovor (**Slika 5.1.**). Prisustvo aminokiselinskih varijanti koje značajno smanjuju amplitude povećava verovatnoću odgovara na terapiju (Glisic i sar., 2012). Dosadašnja istraživanja pokazala su da jedina aminokiselina sa 2 varijante koje pokazuju trend da su u većoj meri prisutne u grupi SVO ili NR je amino kiselina na poziciji 44, pri čemu je L prisutna kod NR, a F kod SVO sekvenci (Mihm isar., 2006). Protein p7 sa L aminokiselinskom varijantom ima nižu amplitudu na karakterističnoj F(0.0625) skoro 30%. Ovaj podatak je u saglasnosti sa našom studijom u kojoj je utvrđeno da su niže vrednosti amplitude na karakterističnoj frekvenci F(0.0625) karakteristične za SVO sekvence. Kod naših sekvenci proteina (p7), F varijanta je prisutna u procentu od 41% kod NR, a 12% kod SVO. Varijante L, I i V, zajedno, koje po ISM analizi imaju nižu vrednost amplitude na karakterističnoj frekvenci F(0.0625), po rezultatima naše analize prisutne su kod 87% SVO sekvenci u odnosu na 52% kod NR sekvenci.

Na osnovu navedenih rezultata ISM mutacione analize može se zaključiti da varijante koje utiču na promenu amplitude na karakterističnoj frekvenci u IS, proteina p7 informaciju, mogu modulisati aktivnost p7 molekula povezanu sa odgovorom na terapiju.



Slika 5.1. Prikaz pozicija varijanti aminokiselina u domenima proteina p7 virusa HCV genotipa 1b koje snižavaju ili dovode do povećanja vrednosti amplitude u HCV p7 1b konsenzus sekvenci na $F=0.062$ više od 10%.

Do sada nije bilo literaturnih podataka o HCV proteinu p7, kao virusnoj komponenti rezistencije na interferon ili kombinovanu IFN/ribavirin terapiju kod HCV pacijenata, iako je dokumentovano prisustvo većeg broja nekonzervativnih aminokiselinskih substitucija unutar celog p7 protein i njegovog regiona TM2 (Mihm i sar., 2006) kod NR inficiranih HCV. Istraživanja su pokazala da je protein p7 neophodan tokom infekcije (Sakai i sar., 2003), iako nije neophodan tokom RNA replikacije (Lohmann i sar., 1999). Protein p7 primarno lokalizovan u ER predstavlja integralni membranski protein sa amino i karboksi terminalnim krajevima okrenutim ka lumenu ER. Dva transmembranska domena odvojena kratkom osnovnom petljom u obliku homo-oligomera formiraju jonske konale u ćelijkim membranama (Carrere-Kremer i sar., 2002). Razvijeni su inhibitori aktivnost jonskog kanala p7 (Pavlovic i sar., 2003, Premkumar i sar., 2004), tako da protein p7 predstavlja novi target u antivirusnoj HCV terapiji.

Funkcionalno mapiranje proteina p7 virusa HCV - metod informacionog spektra je uspešno primenjen za identifikaciju konzerviranih informacija reprezentovanim karakterističnim frekvencama odgovornim za interakciju između gp120 HIV1 i njegovih CD4, CCR5 i CXCR4 receptora, interakcije hemaglutinina virusa influenze i receptora, formiranje LPL dimera (Veljkovic i sar, 2004, Veljkovic i sar., 2009, Glisic i sar., 2008). Analizom proteina HCV p7 određena je konzervirana informacija, predstavljena $F(0.0625)$, važna za njegovu funkciju. Da bi se dobio odgovor na pitanje koje su funkcije proteina p7 povezane sa karakterističnom frekvencom $F(0.0625)$ u njegovom informacionom spektru, urađeno je mapiranje strukturnih domena koji daju

najveći doprinos informaciji reprezentovanoj ovom frekvencom. Kompjuterskim skeniranjem proteina p7 virusa HCV utvrđeno je da transmembranski domen 2 (TM2) proteina p7 virusa HCV koji obuhvata aminokiseline 42 - 63 najviše doprinosi ovoj informaciji. Poznato je da aminokiselinske rezidue prisutne u transmembranskim alfa heliksima 1 i 2 doprinose stabilnosti p7 oligomera (Carrere-Kremer i sar., 2002). Rezultati druge studije ukazuju da TM2 interaguje sa virusnim i ćelijskim faktorima i da konzervirani polarni segment koji obuhvata aminokiseline 53 - 63 može imati najveću ulogu u vezivanju proteina p7 za druge virusne ili ćelijske proteine (Montserret i sar., 2010).

Na osnovu rezultata naše studije utvrđeno je da veća vrednost amplitude na F(0.0625) p7 predstavlja obeležje NR sekvenci, pa se može pretpostaviti da konzervirana informacija, kodirana u primarnoj strukturi p7 proteina i predstavljena F(0.0625), ima uticaj na veću stabilnost oligomera kod NR i/ili veću verovatnoću interakcije p7 sa nekim proteinom učesnikom u signalnim putevima povezanim sa odgovorom na IFN/ribavirin terapiju.

Iz svega izloženog može se zaključiti da bioinformatički kriterijum, definisan u ovom radu omogućava procenu odgovora hroničnih HCV bolesnika inficiranih genotipom *1b* na kombinovanu terapiju. ISM pristup pruža informaciju komplementarnu drugim podacima, dobijenim iz analize domaćiniovih i virusnih faktora, povezanim sa odgovorom na terapiju, povećavajući pouzdanost predikcije odgovora na IFN/ribavirin kombinovanu terapiju.

6 Zaključci

Na osnovu rezultata izloženih u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Primarna struktura proteina p7 virusa HCV genotipa *1* kodira konzerviranu informaciju koja je povezana sa odgovorom hroničnih HCV bolesnika inficiranih genotipom *1b* na kombinovanu terapiju.
2. Na osnovu korelacije između promena amplituda u informacionom spektru proteina p7 i njihovog uticaja na biološku funkciju ovog molekula moguće je ustanoviti bioinformatički kriterijum koji omogućava predviđanje rezistencije hepatitis C virusa na kombinovanu terapiju sa verovatnoćom $> 80 \%$.
3. Nije nađena statistički značajna korelacija između varijacija u primarnim strukturama proteina p7 virusa HCV i odgovor na kombinovanu terapiju. Ovaj rezultat ukazuje da se nijedna pojedinačna aminokiselinska zamena u proteinu p7 ne može uzeti kao pouzdan faktor rizika za rezistenciju virusa HCV na kombinovanu terapiju kod pacijenata u populaciji Srbije.
4. Eksperimentalnim ispitivanjem uzoraka pacijenata sa teritorije Srbije inficiranih virusom hepatitisa tipa C utvrđeno je da su pacijenti mlađe životne dobi češće postizale stabilni virusološki odgovor u odnosu na starije bolesnike, što je bilo statistički značajno.
5. U posmatranom uzorku utvrđena je statistički značajna razlika između koncentracije HCV RNK i stepena fibroze.
6. Statističkom obradom podataka nije utvrđena asocijacija između načina infekcije HCV-om, nivoa ALT, koncentracije RNK HCV-a i odgovora na kombinovanu terapiju, što bi mogla biti posledica veličine ispitivanog uzorka.

7 Literatura

Afdhal NH: The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004, 24(2):3–8.

