



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**



Вук Р. Вуковић

**ПОВЕЗАНОСТ БРОЈА РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА И  
ИМУНСКОГ ОДГОВОРА  
СА СТЕПЕНОМ ВИРУСНЕ РЕПЛИКАЦИЈЕ ТОКОМ ХРОНИЧНЕ  
ХЦВ ИНФЕКЦИЈЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Проф. др Дејан Баскић

Крагујевац 2014

# САДРЖАЈ

1	УВОД.....	1
1.1	Вирус хепатитиса Ц.....	1
1.1.1	Структура и биологија вируса хепатитиса Ц.....	1
1.1.2	Умножавање вируса хепатитиса Ц.....	4
1.1.3	Вирусни генотип, хетерогеност и номенклатура .....	6
1.2	Природни ток болести.....	8
1.3	Имунски одговор у акутној HCV инфекцији .....	11
1.3.1	Урођена имуност .....	11
1.3.2	Стечени имунски одговор .....	12
1.4	Имунски одговор у хроничној HCV инфекцији .....	15
1.4.1	Механизми избегавања имунског одговора .....	15
1.4.2	Исцрпљеност имунског одговора/анергија.....	17
1.4.3	Брзина вирусне репликације .....	17
1.4.4	Т регулаторне ћелије.....	18
1.4.5	Цитокини и цитокински рецептори у HCV инфекцији .....	20
1.4.6	Интерлеукин 12 (IL-12).....	21
1.4.7	Интерферон-гама (IFN- $\gamma$ ).....	22
1.4.8	Интерлеукин 17 (IL-17).....	23
1.4.9	Интерлеукин 2 (IL-2).....	23
1.4.10	Интерлеукин 10 (IL-10).....	24
1.4.11	Интерлеукин 9 (IL-9).....	25
1.4.12	Интерлеукин 22 (IL-22).....	25
1.4.13	Интерлеукин 6 (IL-6).....	26
1.4.14	Интерлеукин 13 (IL-13).....	26
1.4.15	Интерлеукин 4 (IL-4).....	26
1.4.16	Интерлеукин 5 (IL-5).....	27
1.4.17	Фактор некрозе тумора (TNF alpha) .....	27
1.4.18	Интерлеукин 1 бета (IL-1 $\beta$ ) .....	28
1.5	Клинички знаци хепатитиса Ц инфекције .....	28
1.6	Преношење и фактори ризика HCV инфекције.....	29
1.7	Дијагноза HCV инфекције .....	31
1.7.1	Лабораторијско Тестирање.....	32
1.7.2	Серолошки тестови .....	32

1.7.3	Молекуларни тестови .....	33
1.7.4	Тестови генотипизације .....	33
1.7.5	Хепатитис Ц кор антиген.....	34
1.7.6	Корисност биопсије јетре и неинвазивни тестови за фиброзу .....	34
1.8	Терапија HCV инфекције.....	35
1.8.1	Оправдање за лечење, индикације и контраиндикације.....	35
1.8.2	Оптимално лечење хроничне HCV инфекције: Пегилирани интерферон- алфа и рибавирин .....	37
1.8.3	Могуће нежељене појаве услед лечења .....	38
1.8.4	Циљеви и исходи лечења.....	38
1.8.5	Имунски одговор у току антивирусне терапије .....	41
2	ЦИЉ РАДА.....	44
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	45
3.1	Испитаници .....	45
3.2	Терапијски протокол .....	45
3.3	Методe .....	46
3.3.1	Узимање биолошких узорака.....	46
3.3.2	Патохистолошка евалуација степена активности хепатитиса и стадијума фиброзе.....	47
3.3.2.1	Стандардна патохистолошка обрада.....	47
3.3.2.2	Микроскопска анализа препарата .....	47
3.3.3	Анализа популација моноклеарних ћелија јетре методом имунохистохемије .....	48
3.3.3.1	Методологија имунохистохемијског бојења.....	49
3.3.3.2	Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења.....	50
3.3.3.3	Очитавање резултата .....	50
3.3.4	Анализа популација моноклеарних ћелија периферне крви методом проточне цитометрије .....	53
3.3.4.1	Бојење мембранских маркера .....	53
3.3.4.2	Интрацелуларно бојење Foxp3 транскрипционог фактора.....	54
3.3.4.3	Очитавање резултата на проточном цитометру.....	55
3.3.5	Мерење концентрације цитокина у серуму испитаника методом проточне цитометрије.....	55
3.3.5.1	Принцип извођења теста .....	55
3.3.5.2	Методологија FlowCytomix.....	56
3.3.6	Статистичка анализа .....	57
4	РЕЗУЛТАТИ.....	58
4.1	Повезаност предиктивних фактора и исхода инфекције и терапије .....	58

4.1.1	Основне карактеристике пацијената са HCV инфекцијом.....	58
4.1.2	Пол, старосна доб и времија као предиктивни фактор.....	61
4.1.3	Пут инфекције као предиктивни фактор.....	62
4.1.4	Генотип вируса као предиктивни фактор .....	64
4.1.5	Повезаност предиктивних фактора и стадијума фиброзе код пацијената са HCV инфекцијом .....	65
4.1.6	Повезаност предиктивних фактора и одговора на терапију код пацијената са HCV инфекцијом .....	68
4.2	Анализа популација мононуклеарних ћелија јетре методом имунохистохемије.....	71
4.2.1	Учесталост популација мононуклеарних леукоцита код пацијената са различитим одговором на терапију .....	71
4.3	Учесталост популација мононуклеарних леукоцита код пацијената са различитим стадијумом фиброзе јетре.....	78
4.4	Серумске вредности цитокина код пацијената са ХВЦ инфекцијом .....	85
4.5	Анализа нивоа експресије молекула методом проточне цитометрије .....	97
5	ДИСКУСИЈА.....	106
6	ЗАКЉУЧЦИ.....	123
7	ЛИТЕРАТУРА.....	127
8	ПРИЛОГ .....	162
8.1	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	162
8.2	KEY WORDS DOCUMENTATION .....	166
8.3	БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА .....	170
8.4	СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА .....	171
8.5	THE LIST OF PUBLISHED PAPERS .....	172
8.6	ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ .....	173

## ПОПИС СКРАЋЕНИЦА И СИМБОЛА

ALT	Аланин аминотрансфераза
Anti-HCV	Антитела на HCV
APC	Антиген презентујућа ћелија
AST	Аспартат аминотрансфераза
B	Б лимфоцит
C	Протеин капсида
CCR	Група хемокинских рецептора
CD4	Гликопротеин на површини Т помагачких ћелија (од енг. <i>Cluster of Differentiation 4</i> ).
CD8	Гликопротеин на површини цитотоксичних Т лимфоцита и NK ћелија (од енг. <i>Cluster of Differentiation 8</i> ).
CTL	Цитотоксични Т лимфоцит
CLDN1	Клаудин 1
CXCR	Група хемокинских рецептора
DC	Дендритске ћелије (од енг. <i>Dendritic Cells</i> ).
pDC2	Плазмоцитоидне дендритске ћелије
mDC1	Мијелоидне дендритске ћелије
DC-SIGN	Дендритска ћелија-специфични интрацелуларни адхезиони молекул-3- grabbing non integrin (од енг. <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non integrin</i> ).
EIA	Имуноензимски тест (од енг. <i>Enzyme Immunoassay</i> ).
ETVR	Вирусолошки одговор на крају лечења (од енг. <i>End of Treatment Viral Response</i> ).
EVR	Вирусолошки одговор након 12 недеља лечења (од енг. <i>Early Viral Response</i> ).
eRVR	Продужени брзи вирусолошки одговор (од енг. <i>Extended Rapid Virologic Response</i> ).
EIF2a	Фактор иницирања транслације
EVR	Рани вирусолошки одговор (од енг. <i>Early Viral Response</i> ).
F	Фиброза (по Кнодел /Исаковом индексу).
GAGH	Гликозаминогликани-хепарин
NAI	Патохистолошки индекс запаљенске активности по Кнодел-Исаку (од енг. <i>Hepatitis Activity Index</i> ).
HCV RNK	Рибонуклеинска киселина HCV вируса