Aizaki H, Choi KS, Liu MY, Li YL, Lai MM: Polypyrimidine-tract-binding protein is a component of the HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis. *J Biomed Sci* 2006, 13(4):469–480.

Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, et al: Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010, 52(2):421-9.

Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, et al: Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. *Med Virol* 2011, 83(6):1016-22.

Alberti A: What are the comorbidities influencing the management of patients and the response to therapy in chronic hepatitis C? *Liver Int* 2009, 29(1):15-8.

Ali N, Siddiqui A: Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* 1995, 69(10):6367–6375.

Ali N, Tardif KD, Siddiqui A: Cell-free replication of the hepatitis C virus subgenomic replicon. *J Virol* 2002, 76(23):12001–12007.

Alestig E, Arnholm B, Eilard A, Lagging M, Nilsson S, et al: Core mutations, IL28B polymorphisms and response to peginterferon/ribavirin treatment in Swedish patients with hepatitis C virus genotype 1 infection. *BMC Infect Dis* 2011, 11:124.

Alonso P, Orduña A, San Miguel A, Domínguez E, Gutiérrez P, et al: Genotypes of hepatitis C virus: their relationship with risk factors, the severity of liver disease, and the serologic response. *Med Clin (Barc)* 1998, 110(18):681-6.

Alonso P, Orduña A, San Miguel A, Gutiérrez MP, Lorenzo B, et al: Source Variants of hepatitis C virus in different risk groups. Comparative study of a method for genotyping and another for serotyping. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998, 16(3):111-7.

Alter MJ: Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007, 13(17):2436–2441.

Alter HJ, Klein HG: The hazards of blood transfusion in historical perspective. *Blood* 2008, 112(7):2617-26.

Altuglu I, Soyler I, Ozacar T, Erensoy S: Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis* 2008, 12(3):239-44.

Alvarez-Uria G, Day JN, Nasir AJ, Russell SK, Vilar FJ: Factors associated with treatment failure of patients with psychiatric diseases and injecting drug users in the treatment of genotype 2 or 3 hepatitis C chronic infection. *Liver Int* 2009, 29(7):1051-5.

Antonucci G, Longo MA, Angeletti C, Vairo F, Oliva A, et al: The effect of age on response to therapy with peginterferon alpha plus ribavirin in a cohort of patients with chronic HCV hepatitis including subjects older than 65 yr. *Am J Gastroenterol* 2007, 102(7):1383-91.

Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Kurosaki M, et al: Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005, 43(4):623-9.

Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F: Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 2006, 55(1): 123-30.

Asselah T, Marcellin P: New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int* 2011, 1(1):68-77.

Aurora R, Donlin MJ, Cannon NA, Tavis JE: *J Clin Invest* 2009, 119(1):225-236.

Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, et al: Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(4):1200-5.

Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H: Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 1994, 68:5045–5055.

Barth H, Schäfer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al: Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003, 278:41003–41012.

Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, et al: Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope–heparan sulfate interaction. *J Virol* 2006, 80:10579–10590.

Bartosch B, Cosset FL: Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006, 348(1):1-12.

Beads LP, Rowlands JD, Holzenburg A: The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 2001, 7:661-670.

Berg T, Mas A, Marques M, Höhne M, et al: Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology* 2000, 32:1386–1395.

Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T, et al: Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006, 130:1086–1097.

Boulant S, Montserret R, Hope G, Ratniner M, Targett-Adams P, Lavergne JP, et al: Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 2006, 281:22236–22247.

Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J: Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 2002, 76(8):3720-3730.

Carrère-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, et al.: Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem* 2004, 279(40):41384-92.

Catanese MT, Ansuini H, Graziani R, Huby T, Moreau M, et al: Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J Virol* 2010, 84:34–43.

Chayama K, Suzuk F, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, et al: Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 2000, 32:1138–1144.

Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH: Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997, 71(12):9417-26.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, et al: Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13):3497-500.

Chen SH, Tan SL: Discovery of small-molecule inhibitors of HCV NS3-4A protease as potential therapeutic agents against HCV infection. *Curr Med Chem* 2005, 12:2317-2342.

Chen YD, Liu MY, Yu WL, Li JQ, Peng M, et al: Sequence variability of the 5' UTR in isolates of hepatitis C virus in China. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 2002, 1: 541-552.

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162(1):156-9.

Chomczynski P: A reagent for the single - step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993, 15(3):532-4, 536-7.

Collier AJ, Gallego J, Klinck R, Cole PT, Harris SJ, et al: A conserved RNA structure within the HCV IRES eIf3-binding site. *Nat Struct Biol* 2002, 9:375-380.

Combet C, Garnier N, Charavay C, Grando D, Crisan D, et al: euHCVdb: the European hepatitis C virus database. *Nucleic Acids Res*, 2007: D363-6.

Corless L, Crump CM, Griffin SD, Harris M: Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J Gen Virol* 2010, 91(2):362-72.

Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, et al: A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver International* 2011, 1478-3223.

Craxi A, Almasio P: Diagnostic approach to liver enzyme elevation. *J Hepatol* 1996, 25(1):47-51.

Dal Molin G, Ansaldi F, Biagi C, D'Agaro P, Comar M, et al: Changing molecular epidemiology of hepatitis C virus infection in Northeast Italy. *J Med Virol* 2002, 68(3):352-6.

Dhillon S, Witteveldt J, Gatherer D, Owsianka AM, Zeisel MB, et al: Mutations within a conserved region of the hepatitis C virus E2 glycoprotein that influence virus-receptor interactions and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 2010, 84:5494-5507.

Dienstag JL, Alter HJ: Non-A, non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. *Semin Liver Dis* 1986, 6:67-81.

Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C: Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 2003, 77(9):5401-14.

Donlin MJ, Cannon NA, Yao E, Li J, Wahed A, et al: Virahep-C Study Group. Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy. *J Virol* 2007, 81(15):8211-24.

Donlin MJ, Cannon NA, Aurora R, Li J, Wahed AS, et al: *PLoS One* 2010, 5(2):e9032.

Dreux M, Dao Thi VL, Fresquet J, Guerin M, Julia Z, et al: Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PloS Pathog* 2009, 5:e1000310.

Dubuisson J: Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 2007, 13(17):2406-15.

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C: Consensus statement. *J Hepatol* 1999, 30:956-961.

Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS: A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* 2004, 78(20):11288-95.

Einav S, Sklan EH, Moon HM, Gehrig E, Liu P, et al: The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology* 2008, 47(3):827-35.

Ekspertska radna grupa za HCV: Dijagnoza i terapija hronične hepatitis c virusne (hcv) infekcije- konsenzus 2003.

El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H: Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 2008, 48(1):38-47.

El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, et al: Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Microbiol Immunol* 2011, 55(6):418-26.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, et al: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996, 334(2):77-81.

Esteban JI, Sauleda S, Quer J: The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008, 48:148–62.

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, et al: Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007, 446:801–805.

FDA Approves Merck's VICTRELIS™ (boceprevir): First-in-Class Oral Hepatitis C Virus (HCV) Protease Inhibitor". *Drugs.com* 2011.

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.

Fischer B, Vasdev S, Haydon E, Baliunas D, Rehm J: Willing to undergo hepatitis C treatment in a sample of injection drug users in Toronto, Canada. *Presse Med* 2005, 34:1209-1212.

Flint M, Dubuisson J, Maidens C, Harrop R, Guile GR, et al.: Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 2000, 74:702-709.