HIV	Вирус хумане имунодефицијенције (од енг. <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ).
HCV	Хепатитис Ц вирус
HS	Хепарин сулфат
HHC	Хронични хепатитис Ц
HVR-1	Хиперваријабилни регион (од енг. <i>Hypervariable Region</i> ).
IL	Интерлеукин
IFN	Интерферон
IPS-1	Митохондријски антивирусни сигнализирајући протеин
IRF3	Регулаторни фактор Интерферона 3 (од енг. <i>Interferon Regulatory Factor3</i> ).
IRES	Унутрашње рибозомално улазно место (од енг. <i>Internal Ribosome Entry Site</i> ).
ISG	Интерфероном стимулирани гени (од енг. <i>Interferon Stimulated Genes</i> )
IU/ml	Интернационалне јединице по милилитру
Јак/STAT	Сигнални пут
Kg	Килограм
K3EDTA	Антикоагулант полиамино карбоксилна киселина
mg	Милиграм
MHC	Главни Комплекс ткивне подударности (од енг. <i>Major Histocompatibility Complex</i> ).
NK	Урођеноубилачке ћелије (од енг. <i>Natural Killer limfocit</i> ).
NKT	Урођеноубилачке Т ћелије (од енг. <i>Natural Killer T limfocit</i> ).
NS	Неструктурални протеин HCV вируса
OAS	Олигоаденилат синтетаза (од енг. <i>Oligoadenilat Sintetaza</i> ).
ORF	Велико отворено подручје кодирања (од енг. <i>Open Reading Frame</i> ).
PCR	Ланчана реакција полимеразом
PD-1	Мембрански протеин (од енг. <i>Programmed Death 1</i> ).
PEG	Полиетилен гликол
PEG INF- $\alpha$	Пегилирани интерферон алфа
PKR	Протеин Киназа R

RVR	Брзи вирусолошки одговор (од енг. <i>Rapid Viral Response</i> ).
Rib	Рибавирин
RR	Повратници, пацијенти код којих долази до поновног јављања вирусне РНК, након терапије (од енг. <i>Responder-relapser</i> ).
s.c.	Субкутано
STAT	Сигнални пут (од енг. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> ).
SR-BI	Хумани чистачки рецептор типа Б (од енг. <i>Scavenger Receptor B type</i> ).
SVR	Трајни вирусолошки одговор 6 месеци након завршетка лечења (од енг. <i>Sustained Viral Respononse</i> ).
Th	Помагачки Т лимфоцит (од енг. <i>T helper</i> ).
TNF- alfa	Фактор некрозе тумора (од енг. <i>Tumor Necrosis Factor alfa</i> ).
TLR	Тип рецептора-Рецептор сличан толу (од енг. <i>Tool Like Receptors</i> ).
TRIF	(од енг. <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i> )
L-SIGN	(од енг. <i>Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin</i> )
LDL	Протеински рецептор ниске густине
%	Процент
<	Мање
>	Више
Foxp3	Транскрипциони фактор (од енг. <i>Forkhead helix transcription factor p3</i> ).

## Захвалница

*Ова докторска дисертација је осмишљена и урађена у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Имуношкој лабораторији Института за јавно здравље у Крагујевцу, Клиници за инфективне болести, Клиничког центра Крагујевац, Центру за патолошко-анатомску дијагностику, Клиничког центра Крагујевац и Клиници за хематологију, Клиничког центра Крагујевац.*

*Највећу захвалност дугујем Проф. др Дејану Баскићу, ментору, другу и пријатељу, на указаном поверењу, разумевању, стрпљењу, оригиналним идејама и подстицању да проблем увек посматрам са више различитих страна али и најбољим решењима, као и на несебичној помоћи и подршци у сваком сегменту израде ове тезе.*

*Посебну захвалност дугујем Доц. др Сузани Поповић на огромној помоћи како у експерименталном раду тако и у обради података и писању резултата али и на стручним и пријатељским саветима, подршци и помоћи.*

*Велику захвалност дугујем Проф. др Жељку Мијаиловићу, на стручној помоћи, корисним саветима, подршци и разумевању током израде дисертације.*

*Велику захвалност дугујем и Проф. др Слободанки Митровић, на несебичној помоћи у идејном решавању проблема, великој помоћи око имунохистохемијских резултата као и на стручним и пријатељским саветима приликом израде овог рада.*

*Захваљујем се Проф. др Предрагу Ђурђевићу и др Данијели Јовановић са Клинике за хематологију, на помоћи, подршци и разумевању током израде дисертације.*

*Захваљујем се Проф. др Драгићу Банковићу, на великој и свесрдној помоћи око статистичке обраде података, на тој генијалној способности да бројевима да душу и значење.*

*Захваљујем се другу и пријатељу, Драгану Радовићу-Кефалу, за комплетну софтверску и техничку подршку и припрему рукописа за штампу.*



*Мојој породици,  
мајци и успомени на оца*

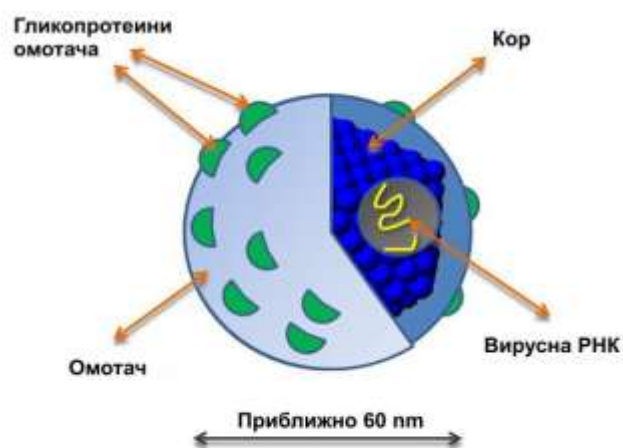
# 1 УВОД

## 1.1 Вирус хепатитиса Ц

Данас се хепатитис Ц вирус (HCV од енг. *Hepatitis C virus*), идентификује као агенс одговоран за већину случајева парентерално преносивих и многих спорадичних случајева не А и не Б хепатитиса (NANB од енг. *non-A, non-B hepatitis*). Вирус хепатитиса Ц откривен је 1989. године у Калифорнији (1).

Његовим је открићем разјашњена етиологија великог броја посттрансфузијских хепатитиса дотад непознатог узрока. Само откривање и карактеризација главног узрочника NANB, представља велики успех у примени техника клонирања у идентификацији нових инфективних агенаса. Многи се аутори и истраживачки тимови баве хепатитисом Ц са аспекта учесталости, озбиљности постхепатичких секвела и дијагностичко-терапијских дилема. Истраживања су резултирала многим новим сазнањима, од којих су бројна теоријски и практично потврђена а нека су остала на нивоу хипотеза (2, 3).

### 1.1.1 Структура и биологија вируса хепатитиса Ц



Слика 1.1. Изглед и структура HCV-а. Извор: Colm G., Wikimedia Commons, 2008.