Forman MS, Valsamakis A: Verification of an assay for quantification of hepatitis C virus RNA by use of an analyte-specific reagent and two different extraction methods. *J Clin Microbiol* 2004, 42(8):3581-8.

Foster TL, Verow M, Wozniak AL, Bentham MJ, Thompson J, et al: Resistance mutations define specific antiviral effects for inhibitors of the hepatitis C virus p7 ion channel. *Hepatology* 2011; 54(1):79-90.

Foote BS, Spooner LM, Belliveau PP: Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of chronic hepatitis C. *Ann Pharmacother* 2011, 45(9):1085-93.

Fraser CS, Doudna JA: Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 2007, 5:29–38.

Freedman ND, Curto TM, Lindsay KL, Wright EC, Sinha R, Everhart JE: HALT-C TRIAL GROUP. Coffee consumption is associated with response to peginterferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011, 140(7):1961-9.

French Institute for Public Health Surveillance (InVS): Institut de veille sanitaire, Hepatite C. Surveillance nationale de l'hepatite C a partir des poles de reference volontaires. Donnees 2001–2007, http://www.invs.sante.fr/surveillance/hepatite_c/poleref_volontaire/2001_2007/web-2007v2.pdf.

Frick DN: The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Curr Issues Mol Biol* 2007, 9(1):1-20.

Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R: Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for replication. *Journal of Virology* 2001, 75:12047-12057.

Friebe P, Bartenschlager R: Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of Virol* 2002, 76:5326-5338.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, et al: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002, 347:975-982.

Fried MW, Hadziyannis SJ: Treatment of chronic hepatitis C infection with peginterferons plus ribavirin. *Semin Liver Dis* 2004, 2:47-54.

Friedrich-Rust M, Zeuzem S, Sarrazin C: Current therapy for hepatitis C. *Int J Colorectal Dis* 2005, 21:1-9.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998, 141:1539-1550.

Fusco M, Girardi E, Piselli P, et al: Epidemiology of viral hepatitis infections in an area of southern Italy with high incidence rates of liver cancer. *Eur J Cancer* 2008, 44: 847-53.

Gale M Jr, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, et al.: Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998, 18(9):5208-18.

Gallego J, Varani G: The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. *Biochemical Society Transactions* 2002, 30:140-146.

Gary L, Davis MD, Johnson Y, Lau N, Mickie S, et al: Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: Definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology* 1994, 19(6):1337-1341.

Gao L, Aizak H, He JW, Lai MM: Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 2004, 78(7):3480-3488.

Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, et al: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009, 461(7262):399-401.

Gerken G, Rothaar T, Rumi MG, Soffredini R, Trippler M, et al: Performance of the COBAS AMPLICOR HCV MONITOR test, version 2.0, an automated reverse transcription-PCR quantitative system for hepatitis C virus load determination. *J Clin Microbiol* 2000, 38:2210–2214.

Gerotto M, Dal Pero F, Pontisso P, Noventa F, Gatta A, Alberti A: Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon. *Gastroenterology* 2000, 119:1649–1655.

Gibb DM, Neave PE, Tookey PA, Ramsay M, Harris H, et al: Active surveillance of hepatitis C infection in the UK and Ireland. *Arch Dis Child* 2000, 82(4):286-91.

Gheorghe L, Speranta I, Mircea G, Ioan S, Roxana S, et al: High Sustained Virological Response Rate to Combination Therapy in Genotype 1 Patients with Histologically Mild Hepatitis C. *Gastrointestin Liver Dis* 2009, 18 (1):51-56.

Glisic S, Arrigo P, Alavantic D, Perovic V, Prljic J, Veljkovic N: Lipoprotein lipase: A bioinformatics criterion for assessment of mutations as a risk factor for cardiovascular disease. *Proteins* 2008, 70(3):855-862.

Glisic S, Veljkovic N, Jovanovic Cupic S, Vasiljevic N, Prljic J, et al: Assessment of hepatitis C virus protein sequences with regard to interferon/ribavirin combination therapy response in patients with HCV genotype 1b. *Protein J* 2012, 31(2):129-36.

Gonzalez ME, Carrasco L: Viroporins. *FEBS Lett* 2003, 552:28–34.

Gordon SC, Fang JW, Silverman AL, McHutchison JG, Albrecht JK: The significance of baseline serum aminotransferase on pretreatment disease characteristics and response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000, 32:400–4.

Gouttenoire J, Penin F, Moradpour D: Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev Med Virol* 2010, 20(2):117-29.

Goyal A, Hofmann WP, Hermann E, Traver S, Hissar SS, et al: The hepatitis C virus NS5A protein and response to interferon alpha: mutational analyses in patients with chronic HCV genotype 3a infection from India. *Med Microbiol Immunol* 2007, 196(1):11-21.

Grant A, Kitchen JA, Barbara P, Hewitt CM, Sims JA, Garson R, Tedder R: Effects of handling and storage of blood on the stability of hepatitis C virus RNA: implications for NAT testing in transfusion practice. *Vox Sang* 2000, 78 (3):137-42.

Griffin S: Inhibition of HCV p7 as a therapeutic target. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2010, 11 (2):175-181.

Gupta R, Subramani M, Khaja MN, Madhavi C, Roy S, et al: Analysis of mutations within the 5' untranslated region, interferon sensitivity region, and PePHD region as a function of response to interferon therapy in hepatitis C virus-infected patients in India. *J Clin Microbiol* 2006, 44(3):709-15.

Halfon P, Sarrazin C: Future treatment of chronic hepatitis C with direct acting antivirals: is resistance important? *Liver Int* 2012, 32 (1):79-87.

Hamano K, Sakamoto N, Enomoto N, Izumi N, Asahina Y, et al: Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2005, 20(9):1401-9.

Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, et al: CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 2008, 82:5007–5020.

Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, et al: Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 2010, 285:21092–21102.

Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD: The ESCRT pathway. *Dev Cell* 2011, 21(1):77-91.

Hickman IJ, Clouston AD, Macdonald GA, Purdie DM, Prins JB, et al: Effect of weight reduction on liver histology and biochemistry in patients with chronic Hepatitis C. *Gut* 2002, 51:89-94.

Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Shimotohno K: Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Comm* 1991, 175:220-228.

Honda M, Rijnbrand R, Abell G, Kim D, Lemon SM: Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol* 1999, 73:4941-4951.

Hourioux C, Ait-Goughoulte M, Patient R, Fouquenot D, Arcanger-Doudet F, et al: Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Microbiol* 2007, 9:1014–1027.

Hughes M, Griffin S, Harris M: Domain III of NS5A contributes to both RNA replication and assembly of hepatitis C virus particles. *J Gen Virol* 2009, 90:1329–1334.

Hui CK, Monto A, Belaye T, Lau E, Wright TL: Outcomes of interferon a and ribavirin treatment for chronic hepatitis C in patients with normal serum aminotransaminases. *Gut* 2003, 52:1644–1648.

Hung CH, Lee CM, Lu SN, Lee JF, Wang JH, et al: Mutations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b and correlation with the response to combination therapy with interferon and ribavirin. *J Viral Hepat* 2003, 10(2):87-94.

Hüssy P, Langen H, Mous J, Jacobsen H: Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 1996, 224:93–104.

Hsu CS, Liu CH, Liu CJ, Chen CL, Lai MY, et al: Factors affecting early viral load decline of Asian chronic hepatitis C patients receiving pegylated interferon plus ribavirin therapy. *Antivir Ther* 2009, 14(1):45-54.