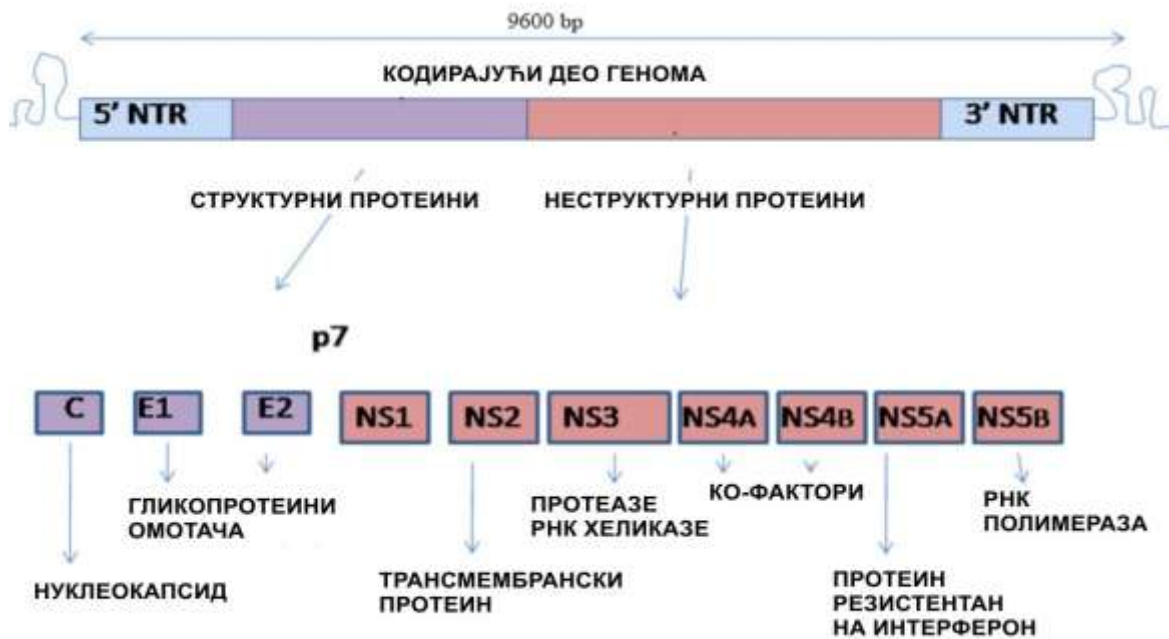
Структура и биологија HCV била је непотпуно схваћена због непостојања ефикасног система ћелијске културе осетљиве за HCV инфекцију и репликацију, недостатка малог анималог модела HCV инфекције, као и ниског титра вируса који се

налазе у серуму и јетри HCV инфициране особе. Тек недавно структура вируса је представљена захваљујући електронској микроскопији (4). Сам HCV припада породици *Flaviviridae*, род *Hepacivirus* и прва сазнања о HCV су првобитно изведена управо од ових вируса (5, 6).

Хепатитис Ц вирус је вирус са липидним омотачем на којем се налазе гликопротеински изданци, величине је од 30-60nm, поседује једну рибонуклеинску киселину, геном позитивног поларитета и ланац од око 9.500 нуклеотида (7-9) (Слика 1.1.).

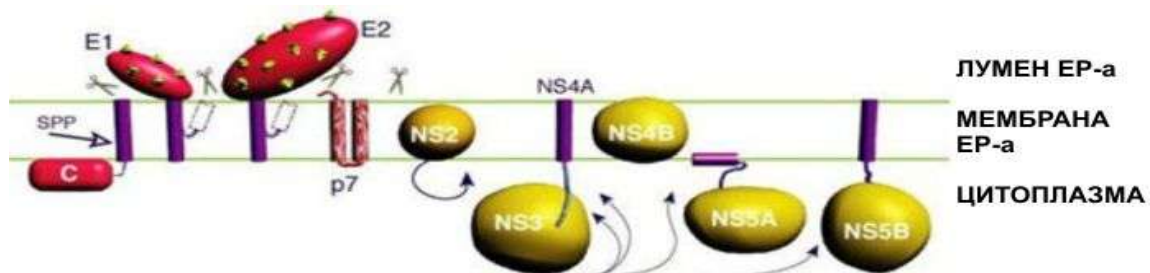
Геном је подељен на структурни S (језгро и омотач), неструктурни NS и два кратка терминална некодирајућа региона (NTR од енг. *non translated region*) на 5' и 3' крају (на 3' крају poly A или poly U тракта у зависности од вирусног генотипа), који се не преводе и не учествују у кодирању вирусних протеина, али регулишу два основна корака у животном циклусу вируса: иницијацију транслације и репликацију вируса. 5' некодирајући регион се састоји од 341 нуклеотида и он је високо конзервиран између различитих генотипова HCV и поседује унутрашњу рибосомалну функцију која је неопходна за независну транслацију вирусне RNK и на тај начин има кључну позицију у животном циклусу вируса (6,10). Структурна и неструктурна регија RNK генома са одговарајућим генима чине тзв. велико отворено подручје кодирања (ORF од енг. *open-reading frame*) (11-14). Отворено подручје кодирања ORF, кодира синтезу великог полипротеина од 3.010 до 3.033 аминокиселина (22). Продукт превођења ORF, је полипротеин који се посттранслацијски цепа помоћу вирусних и ћелијских протеаза у 10 протеина. Они укључују три структурна протеина: протеин нуклеокапсида или кор протеин (C од енг. *Core*) и два гликопротеина омотача (E1 и E2), 5 неструктурних протеина (NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B), већином ензима који учествују у процесу умножавања и два протеина (p7 и NS2) која имају улогу у састављању вирусне честице. Протеин нуклеокапсида или кор протеин је структурни протеин HCV-а, везује се за RNK и учествује у формирању вирусног капсида (16, 17) (Слика 1.2. и Слика 1.3).

Гликопротеини E1 и E2 су структурни протеини који учествују у формирању вирусне партикуле, а неопходни су за улазак вируса у ћелију домаћина. Грађени су у облику хетеродимера (18). Првих 28 аминокиселина гликопротеина E2 граде тзв. Хиперваријабилни регион HVR-1 (од енг. *Hypervariable Region*), који представља најваријабилнију регију генома и поседује епитопе који изазивају стварање неутралишућих антитела.



Слика 1.2. Организација генома HCV-a. Извор: Colm G., Wikimedia Commons, 2007.

Сматра се да континуирана генетичка промена у HVR-1, дозвољава вирусу HCV да "избегне" неутрализацију од стране домаћиновог хуморалног имуног система (19). NS3 садржи протеазе, RNK хеликазе, нуклеозиде и трифосфатазе које су битне за репликацију вируса, док NS5 представља RNK полимеразу која је битни ензим за транскрипцију и репликацију вируса (8, 15, 20-22). Стога је инхибиција функције NS3 и NS5 циљно место потенцијалних антивирусних терапија. HCV вирус репликује се првенствено унутар хепатоцита, а може инфицирати и В лимфоците, дендритске ћелије (DC од енг. *Dendritic Cell*) и остале периферне мононуклеарне ћелије.



Слика 1.3. Изглед HCV полипротеина. Извор: [http://stanford.edu/~ncho/AR\\_2.html](http://stanford.edu/~ncho/AR_2.html).

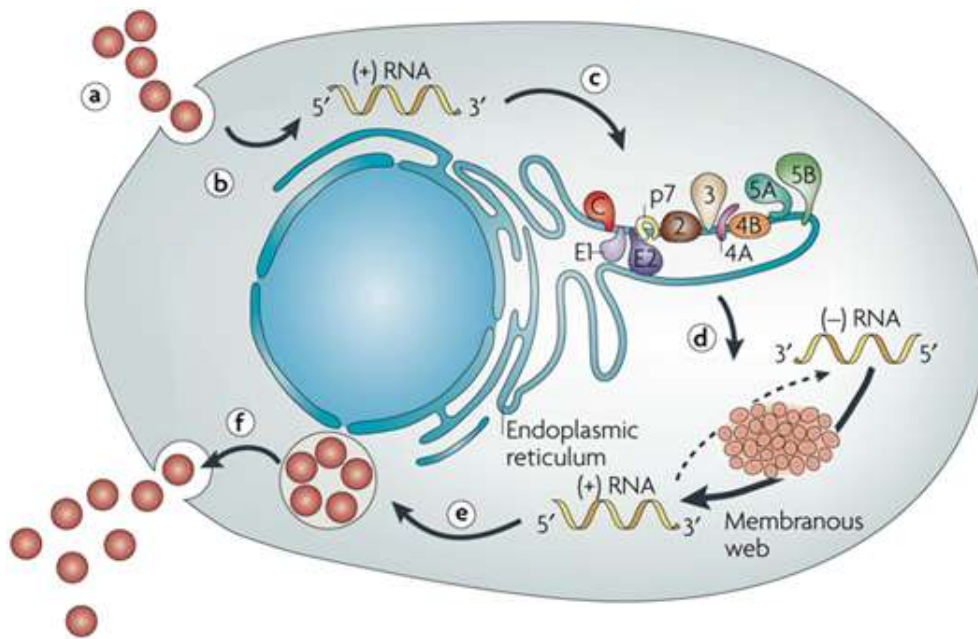
Везивање за В ћелије може подстаћи клоналну пролиферацију повезану с криоглобулинемијом (23, 24). Без присуства протеина NS4, протеин NS3 се налази дифузно расут у цитоплазми и једру, а уз присуство протеина NS4, везује се за ендоплазматски ретикулум (25) p7 је 63-амино-киселински полипептид и налази се на раскрсници између структуралног и не-структуралног региона.

Састоји се од два трансмембранска домена са јонском каналном активношћу (26-29). На основу досадашњих истраживања потврђено је да инхибитори протеина p7 блокирају вирусну продукцију (30). NS2 је мембрански протеин величине око 21-23 kDa. Његов аминокрај веже се за мембрану ендоплазматског ретикулума док се на карбоксилном крају налази домен одговоран за протеазну активност, а заједно са протеазом NS3 (код које се протеазни домен налази на аминокрају) формира активну протеазу која раскида везу између протеина NS2 и NS3. За разлику од протеина p7, репликација не захтева присуство NS2 (31).

### 1.1.2 Умножавање вируса хепатитиса Ц

Хепатоцити су примарно место умножавања вируса и садрже велику количину HCV-RNK. Вирус се налази у цитоплазми хепатоцита и не уграђује се у геном ћелије домаћина (32). Новије имунохистохемијске студије показују да се вирус налази и у билијарном епителу и мононуклеарним ћелијама периферне крви, које могу послужити као резервоар за поновну реактивацију након престанка лечења (33). Умножавање HCV почиње везивањем вируса за ћелијске рецепторе. Иако ћелијски рецептори нису у потпуности познати, на самој површини ћелија доказани су различити молекули који се вежу са HCV: CD81, липопротеински рецептор ниске густине LDL, хумани чистачки рецептор типа В (од енгл. *Scavenger Receptor B type; SR-BI*), DC-SIGN (од енгл. *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin*) и L-SIGN (од енгл. *Liver/lymph nodespecific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*), а у новије време и клаудин 1 (CLDN1) (17,34-36). CD81 се веже са E2-HCV-а али је за улазак вируса у ћелију неопходан и секундарни рецептор, односно корецептор. SR-BI је липопротеински рецептор високе густине који се налази у високој концентрацији на хепатоцитима и веже се са E2-HCV. DC-SIGN се налази на дендритским ћелијама, а L-SIGN на ендотелним ћелијама јетриних синусоида и лимфних чворова. Ови рецептори олакшавају улазак HCV у хепатоците а вероватно и у PMNC. Улазак HCV у ћелију помажу и неки други молекули као што су гликозаминогликани-хепарин (GAGH) и

хепарин сулфат (HS) (37-40). Вирус улази у ћелију рецептором посредованом ендцитозом. Због ниског рН у ендосому долази до конформацијских промена протеина омотача, фузије вируса са мембраном ендосома (деловањем Е1) и отпуштања RNK у цитоплазму. HCV RNK на 5' крају садржи комплексну структуру тзв. унутрашње рибозомално улазно место IRES (од енг. *Internal Ribosome Entry Site*,) која се веже на 40S подјединицу рибозома и омогућава почетак транслације (41-43). Геном делује као информациона RNK и преводи се у полипротеин. Структурни се протеини цепају помоћу ћелијских протеаза (сигнална пептидаза) а неструктурални помоћу вирусне NS2-NS3 протеазе и NS3 серинске протеазе.



**Слика 1.4.** Умножавање вируса хепатитиса Ц а) везивање за ћелијски рецептор и улазак у ћелију, б) свлачење HCV и отпуштање у цитоплазму; ц) превођење у полипротеин помоћу IRES; д) репликација RNK; е) састављање HCV и излазак из ћелије; Умножавање HCV одвија се на специфичној тзв. мрежастој мембрани. Извор: Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453-456

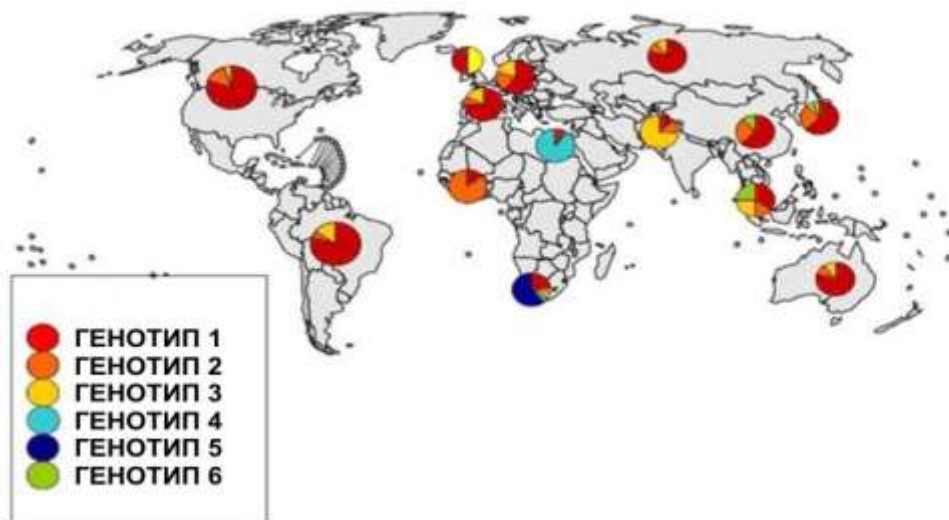
Неструктурални протеини NS3-NS5 се спајају и граде комплекс репликазе на интрацитоплазматским мембранама која кодира синтезу негативног ланца RNK, а он служи као калуп за синтезу позитивног ланца генома. Новосинтетисана геномска RNK се спаја са протеином капсида и гради нуклеокапсид. Вирус добија омотач пупљењем кроз интрацелуларне везикуле, а из ћелије се ослобађа егзоцитозом или лизом (44, 45). Умножавање вируса је врло брзо ( $\sim 10^{12}$  вирусних честица на дан) са временом полуживота 3-5 сати (46) (Слика 1.4).

### 1.1.3 Вирусни генотип, хетерогеност и номенклатура

Компаративним анализама HCV изолата показана је генетичка варијабилност HCV-а из различитих географских подручја (47, 48). Симондс и сарадници су урадили опсежну филогенетску анализу у којој је анализирано 222 нуклеотида из NS5 региона код 76 изолата прикупљених из Европе, Северне и Јужне Америке и великог броја азијских земаља. Регион NS5 је одабран зато што му је варијабилност врло слична варијабилности целог генома (преко 44% дивергенције у нуклеотодној секвенци између различитих типова). На основу ове анализе произишла је номенклатура различитих генетских варијанти HCV-а (49-50).