Idrees M, Riazuddin S: A study of best positive predictors for sustained virologic response to interferon alpha plus ribavirin therapy in naive chronic hepatitis C patients. *BMC Gastroenterol* 2009, 9:5.

Ijaz B, Ahmad W, Javed FT, Gull S, Sarwar MT, et al: Association of laboratory parameters with viral factors in patients with hepatitis C. *Virol J* 2011, 8:361.

Indolfi G, Resti M: Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2009, 81(5):836-43.

Ito T, Lai MM: Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J Virol* 1997, 71 (11): 8698–8706.

Ito T, Lai MM: An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* 1999, 254(2):288–296.

Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M: Predictors of virological response to a combination therapy with pegylated interferon plus ribavirin including virus and host factors. *Hepat Res Treat*. 2010; 703602.

Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, Pockros PJ, Reddy KR, et al: Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology* 2006, 43(5):954-60.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, et al: Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*. 1994; 75:1755–1760.

- Kato N: Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001, 55(3):133-59.
- Kau A, Vermehren J, Sarrazin C: Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* 2008, 49(4):634-51.
- Khaliq S, Jahan S, Hassan S: Hepatitis C virus p7: molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potential antiviral target. *Liver Int* 2011, 31(5):606-17.
- Kim KH, Jang BK, Chung WJ, Hwang JS, Kweon YO, et al: Peginterferon alpha and ribavirin combination therapy in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis. *Korean J Hepatol* 2011, 17(3):220-5.
- Kim S, Seol SK, Song OK, Park JH, Jang SK: An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, Septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J Virol* 2007, 81(8):3852–3865.
- Kim YK, Kim CS, Lee H, Jang SK: Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 290:105–112.
- Kitamura S, Tsuge M, Hatakeyama T, Abe H, Imamura M, et al: Amino acid substitutions in core and NS5A regions of the HCV genome can predict virological decrease with pegylated interferon plus ribavirin therapy. *Antivir Ther* 2010, 15(8):1087-97.
- Klein C, Polyak SJ, Lingappa JR: Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. *J Virol* 2004, 78(17):9257–9269.
- Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. *Med Virol* 2011, 83(6):1016-22.
- Kostić V, Jovanović B, Jovanović M, Konstantinović Lj, Vrbić M: Savremeni terapijski pristup obolelima od hroničnog hepatitisa C. *Acta Medica Medianae* 2003, 42(2):55-5.
- Kostić V, Đorđević M, Popović L, Kostić E, Đorđević J, Govedarević N: Efikasnost antivirusne terapije kod osoba sa hemofilijom i hepatitis c virusnom infekcijom. *Medicinski pregled* 2009, 62(2-4):129-32.
- Krekulova L, Rehak V, Strunecky O, Nemecek V: Current situation and trends in the hepatitis C virus genotype distribution among injecting drug users in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2009, 58:84–9.

Kronenberger B, Ruster B, Lee JH, Sarrazin C, Roth WK, et al: Hepatocellular proliferation in patients with chronic hepatitis C and persistently normal or abnormal aminotransferase levels. *J Hepatol* 2000, 33:640-7.

Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R: The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 2005, 21(3):379-84.

Kuiken C, Simmonds P: Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol* 2009, 510:33-53.

Kurbanov F, Tanaka Y, Matsuura K, Sugauchi F, Elkady A, et al: Positive selection of core 70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin. *J Infect Dis* 2010, 201(11):1663-71.

Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, et al: Sequences in the interferon sensitivity-determining region and core region of hepatitis C virus impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis. *J Med Virol* 2011, 83(3):445-52.

Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, Schiff ER, Vierling JM, et al.: Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. SPRINT-1 investigators. *Lancet* 2010, 376(9742):705-16.

Kwong AD, Rao BG, Jeang KT: Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4(10):845-53.

Lai VC, Dempsey S, Lau JY, Hong Z, Zhong W: In vitro RNA replication directed by replicase complexes isolated from the subgenomic replicon cells of hepatitis C virus. *J Virol* 2003, 77(3):2295–2300.

Lemberg LK, Martoglio B: Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol Cell* 2002, 10 (4):735–744.

Li D, Takyar ST, Lott WB, Gowans EJ: Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells. *J Gen Virol* 2003, 84(4):815-25.

Lin C, Lindenbach BD, Prágai BM, McCourt DW, Rice CM: Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994, 68(8):5063-73.

Lindenbach BD, Rice CM: Flaviviridae: The viruses and Their replication. In: KDM Fields BN, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Strauss SE, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott- Raven. 2001: 991–1042.

Lindsay KL: Therapy of hepatitis C: overview. *Hepatology* 1997, 26:71-77.

Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T: Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 2009, 83:2011–2014.

Lo SY, Selby MJ, Ou JH: Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* 1996, 70(8):5177-82.

Loguercio C, Federico A, Masarone M, Torella R, Blanco Cdel V, Persico M: The impact of diet on liver fibrosis and on response to interferon therapy inpatients with HCV-related chronic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008, 103(12):3159-66.

Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999, 285:110–113.

López-Labrador FX, Ampurdanès S, Giménez-Barcons M, Guilera M, Costa J, et al: Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection [correction of interferon]. *Hepatology* 1999, 29(3):897-903.

Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al: C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 2004, 279:32035–32045.

Maekawa S, Enomoto N: Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2009, 44(10):1009-15.

Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, et al: Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 2001, 75 (17):8240–8250.

Macquillan GC, Niu X, Speers D, English S, Garas G, et al: Does sequencing the PKRBD of hepatitis C virus NS5A predict therapeutic response to combination therapy in an Australian population? *J Gastroenterol Hepatol* 2004, 19(5):551-7.

Majeau N, Gagne V, Boivin A, Bolduc M, Majeau JA, et al: The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *J Gen Virol* 2004, 85(4):971–981.

Mangia A, Santoro R, Minerva N, Ricci GL, Carretta V, et al: Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2005, 352(25):2609-17.

Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, et al: An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology* 2010, 139(3):821-7, 827.

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, 358:958–965.

Manns MP, Gane E, Rodriguez-Torres M, Stoehr A, Yeh CT, et al: Protocol 007 Study Group. *Hepatology* 2012, 25743

Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, et al: Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 2006, 131(6):1887-98.

Marsh M, Helenius A: Virus entry: open sesame. *Cell* 2006, 124:729–740.

Martinot-Peignoux M, Boyer N, Pouteau M, Castelnau C, Giuily N, et al: Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998, 29(2):214-23.

Mathei C, Wollants E, Verbeeck J, Van Ranst M, Robaey G, et al: Molecular epidemiology of hepatitis C among drug users in Flanders, Belgium: association of genotype with clinical parameters and with sex- and drug-related risk behaviors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005, 24:514-522.

McHutchison JG, Bacon BR, Owens GS: Making it happen: managed care considerations in vanquishing hepatitis C. *Am J Manag Care* 2007, 13(12):S327-S336.

McHutchison JG, Manns MP, Muir AJ, Terrault NA, Jacobson IM, et al: "Telaprevir for previously treated chronic HCV infection". *N. Engl. J. Med.* 2010; 362(14):1292–303.

McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B: Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 2002, 21(15):3980–3988.

McMahon BJ, Bruden D, Bruce MG, Livingston S, Christensen C, et al: Adverse outcomes in Alaska natives who recovered from or have chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2010, 138:922–931.