Дефинисана су 4 генетичка хијерархијска нивоа: тип, подтип, изолат и квазиврста. Типови су означени бројевима од 1 до 6, а подтипови а, б и с. Изолати представљају варијабилност геномске секвенце у оквиру истог подтипа. Термин квазиврсте подразумева варијабилности генома HCV-а у оквиру истог изолата. Квазиврсте се у вирусологији дефинишу као хетерогене популације вирусних честица чији се геноми међусобно разликују у барем једној базној замени (51-53). Филогенетска анализа открила је груписање у секвенцама у шест главних група, неке од њих, две или три показале су више повезаних варијанти (подгрупа). Поједини се генотипови у нуклеотидном следу разликују 31-33%, док се подтипови разликују око 20-25%. Осим тога, HCV као и други RNK-вируси, показује висок степен спонтаних мутација. Вирусна RNK полимераза нема способност препознавања погрешно уметнутих нуклеотида током умножавања нити делотворног "поправка" RNK што доводи до бројних геномски различитих варијанти истог вируса у једном домаћину тзв. квазиврста (51-53).

Неки су генотипови широко распрострањени свуда у свету (1а, 1б, 2а и 2б) док се други (5а и 6а) појављују на ограниченим географским подручјима. На пример, у Северној Америци генотип 1а је доминантан, а прате га 1б, 2а, 2б и 3а. У Европи доминира генотип 1б, а прате га 2а, 2б, 2с и 3а. Генотипови 4 и 5 налазе се искључиво само у Африци, мада најновији подаци говоре да се и он шири изван својих упоришта у Африци, све чешће се детектује у свим Европским земљама са великим процентом у Француској. Генотип 6 је углавном заступљен у Југоисточној Азији (54-58) (*Слика 1.5.*).



Слика 1.5. Глобална дистрибуција HCV генотипова. Извор: World Health Organization, 2013.

Генотип је клинички важан у одређивању потенцијалног одговора на терапију интерфероном и на потребну дужину такве терапије. Генотипови 1 и 4 мање одговарају на терапију интерфероном него остали генотипови 2, 3, 5 и 6 (59, 60). Тренутни обрасци HCV класификације заснивају се на генетској сродности. Предложено је неколико класификација, од њих се две углавном користе у литератури. Прва, коју је предложио Симондс и сарадници заснива се на филогенетској анализи NS5 региона (61), и разликује шест великих генотипова: од 1 до 6 (означена арапским бројевима), четири од њих (типови од 1 до 4), поседују неколико подтипова (а, b и c). Друга предложена класификација од Окамота и сарадника, се базира на анализи комплетног генома из седам изолата и идентификује пет генотипова HCV: од I до V (означено римским бројевима). Генотипови I, II, III, IV и V Окамотове класификације одговарају 1a, 1b, 2a, 2b и 3a генотиповима Симондсове класификације (49, 62). Могућа варијација у стопи прогресије болести, разлике међу генотиповима у путевима и учесталости преноса са особе на особу или постизање одрживог одговора на антивирусну терапију могло би имати потенцијалне користи за идентификацију инфективног генотипа у одређеним клиничким ситуацијама. На пример, ако постоје разлике између генотипова у одговору на пегилирани интерферон  $\alpha 2$  (PEG IFN- $\alpha$ ) третман, генотипизација може играти важну улогу у избору пацијента и на избор најефикасније дозе (PEG IFN- $\alpha$ ) и трајања третмана да би се постигао дугорочни одговор. Неки извештаји показују повезаност између инфекције HCV типа 1b (II) и лошег одговора на (PEG IFN- $\alpha$ ) док инфекција



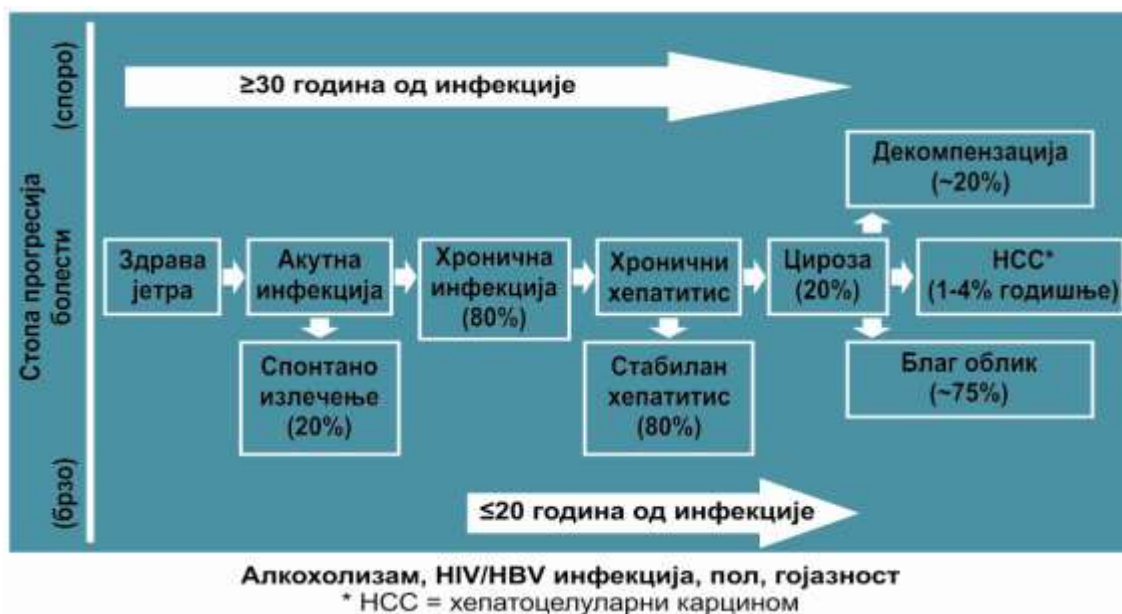
HCV 2a (III), чини се да је повезана са ниским нивоима HCV виремије и доброг одговора на (PEG IFN- $\alpha$ ) терапију (63). Може постојати повезаност између HCV генотипова и озбиљности обољења јетре, посебно цирозе (64). Напредна фиброза/цироза су значајно повезане са инфекцијом генотипом 1b код пацијената са хроничним хепатитисом Ц, са нижим нивоом серумских албумина и повишеним нивоом серумских алфа фетопротеина (65). Познавање географске дистрибуције HCV генотипова не само да пружа информације о пореклу вируса преносиоца, већ је такође важно и за лечење и развој антивирусне вакцине. Вакцина против HCV ће вероватно морати да буде мултивалента због високог степена дивергенције секвенци у „конзервираних гена” који чини осовину заштите између различитих генотипова. Активна област истраживања у HCV је истрага о могућим разликама у току болести, повезане са различитим генотиповима, као што су стопе развоја цирозе и хепатоцелуларног карцинома, и да ли су поједини генотипови мање или више осетљиви на (PEG IFN) третман.

## 1.2 Природни ток болести

Вирус хепатитиса Ц је велики проблем јавног здравља и водећи узрок хроничне болести јетре. Сматра се да је око 180 милиона људи заражено овим вирусом (66). Хепатитис Ц је главни узрок смрти од болести јетре и водећа индикација за трансплантацију јетре у САД (67-69). Неки прорачуни показују да је смртност у вези са HCV инфекцијом веома велика (смрт од карцинома јетре-хепатоцелуларни карцином) и да ће наставити да расте у наредне две деценије (71-72). Акутна HCV инфекција у већини случајева (>80%) протиче као олигосимптоматска или асимптоматска болест. Физикални налаз је најчешће оскудан или нормалан, сем у случајевима када су присутне компликације болести-декомпензована цироза јетре и хепатоцелуларни карцином. Уобичајени симптоми HCV-а као умор, бол у мишићима, губитак апетита или мучнина и бол у горњем делу абдомена, су неспецифични и у многим случајевима благи или одсутни. Сходно томе, HCV се често дијагностикује случајно. Процењује се да су само 30-50% HCV заражених појединаца свесни своје болести и могу искористи могућност лечења а самим тим избећи ризик од даљег преношења вируса (73). Након акутне фазе која је обично субклиничка, спонтана резолуција HCV инфекције догађа се у само 20 % оболелих (74) (Слика 1.6.). HCV доводи до перзистентне инфекције и узрокује хроничну болест јетре у већине инфицираних болесника до 80% (75-77) (Слика

1.6.). Хронични хепатитис Ц карактерише перзистенција HCV-RНК у крви дуже од шест месеци (78). Већина болесника са хроничном HCV је асимптоматска. Најчешћи симптом је хронични умор, артралгија и мијалгија, међутим њихово присуство није у корелацији са тежином болести (79). Кастило и сарадници описали су 2004. године нови облик хепатитиса Ц тзв. окултни хепатитис, који се карактерише присуством HCV-RНК у јетри уз негативне серолошке резултате инфекције (анти-HCV и HCV-RНК у серуму). Осим у јетри у 70% болесника HCV-RНК је доказана и у мононуклеарима периферне крви (80, 81).

Снажан HCV специфични CD4+ CD8+ Т ћелијски одговор усмерен на мултипле HCV епитопе потребан је за спонтану елиминацију вируса у акутној фази, али вирус поседује различите могућности да избегне одбрамбене механизме домаћина и да болест прогредира у хронични хепатитис (82). Неке студије бележе резултате на узорку претежно благе болести, да је имунски одговор био представљен проинфламаторним обрасцем и да су CD4+ Т-лимфоцити играли главну улогу у организовању имунског одговора који се одвијао првенствено у порталном простору (83). Као последица хроничне упале чији је резултат стално присутан процес инфламације, регенерације и фиброзе у многим случајевима коначно долази до развоја цирозе и хепатоцелуларног карцинома. Сматра се да ће 20% хронично HCV инфицираних болесника развити цирозу јетре у периоду од 20-30 година након инфекције (84, 85) (Слика 1.6.).



Слика 1.6. Природни ток HCV 20, односно 30 година од инфекције.

Особе заражене HCV имају годишњи ризик од 2%, а 7-14% петогодишњи ризик за настанак хепатоцелуларног карцинома (HCC) (86, 87). Неке студије показују да чак 77% пацијената са нормалним вредностима ALT има неки стадијум оштећења јетре (88). Сама брзина развоја цирозе врло је променљива и зависи од фактора домаћина и вируса, као што су године старости, телесна тежина, друге присутне болести. Нека истраживања показују да постоје болесници са HCV инфекцијом који не успевају ерадикувати вирус али имају благу болест са врло спором прогресијом и без развоја тешких секвела. Ови подаци нас упућују на закључак да је од виталног интереса проучавање збивања из ћелијске имуности домаћина која може бити одговорна за тако различит исход болести. Код имуносупримираних болесника, нпр. болесника са HIV инфекцијом, бележи се убрзан ток хроничног хепатитиса (89), док са друге стране један број студија показује да је снажан, неспецифични ћелијски одговор према HCV антигенима предуслов развоја високог стадијума хистолошке активности и фиброзе. Добијени подаци нас наводе на закључак да је тип и ширина имунског одговора, генерисана антигеним стимулусом одређена комплексном мрежом интеракција између јетриних антиген презентујућих ћелија, лимфоцита у јетри и имунских ћелија које бивају привучене у јетру (90). Мерења квантитета запаљенске реакције не показују добру повезаност са исходом болести јер занемарују улогу HCV специфичних ћелијских одговора унутар јетриног паренхима, а они су битни у резолуцији инфекције уз минимализирање штете на околним ћелијама (127). Хемокини и њихови рецептори један су од кључних фактора за привлачење леукоцита у подручје инфекције, њихово кретање из синусоидалних простора према хепатоцитима и повезаност са процесом регенерације, фиброзе и малигне трансформације (92, 93). Цитотоксичне Т ћелије (CTL) могу оштетити јетру у хроничној HCV инфекцији али неке субпопулације тих ћелија могу имати протективну улогу (93). Имуни одговор посредован CD4+ Т ћелијама, по резултатима неких истраживања говори да он има протективни учинак на лезију јетре и да би могао бити значајан за елиминацију вируса током терапије базиране на пегилираном интерферону  $\alpha 2$  и рибавирину (Rib) (94). Истраживања на пољу имунског одговора у току терапије пегилираним интерфероном и рибавирином, могла би указати на извесне разлике између пацијената с добрим и лошим одговором. Уколико би добијени резултати потврдили наведена очекивања, то би уједно отворило могућност за извесне терапијске интервенције, спровођењем блокаде или стимулације одређених нивоа имунског одговора (94).

### 1.3 Имуни одговор у акутној HCV инфекцији

Патогенеза HCV инфекције повезана је са интеракцијом између имуноског одговора домаћина и вирусних фактора (95). HCV инфекција резултира појавом HCV RNK у крви 1 до 2 недеље након инокулације вируса али и појавом ефекторских механизма урођене и стечене имуности (96).

#### 1.3.1 Урођена имуност

Сви вишећелијски организми поседују сопствене механизме којима се бране од инфекција. Пошто су ти механизми одбране увек присутни и спремни да препознају и елиминишу микроорганизме кажемо да чине урођену имуност. Урођеноубилачке ћелије (NK од енг. *Natural Killer*), урођеноубилачке Т ћелије (NKT од енг. *Natural Killer T cells*), дендритске ћелије (DC од енг. *Dendritic Cell*), IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  и IFN- $\gamma$ , окосница су почетног имуноског одговора у акутној инфекцији. Као резултат HCV инфекције, долази до продукције IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$  у инфицираним хепатоцитима. Интерферон индукује апоптозу инфицираних хепатоцита и инхибира репликацију вируса путем киназа Р протеина (PKR од енг. *Protein Kinase R*) и олигоаденилат синтетазе (OAS од енг. *Oligoadenylate Synthetase*). Интерферон такође појачава експресију HCV антигена на површини хепатоцита, чинећи инфициране ћелије лакше уочљивим имуномом систему (91). NK ћелије представљају прву линију одбране од вирусних инфекција, те су значајне у патогенези вирусних хепатитиса (97). NK ћелије су класа лимфоцита који одговарају на интрацелуларне микроорганизме убијањем инфицираних ћелија у овом случају хепатоцита, и продукцијом IFN- $\gamma$  који активира макрофаге, DC и Т ћелије (98). Неке студије показују да је број NK ћелија у крви и јетри код хроничне HCV инфекције снижен, (99), и да везање E2 протеина HCV вируса може инхибирати NK ћелијску функцију у смислу смањене цитотоксичне активности (100, 101). Ћелије које су специјализоване за приказивање антигена Т-лимфоцитима су професионалне антиген-презентујуће ћелије. Прототип професионалних антиген презентујућих ћелија (APC од енг. *Antigen Presenting Cells*) су дендритске ћелије, али исту функцију могу имати макрофаги и неколико других типова ћелија (102). Дендритске ћелије повезују урођене и стечене имунолошке одговоре. Постоје мијелоидне (mDC1 од енг. *myeloid Dendritic Cells*) и плазмацитоидне (pDC2 од енг. *plasmacytoid Dendritic Cells*) дендритске ћелије. Мијелоидне дендритске ћелије продукују IL-2 и TNF- $\alpha$  и воде наивне CD4+ лимфоците у смеру Th1 фенотипа. Међутим такве ћелије код хронично HCV инфицираних