Mihm U, Grigorian N, Welsch C, Herrmann E, Kronenberger B, et al: Amino acid variations in hepatitis C virus p7 and sensitivity to antiviral combination therapy with amantadine in chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2006, 11 (4):507-519.

Montserret R, Saint N, Vanbelle C, Salvay AG, Simorre JP, et al: NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2010, 285 (41):31446-31461.

Moradpour D, Brass V, Gosert R, Wolk B, Blum H: Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets. *Trends in molecular medicine* 2002, 8:476-482.

Moreau I, Levis J, Crosbie O, Kenny-Walsh E, Fanning LJ: Correlation between pre-treatment quasispecies complexity and treatment outcome in chronic HCV genotype 3a. *Virology* 2008, 5:78.

Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, et al: Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008, 134(2):416-23.

Mühlberger N, Schwarzer R, Lettmeier B, Sroczynski G, Zeuzem S, Siebert U: HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC Public Health* 2009, 9:34.

Muñoz de Rueda P, Casado J, Patón R, Quintero D, Palacios A, et al: Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J Virol* 2008, 82(13):6644-53.

Murakami K, Abe M, Kageyama T, Kamoshita N, Nomoto A: Downregulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol* 2001, 146(4):729–741.

Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, et al: Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 2006, 351(2):381–392.

Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E: A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa [Abstract]. *HEPATOLOGY* 2007, 46:623A.

- Nakai K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim CK, et al: Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J Virol* 2006, 80(22):11265-73.
- Nattermann J, Leifeld L, Spengler U: Host genetic factors and treatment of hepatitis C. *Curr Mol Pharmacol* 2008, 1(2):171-80.
- Noguchi T, Tamori A, Ogura N, Hori Y, Ikeda S, Nishiguchi S: Investigation of Interferon- α Response by a Single Amino Acid Substitution of Nonstructural Protein 5A in Hepatitis C Virus-Infected Patients. *J Interferon Cytokine Res* 2011, 31(8):589-99.
- Nolte FS, Fried MW, Shiffman ML, Ferreira-Gonzalez A, Garrett CT, et al: Prospective multicenter clinical evaluation of AMPLICOR and COBAS AMPLICOR hepatitis C virus tests. *J Clin Microbiol* 2001, 39(11):4005-12.
- Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, et al: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys & infection sources. *J Gen Virol* 1992, 73: 673-679.
- Okamoto H, Mishiro S: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Intervirology* 1994, 37:68-76.
- Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki T, Miyamura T, et al: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 2006, 25(20):5015–5025.
- Otto A, Puglisi JD: The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 2004, 119(3):369–380.
- Owsianka AM, Timms JM, Tarr AW, Brown RJ, Hickling TP, et al: Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* 2006, 80:8695–8704.
- Pang PS, Jankowsky E, Planet PJ, Pyle AM: The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* 2002, 21(5):1168-76.
- Palmer M: The Impact of Exercise and Nutrition on the Outcome of Patients with Chronic Hepatitis C. *Practical Gastroenterology* 2011, 35 (9):12.
- Parsons BL, Heflich RH: Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mutat Res* 1997, 387(2):97-121.

Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, et al: The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(10):6104-6108.

Pawlotsky JM: Genetic heterogeneity and properties of hepatitis C virus. *Acta Gastroenterol Belg* 1998, 61(2):189-91.

Pawlotsky JM: Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* 2000a, 32(5):889-96.

Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, et al: Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000b, 32:654-659.

Pawlotsky JM: The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis* 2003, 16:587-592.

Payen JL, Pillard F, Mascarell V, Rivière D, Couzigou P, Kharlov N: Is physical activity possible and beneficial for patients with hepatitis C receiving pegylated interferon and ribavirin therapy? *Gastroenterol Clin Biol* 2009, 33(1):8-14.

Perry CM: Telaprevir: a review of its use in the management of genotype 1 chronic hepatitis C. *Drugs* 2012, 72(5):619-41.

Pietschmann T, Penin F, Bartenschlager R: Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem* 2008, 283:28546–28562.

Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, Khalil L, Delastre J, et al: Factors associated with serum alanin aminotransferase activity in healthy subjects consequences for the definition of normal values for selection of blood donors and for patients with chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. *Hepatology* 1998, 27: 1213-9.

Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, et al: Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009, 457: 882–886.

Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, et al: Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003, 77:4070–4080.

Popescu CJ, Rouillé Y, Dubuisson J: Hepatitis C Virus Assembly Imaging. *Viruses* 2011, 3:2238-2254.

Pratt DS, Kaplan MM: Laboratory tests. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. eds. *Schiff's diseases of the liver*. 8 th ed. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott' Raven 1999, 205-44

Premkumar A, Ewart GD, Cox GB, Gage PW: An amino-acid substitution in the influenza-B NB protein affects ion-channel gating. *J Membr Biol* 2004, 197(3):135-43.

Pruss-Ustun A, Rapiti E, Hutin Y: Estimation of the global burden of disease attributable to contaminated sharps injuries among health-care workers. *Am J Ind Med* 2005, 48:482-490.

Quezada EM, Kane CM: The hepatitis C virus NS5A stimulates NS5B during in vitro RNA synthesis in a template specific manner. *Open Biochem. J* 2009, 3:39-48.

Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, et al: Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(31):12884-9.

Richmond JY, McKinney RW: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. *MMWR Recomm Rep* 2002, 6:51(RR-19):1-6.

Rijnbrand R, Bredenbeek P, van der Straaten T, Whetter L, Inchauspe G, et al: Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett* 1995, 365:115-119.

Rossini A, Ravaggi A, Biasi L, Agostinelli E, Bercich L, et al: Virological response to interferon treatment in hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels and chronic hepatitis. *Hepatology* 1997, 26:1012-1.

Rozen S, Skaletsky HJ: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology 2000*, Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

Saint N, Montserret R, Chipot C, Penin F: Structural and functional analysis of the HCV p7 protein. *Methods Mol Biol* 2009, 510:125-43.

Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, et al: The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(20):11646-51.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.: *Molecular cloning - A laboratory manual*, and eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

Samuel C: Antiviral actions of interferon. *Clinical microbiology Reviews* 2001, 14:778-809.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74:5463-5467.

Santolini E, Migliaccio G, La Monica N: Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1994, 68(6):3631-41.

Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, et al: Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999, 30(6):1004-13.

Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S: Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002, 76(21):11079-90.

Sarrazin C, Gärtner B, Welker M, Traver S, Zeuzem S: Evaluation of a new, highly sensitive, real time PCR based assay for quantification of HCV RNA. *J Hepatol* 2004, 40(1):150A.

Sarrazin C, Mihm U, Herrmann E, Welsch C, Albrecht M, et al: Clinical significance of in vitro replication-enhancing mutations of the hepatitis C virus (HCV) replicon in patients with chronic HCV infection. *J Infect Dis* 2005, 192:1710-9.

Sarrazin C, Gärtner BC, Sizmann D, Babel R, Mihm U, et al: Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol* 2006, 44(3):729-37.

Sato K, Okamoto H, Aihara S, Hoshi Y, Tanaka T, Mishiro S: Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology* 1993, 196:354-357.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, et al: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002, 21:5017-5025.

Seeff LB, Hoofnagle JH: The National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C 2002. *Clin Liver Dis* 2003, 7(1):261-87.

Serafino A, Valli MB, Andreola F, Crema A, Ravagnan G, et al: Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *J. Med Virol* 2003, 70(1):31-41.