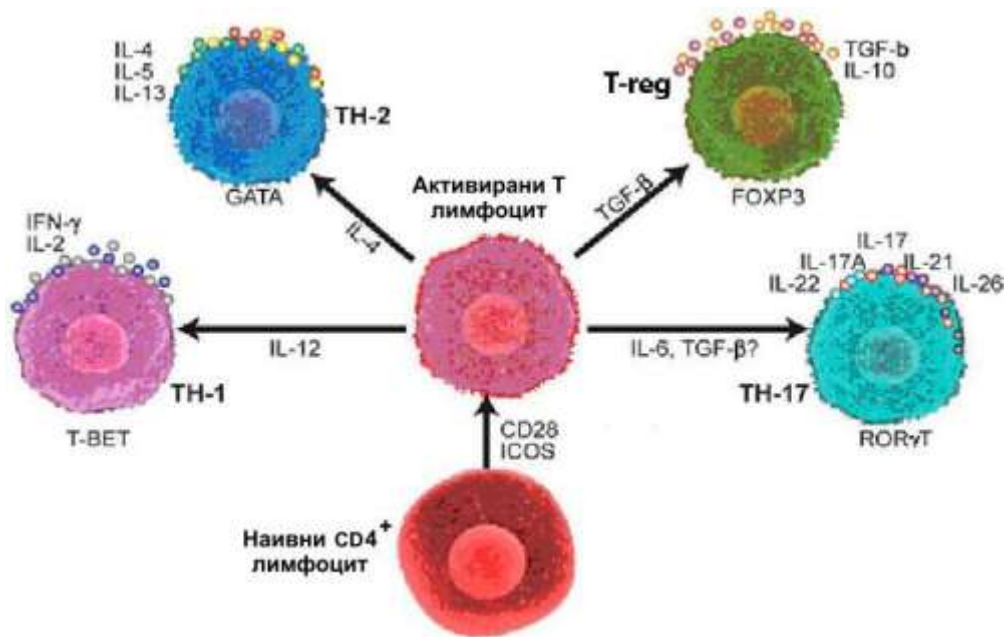
болесника имају смањену способност стимулисања Т ћелијског одговора и секреције IL-12 (такође је таква појава нађена на ћелијама неинфицираних особа стимулираним Е2 и NS3 протеином) што је један од примера вирусним протеинима изазване имunosупресије. Плазмоцитоидне дендритске ћелије секретују IFN- $\alpha$ , и промовишу Th2 одговор (103).

### 1.3.2 Стечени имунски одговор

Два типа стечене имуности, хуморална и ћелијска (целуларна) имуност, посредоване су различитим ћелијама и молекулима, и обезбеђују одбрану од екстрацелуларних (хуморална) или интрацелуларних (целуларна) микроорганизама. Хуморални имунски одговор је посредован протеинима названим антитела. Неутралишућа антитела су обележје излечења код многих вирусних инфекција, међутим код HCV инфекције она нису пресудна за савладавање инфекције, мада имају одређени удео у томе (143). Анти-HCV антитела најчешће се јављају неколико недеља након примарне HCV инфекције, мада ту могу постојати и извесне осцилације, тако да се антитела могу јавити и касније. Одбрана против интрацелуларних микроорганизама посредована је Т лимфоцитима. Основни типови Т лимфоцита су: помагачки Т лимфоцити, CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити (Th од енг. *T helper cells*) и цитотоксични Т лимфоцити, CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити (CTL од енг. *Cytotoxic T Lymphocyte*). CD4<sup>+</sup> Т ћелије продукују цитокине и препознају антигене микроорганизама унетих ендцитозом из екстрацелуларног простора и презентоване у склопу МНС молекула II класе, док CD8<sup>+</sup> Т ћелије које функционишу као цитотоксични Т лимфоцити, препознају пептиде пореклом од цитоплазматских микроорганизама, презентоване у склопу МНС молекула I класе (144).

CD4<sup>+</sup>Т ћелије се могу диферентовати у субсетове ефекторних ћелија које продукују различите цитокине, па самим тим и обављају различите ефекторске функције. Субсетови CD4<sup>+</sup> Т ћелија су: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 и Treg. Диференцијација у различите субсетове се назива поларизација, при чему настају ефекторске и меморијске ћелије. Диференцијацијом у одговарајуће субсетове настаје ефекторна фаза имунског одговора на интрацелуларне бактерије и вирусе (Th1 ћелије), хелминте, паразите и алергене (Th2), док Th17 ћелије учествују у терминацији имунског одговора, антагонизовањем дејства Th1 и Th2 ћелија (106-108) (*Слика 1.7.*).

У одговору на интрацелуларне антигене APC секретују IL-12. IL-12 је фактор диференцијације за Th1 субпопулацију. Секретовани IL-12 делује и на NK ћелије које ће продуковати IFN- $\alpha$ . Синергистичким дејством IL-12 и IFN- $\alpha$  настаје поларизација ка Th1 путу (109). IL-12 везивањем за своје рецепторе активира STAT4 транскрипциони фактор, док IFN- $\alpha$  активира T-bet транскрипциони фактор (110, 111). Оба фактора су значајна у Th1 диференцијацији и у недостатку једног од њих, повећава се осетљивост на интрацелуларне патогене. Осим IL-12 на поларизацију Th1 одговора утиче и IL-18 кога продукују фагоцитне ћелије (112, 113). Неке студије показују да IL-12 и IL-18 синергистички делују, и да ће у недостатку IL-12, IL-18 поларизовати одговор у Th2 правцу. Активирани Th1 ћелије секретују IFN- $\gamma$ , IL-2, Лимфотоксин, TNF. Постоје подаци да је Th1 тип реакције повезан са прогресивним оштећењем јетре код хроничног хепатитиса (112-116).



**Слика 1.7.** Приказ путева диференцијације, експримираних транскрипционих фактора и профила цитокинске секреције различитих субпопулација CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита: Th1 ћелије настају под дејством IL-12, експримацијом транскрипциони фактор T-bet и секретују IL-2 и IFN- $\gamma$ ; Th2 ћелије настају под дејством IL-4, експримацијом транскрипционог фактора GATA и секретују IL-4, IL-5 и IL-13; Регулаторни Т лимфоцити (T-reg) настају под дејством TGF- $\beta$ , експримацијом транскрипционог фактора Foxp3 и секретују TGF- $\beta$  и IL-10; Th17 ћелије вероватно настају под дејством TGF- $\beta$  и IL-6 експресијом транскрипционог фактора ROR $\gamma$ T и секретују IL-17, IL-21, IL-22 и IL-26. Извор: Kostic M. Role of th1 and th17 immune responses in pathogenesis of Multiple sclerosis. Acta Medica Medianae 2010; 49(4): 61-69.

Слично Th1 ћелијској диференцијацији и Th2 ћелијска диференцијација зависи од присутних цитокина. Главни цитокин за поларизацију Th2 одговора је IL-4, кога секретују NK, NKT ћелије, маст ћелије, еозинофили и диференциране Th2 ћелије. Неке

студије показују да је иницијална поларизација ка Th2 одговору зависна од IL-6 из APC, и да се онда наставља IL-4 (107, 108). Друге пак студије говоре да се кључну улогу у поларизацији има IL-2, који повећава доступност генског сегмента IL-4, дејству ензима. Продуковани IL-4 активира транскрипционе факторе STAT6 и GAT3 који стимулишу Th2 развој. Ефекторне Th2 ћелије стимулише запаљенску реакцију посредовану еозинофилима, а смањује штетне последице активације макрофага. Продукују цитокине IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 (116, 117). Th17 ћелије су скоро дефинисана субпопулација CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, први пут изолована из периферне крви болесника оболелих од Кронове болести, као субкласа лимфоцита која продукује велику количину интерлеукина 17 (IL-17), интерлеукина 23 (IL-23), TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-22, GM-CSF, што је у многоме променило концепт патогенезе имфламаторних болести. Фенотипски су Th17 ћелије сличније Th1 него Th2 ћелијама. Неке студије показују да IL-17 може супримирати Th1 диференцијацију у присуству егзогеног IL-12. Али IL-17 може антагонизовати и Th1 и Th2 ћелијски одговор. Док IL-12 и IFN- $\gamma$  могу негативно регулисати Th17 диференцијацију (117).