Sethi A, Shiffman ML: Approach to the management of patients with chronic hepatitis C who failed to achieve sustained virologic response. *Clin Liver Dis* 2005, 9:453-471.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ: Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005, 5:558-567.

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, et al: L-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003, 4(1):63-8.

Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everhart JE: Hepatitis C Antiviral Long-Term Treatment Against Cirrhosis Trial Group. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology* 2004, 126:1015-1023.

Shiffman ML, Salvatore J, Hubbard S, Price A, Sterling RK, et al: Treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 with peginterferon, ribavirin, and epoetin alpha. *Hepatology* 2007, 46(2):371-9.

Shimakami T, Hijikata M, Luo H, Ma YY, Kaneko S, et al: Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 2004, 78(6):2738-48.

Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, et al: A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 1996a, 223:409-412.

Shimizu Y, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H: Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996b, 23:205-209.

Shin-IT, Tanaka Y, Tateno Y, Mizokami M: *Hepatol Res*. Development and public release of a comprehensive hepatitis virus database 2008, 38(3):234-43.

Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW: Evaluation of complete genome sequence and sequence of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol* 1995, 140:1747-1761.

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C: A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994a, 19:1321-1324.

Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, et al: Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol*. 1994b, 75(5):1053-61.

Simmonds P: The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *Journal of General Virology* 2001, 82:693-712

Simonović-Babić J, Delić D, Švrtlih N, Poluga J, Korać M, et al: Prediktivni značaj nivoa alt za histološki nalaz kod hroničnog c hepatitisa. *Jugoslav Med Biochem* 2005, 24: 293–297.

Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, et al: International HCV Collaborative Study Group. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implication for secondary structure, virus detection and typing. *J Gen Virol* 1995,76: 1749-1761.

StGelais C, Foster TL, Verow M, Atkins E, Fishwick CW, et al: Determinants of hepatitis C virus p7 ion channel function and drug sensitivity identified in vitro. *J Virol* 2009, 83: 7970–81.

Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T: Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 2007, 3-103.

Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Fransc G, Maertens G: Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996, 34:2259-2266.

Sugihara K, Orito E, Tanaka Y, Kato T, Lau JY, et al: Variations in the viral NS5B region in Japanese patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection. *Intervirology* 2006, 49(6):319-26.

Sulkowski MS: Anemia in the treatment of hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2003, 37(4)4:S315-22.

Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, et al: L28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009, 41(10):1100-4.

Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T: Processing and functions of Hepatitis C virus proteins. *Intervirology* 1999, 42(2-3):145-52.

Suzuki T, Omata K, Satoh T, Miyasaka T, Arai C, et al: Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J Clin Microbiol* 2005, 43(9):4413-7.

Svrtlih N, Delic D, Simonovic J, Jevtovic D, Dokic L, et al: Hepatitis C virus genotypes in Serbia and Montenegro: the prevalence and clinical significance. *World J Gastroenterol* 2007, 13(3):355-60.

- Tajiri H, Miyoshi Y, Funada S, Etani Y, Abe J, et al: Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Pediatr Infect Dis J* 2001, 20(1):10-4.
- Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, et al: Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology* 2012, 422(2):377-85.
- Tanaka Y, Shimoike T, Ishii K, Suzuki R, Suzuki T, et al: Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology* 2000, 270(1): 229–236.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, et al: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009, 41(10):1105-9.
- Tang H, Grisé H: Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)* 2009, 117(2):49-65.
- Tang S, Collier AJ, Elliott RM: Alterations to both the primary and predicted secondary structure of stem-loop IIIc of the hepatitis C virus 1b 5' untranslated region (5'UTR) lead to mutants severely defective in translation which cannot be complemented in trans by the wild-type 5'UTR sequence. *J Virol* 1999, 73:2359-2364.
- Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, Mathews MB: Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J Virol* 2001, 75(3):1265-73.
- Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM: The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 2004, 279(47):48576-87.
- Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway JC, Rice CM: Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* 2008, 82:1073–1083.
- 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(7265):798-801.
- Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, et al: Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010, 139(1):120-9.
- Thorpe LE, Ouellet LJ, Levy JR, Williams IT, Monterroso ER: Hepatitis C virus infection: prevalence, risk factors, and prevention opportunities among young injection drug users in Chicago, 1997-1999. *J Infect Dis* 2000, 182(6):1588-94.

Trembling PM, Tanwar S, Dusheiko GM: Boceprevir: an oral protease inhibitor for the treatment of chronic HCV infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012, 10(3):269-79.

Urbánek P, Marecek Z, Brodanová M, Brůha R, Kaláb M, Petrtýl J: Risk factors for transmission of hepatitis C in the the Czech population. *Cas Lek Cesk* 2002, 141:185.

Van Thiel DH, Caraceni P, Molloy PJ, Hassanein T, Kania RJ, et al: Chronic hepatitis C in patients with normal or near-normal alanine transferase levels: the role of interferon alpha- 2b therapy. *J Hepatol* 1995, 23:503–8.

Veljkovic V, Slavic I: Simple general-model pseudopotential. *Phys Rev Let* 1972, 29:105-107.

Veljkovic V: The dependence of the Fermi energy on the atomic number. *Phys Lett* 1973, 45A:41-42.

Veljkovic V, Cosic I, Dimitrijevic B, Lalovic D: Is it possible to analyze DNA and protein sequence by the method of digital signal processing? *IEEE Trans Biomed Eng* 1985, 32: 337-41

Veljkovic V, Cosic I: A novel method of protein analysis for prediction of biological function. *Cancer Biochem. Biophys* 1987, 9:139-145.

Veljkovic V, Lalovic D: The global average DNA base composition of coding regions may be determined by the electron-ion interaction potential. *Biosystems* 1990, 23:311-319.

Veljkovic V, Veljkovic N, Metlas R: Molecular makeup of HIV-1 envelope protein. *Int Rev Immunol* 2004, 23(5-6):383-411.

Veljkovic N, Glisic S, Prljic J, Perovic V, Botta M, Veljkovic V: Discovery of new therapeutic targets by the informational spectrum method. *Curr Protein Pept Sci* 2008, 9(5):493-506.

Veljkovic V, Niman HL, Glisic S, Veljkovic N, Perovic V, Muller CP: Identification of hemagglutinin structural domain and polymorphisms which may modulate swine H1N1 interactions with human receptor. *BMC Struct Biol* 2009a, 9:62.

Veljkovic V, Veljkovic N, Muller CP, Muller S, Glisic S, et al: Characterization of conserved properties of hemagglutinin of H5N1 and human influenza viruses: possible consequences for therapy and infection control. *BMC Struct Biol* 2009b, 9:21.

- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, et al: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005, 11:791–796.
- Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N, Itakura J, Tanabe Y, et al: Amino acid substitutions in PKR-eIF2 phosphorylation homology domain (PePHD) of hepatitis C virus E2 protein in genotype 2a/2b and 1b in Japan and interferon efficacy. *Hepatology* 2003, 26(4):268-274.
- Watahi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K: Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005, 19(1):111–122.
- Webster DP, Klenerman P, Collier J, Jeffery KJ: Development of novel treatments for hepatitis C. *Lancet Infect Dis* 2009, 9(2):108-17.
- Weihofen AK, Binns K, Lemberg MK, Ashman K, Martoglio B: Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 2002, 296(5576):2215–2218.
- Welsch C, Albrecht M, Maydt J, Herrmann E, Welker MW, et al: Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae. *J Mol Graph Model* 2007, 26(2):546-57.
- Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U: Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* 2000, 32(1):91-6.
- Witherell GW, Beineke P: Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J Med Virol* 2001, 63(1):8-16.
- Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C: Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin. Microbiol. Rev* 2007, 20:23–38.
- Yazdanpanah Y, De Carli G, Miguères B, Lot F, Campins M, et al: Risk factors for hepatitis C virus transmission to health care workers after occupational exposure: a European case-control study. *Clin Infect Dis* 2005, 41: 14230-1430.
- Yee LJ: Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2004, 5(4):237-45.
- Yen CL, Chang JJ, Lee TS, Liu CJ, Chen LW, Chang LC: Ribavirin monotherapy increases sustained response rate in relapsers of end treatment virologic responders. *World J Gastroenterology* 2005, 11:1663-1667.

Younossi Z, Kallman J, Kincaid J: The effects of HCV infection and management on health-related quality of life. *Hepatology* 2007, 45:806-816.

Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, von Wagne M, Teuber G, Roth WK: Hepatitis C virus dynamics in vivo: Effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. *Hepatology* 1998, 28:245-252.

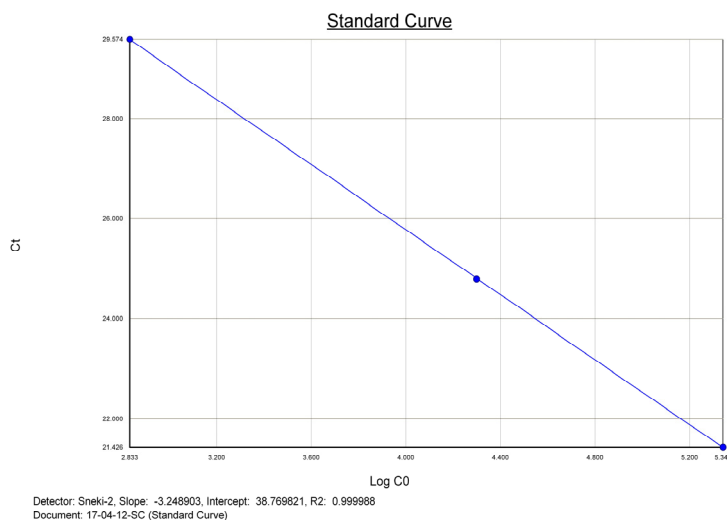
Zeuzem S, Diago M, Gane E, Reddy KR, Pockros P, et al: Peginterferon alfa-2a (40 kilodaltons) and ribavirin in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 2004, 127(6):1724-32.

Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, et al: Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol* 2006, 44(1):97-103.

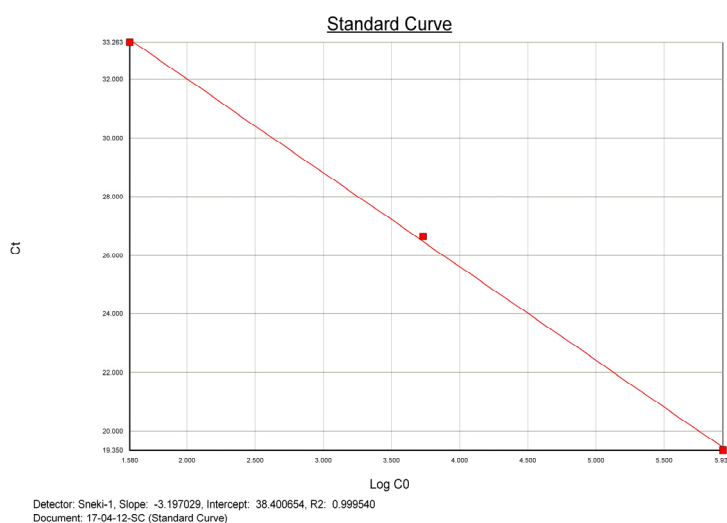
Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, et al: Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *Virology* 1998, 72(5):3691-7.

Prilozi

Prilog 1a.

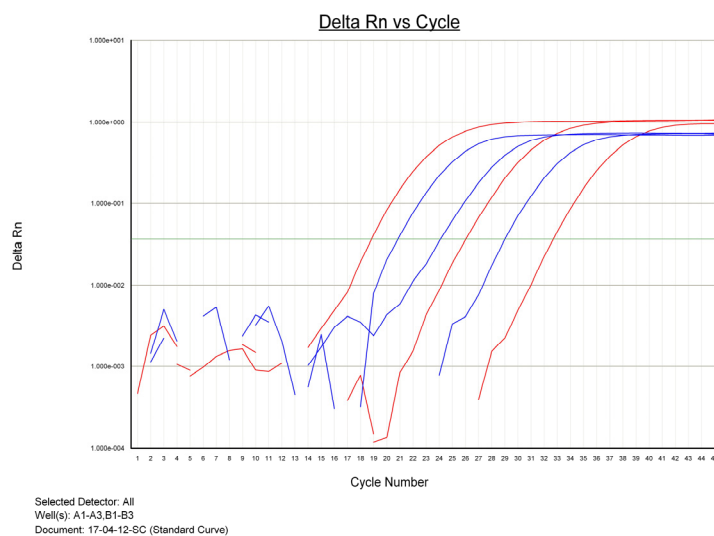


Grafikon A. Izgled standardne krive dobijene amplifikacijom komercijalnih standarda poznatih koncentracija za internu kontrolu (HCV IC) izolacije i reakcije amplifikacije.

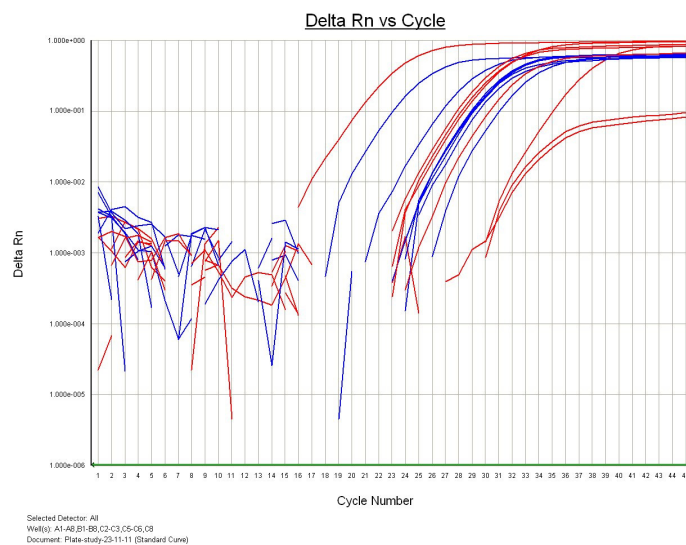


Grafikon B. Izgled standardne krive dobijene amplifikacijom komercijalnih standarda poznatih koncentracija za kvantitativne HCV standarde (QS HCV).

*Nagibi standardnih krivih su 3,25 za IC i 3,20 za QS HCV standarde. Razlika nagiba manja je od 0,1 što ukazuje na sličnu efikasnost dve reakcije i omogućava adekvatnu normalizaciju i kvantifikaciju uzoraka nepoznate koncentracije RNK HCV.



Grafikon C. Izgled amplifikacionih plotova standarda interne kontrole (HCV IC-plava boja) i kvantitativnih HCV standarda (QS HCV-crvena boja).



Grafikon D. Reprezentativni amplifikacioni plotovi uzoraka nepoznate koncentracije RNK HCV (crvena-boja) i standarda interne kontrole (HCV IC, plava-boja).

Prilog 2a.

Konzervirane aminokiseline proteina p7 (28 konzerviranih aminokiselina-*)

EF407483	ALENLVVNAASVAGTHGILSLLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407464	ALENLVVNAASVAGTHGIPSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407488	ALENLVVNAASVAGAHGIFSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407478	TLENLVVNAASVAGAHGILSLLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407487	ALENLVVNAASVAGAHGILSLLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407474	ALENLVVNAASVAGAHGIFPFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263274	ALENLVVNAASVAGAHGIFSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYSVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407470	ALENLVVNAASVAGAHGFLSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407469	ALENLVVNAASVAGAHGLLSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263246	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407477	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407481	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263269	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR6	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR7	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR23	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407482	ALENLVVNAASVAGVHGVLVSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407484	ALENLVVNAASVAGTHGVLVSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407460	ALENLVVNAASVAGTHGILPFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263232	ALENLVVNAASVAGTHGILPFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYSVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263289	ALENLVVNAASVAGTHGILPFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263287	ALENLVVNAASVAGTHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR1	ALENLVVNAASVAGTHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263262	ALENLVVNAASVAGTHGTLVSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR22	ALENLVVNAASVAGTHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263264	ALENLVVNAASVAGTHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR5	ALENLVVINAASVAGVHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR10	ALENLVVINAASVAGVHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO1	ALENLVVINAASVAGVHGIFSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407476	ALENLVVNAASVAGAHGIFSLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407485	ALENLVVNAASVAGAHGFLSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263245	ALENLVVNAASVAGAHGVLVSLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO11	ALENLVVNAASVAGAHGTLVSLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR24	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO7	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO8	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR19	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR21	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263261	ALENLVVNAASVAGTHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263248	ALENLVVNAASVAGTHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR8	ALENLVVNAASVAGTHGILSFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407461	ALEGLVVNAASVAGAHGILSFLMFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407458	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263249	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO6	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263241	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263240	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263239	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407479	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407472	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407466	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407463	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407462	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263276	ALENLVVNAASVAGAHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407475	ALENLVVNAASVAGVHGILSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407480	ALENLVVNAASVAGAHGLPFFVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAVYGIWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407459	ALENLVVNAASVAGAHGVLVFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407486	ALENLVVNAASVAGAHGILPFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263288	ALENLVVNAASVAGTHGVLVFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO10	ALENLVVNAASVAGAQTLPFLVFFCAAAYITGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR2	ALENLVVNAASVAGAHGTLVFLVFFCAAAYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407465	ALENLVVNAASVAGAHGILPFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407468	ALENLVVINAASVAGAHGVLVSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR11	ALENLVVINAASVAGAHGLLSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263277	ALENLVVNAASVAGAHGVLVSLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO4	ALENLVVNAASVAGAHGLLSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407471	ALENLVVNAASVAGAHGFLSFLVFFCAAAYIKGRLLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63

NR17	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLAPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR20	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLAPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYT	63
AM263278	ALENLVLNAASLAGAHGMLSLFLVFFCAAWYIKGRLAPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263233	ALENLVLNAASLAGAHGTLVFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM263247	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO19	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
AM2632	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYSVWPLLLFLALPPRAYA	63
AM263235	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR12	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO14	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGKLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO2	ALENLVLNAASLAGVHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR4	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO3	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO5	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO9	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO13	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO17	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAVYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO15	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO16	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO20	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO18	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO12	ALENLVLNAASLAGAHGTLVFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR3	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA	63
NR18	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA	63
NR15	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA	63
SVO22	ALENLVLNAASLAGAHGVLVFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA	63
NR16	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGVAYATYGVWPLLLLLLALPQRAYA	63
NR13	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA	63
NR14	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAIYGVWPLLLLLLALPQRAYA	63
SVO21	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
NR9	ALENLVLNAASLAGAHGILSFLVFFCAARYIKGRLVPGAAYAFYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407473	ALENLVLNAASVAGAHGILSLLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
EF407467	ALENLVLNAASLAGAHNLSLLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLFLLLLALPPRAYA	63
AM263260	ALENLVLNAASVAGAHGLISLLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLVLLLLALPPRAYA	63
SVO23	ALENLVLNAASVAGTHGYVSLLVFFCAAWYIKGRLVPGAAYALYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63
SVO24	ALENLVLNASVAGTHGLVSLLVFFCAAWYIKGRWVPGAAYVLYGVWPLLLLLLALPPRAYA	63

:**.* :*:*.*.:. .: : ** *.*: .*.:. *.:** .:***** **::

Stručna biografija

Snežana Jovanović-Ćupić rođena je 14.05.1970. godine u Sarajevu gdje je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 28.12.2000. godine, na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Sarajevu (studijska grupa-Biologija), odbranom diplomskog rada pod naslovom “*Raspodjela glavnih krvnih grupa ABO i Rh sistema u uzorku oboljelih od malignih tumora organa digestivnog trakta*“ pod mentorstvom akademika prof. dr Ljubomira Berberovića.

Školske 2001/2002 upisala je poslediplomske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i biohemija. Magistarski rad pod naslovom “*Korelacija sekvence 5' netranslirajućeg regiona u genomu virusa hepatitisa tipa C sa antivirusnom terapijom*“ odbranila je 15.03.2006. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom dr Gorane Stamenković (viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković“) i prof. dr. Bogomira Dimitrijevića (naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke “Vinča“

Od 01. juna 2001. godine zaposlena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke “Vinča“. U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 2006. godine.

Do sada je publikovala 7 naučnih radova iz uže naučne oblasti, 5 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova i jedno tehničko rešenje-patent. Trenutno je angažovana na projektima “Molekularne determinante za dizajn tumor markera“ (br. 173049) i “Ispitivanje i verifikacija multidisciplinarnih metoda za forenzičke analize u funkciji neproliferacije oružja za masovno uništenje (br. 37021), Ministarstva za prosvetu i nauku, Republike Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Снежана Јовановић-Ћупић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

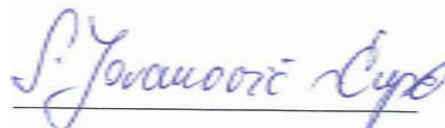
Конзервирана својства протеина вируса хепатитиса Ц генотипа 1б као прогностичких

маркера одговора на комбиновану терапију пегилованим интерфероном и рибавирином

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Снежана Јовановић-Ђупић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Конзервирана својства протеина вируса хепатитиса Ц као прогностичких
маркера одговора на комбиновану терапију пегилованим интерфероном и рибавирином

Ментор др Сања Глишић, научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“
др Горан Брајушковић, доцент, Биолошког факултета,
Универзитета у Београду

Потписани Снежана Јовановић-Ђупић

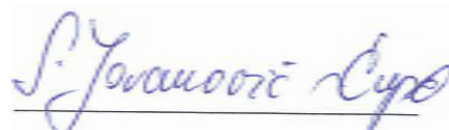
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Конзервирана својства протеина хепатитиса Ц генотипа 1б као прогностичких маркера одговора на комбиновану терапију пегилованим интерфероном и рибавирином

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

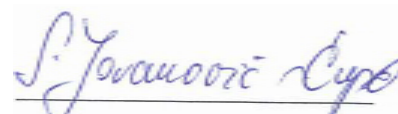
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2012.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.