CD8<sup>+</sup> Т ћелије активирани антигеном и костимулаторима диференцирају се у CTL чији је задатак да убију заражене ћелије, које експримирају дотични антиген. Ефекторски CTL убијају инфициране ћелије тако што секретују протеине који праве поре у мембрани циљних ћелија и индукују фрагментацију DNK и њихову апоптотску смрт. CTL секретују IFN- $\gamma$ , LT, TNF, IL-4, IL-5 и IL-10 (168). Неки подаци за пацијенте са хроничним HCV инфекцијом говоре да су концентрације интрахепатичких HCV-специфичних CD8<sup>+</sup> Т ћелија до 190 пута веће од концентрација на периферији (119). HCV специфичан CD8<sup>+</sup> Т ћелијски одговор игра важну улогу у спречавању и отклањању HCV инфекције (120). Током акутне HCV инфекције са елиминациом вируса, приближно 4-8 недеља након инфекције, види се врло јак мултиспецифични (на различите вирусне епитопе) CD8<sup>+</sup> Т ћелијски одговор (120). У акутној HCV инфекцији Т ћелије играју одлучујућу улогу у излечењу и спречавању развоја хроничне HCV инфекције. Активирани помагачки CD4<sup>+</sup> Т и цитотоксично-супресорски CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити специфични за HCV појављују се у јетри болесника с настанком акутног хепатитиса (172). Велики значај HCV специфичних Т лимфоцита у акутној фази инфекције, огледа се у томе што су они главни контролори репликације вируса и његове елиминације из организма болесника. И док CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити своју антивирусну активност испољавају директно и индиректно путем цитокина, CD8<sup>+</sup> Т

лимфоцити узрокују апоптозу вирусом заражених хепатоцита (121). Главна антивирусна улога CD4+ Т ћелија је секреција антивирусних цитокина и активација вирусно специфичних В ћелија и CD8+ Т ћелија. Успешна елиминација вируса у акутној HCV инфекцији описана је у болесника с високом фреквенцијом Т-лимфоцита специфичних за широки репертоар HCV антигена, Th1 типом цитокинског профила (доминантна синтеза IFN- $\gamma$ ) и карактеристичним фенотипским и функционалним обележјима антиген-специфичних лимфоцита (122). Велики значај развоја снажног CD4+Т одговора лежи у чињеници да CD8+ Т ћелије и антитела не могу одржати ритам са брзом вирусном репликацијом и у случају његовог изостанка, долази до неуспеха у контроли виремије (175). Цитолитичке и нецитолитичке ефекторске функције CD8+ Т ћелија условљене су продукциом цитокина попут IFN- $\gamma$  и IFN- $\alpha$  (119).

Контроверзан је податак да је IFN- $\gamma$  експресија у позитивној корелацији са нивоом инфламације унутар јетре али није у корелацији са нивоом виремије (177). Проенти HCV-специфичних CD8+ Т-лимфоцита у акутној фази инфекције су између 2-8% укупних лимфоцита периферне крви, док друга истраживања показују и ниже вредности у хроничној инфекцији и то просечно 0,05% (између 0,0-1,2%) од укупних лимфоцита (91).

Међутим, део антиген-специфичних лимфоцита показује одређене функционалне поремећаје (снижена синтеза IFN- $\gamma$ , ниска концентрација перфорина и неспособност уништавања циљних ћелија *in vitro*), што вероватно придноси успостављању хроничне инфекције. Литературни подаци о важности HCV-специфичних CD8+ Т-лимфоцита за репликацију вируса и опсег запаљенског процеса у јетри током хроничне фазе инфекције су контроверзни. Део истраживања је показао негативну корелацију између процента HCV-специфичних CD8+ Т-лимфоцита и виремије што указује на важност ових ћелија у контроли вирусне репликације (125).

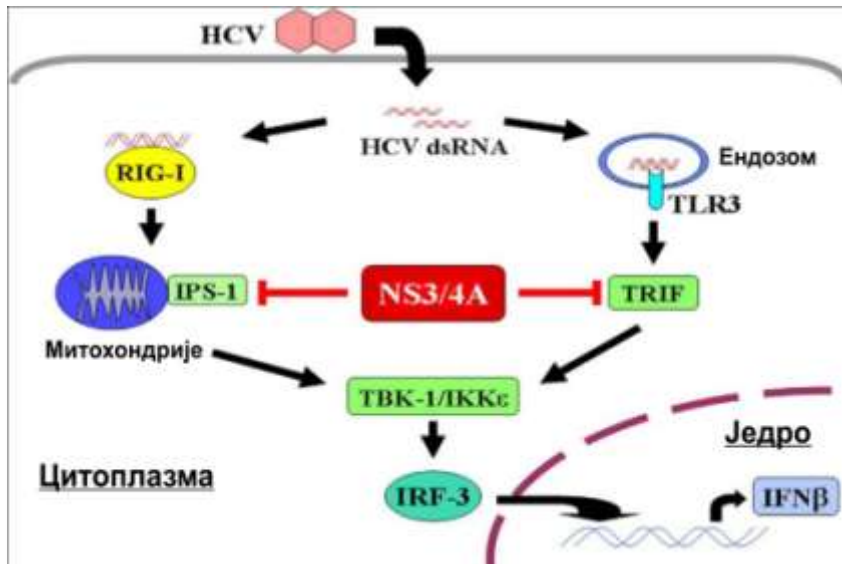
## **1.4 Имуни одговор у хроничној HCV инфекцији**

### **1.4.1 Механизми избегавања имунског одговора**

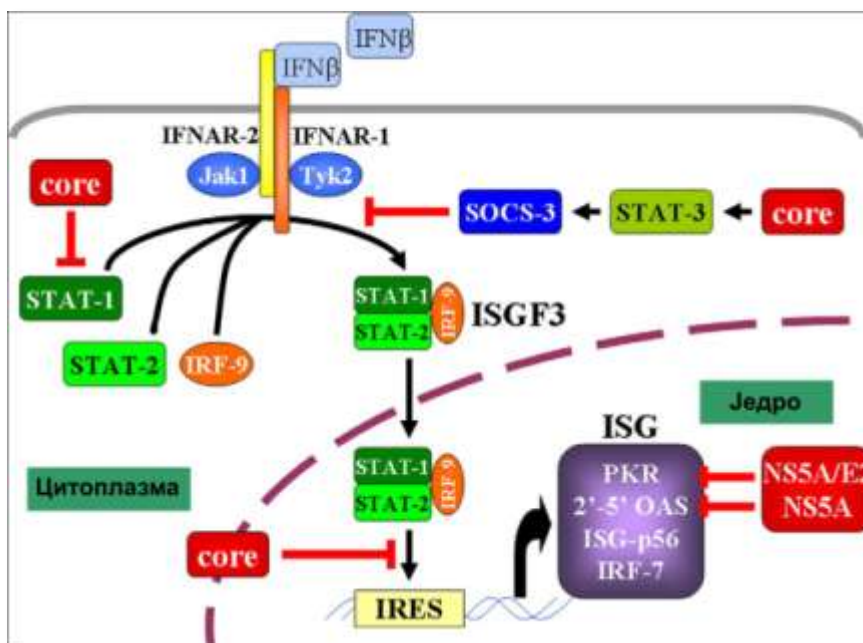
Пацијенти са хроничном HCV инфекцијом, генерално показују слаб периферни Т ћелијски одговор против HCV, што је недовољно да се искорени вирус (125). HCV вирус је развио софистициране механизме за избегавање имунског одговора домаћина. Вирусна NS3/4A протеаза блокира активацију вирусом индукованог интерферон



регуляторног фактора 3 (IRF-3 од енг. *Interferon Regulatory Factor 3*) одговорног за продукцију IFN- $\beta$ . Такође инхибира TLR3 (од енг. *Toll-Like Receptor 3*) сигнале цепањем TRIF (од енг. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) протеина (Слика 1.8.).



**Слика 1.8.** HCV RНК индукује активацију IRF3 и продукцију интерферона. HCV NS3/4A протеаза блокира два пута продукције IRF3 цепањем IPS-1 и TRIF-а. Извор: Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clinical immunology* 2008; 128: 133-47.



**Слика 1.9.** Инхибиторни учинак HCV вируса на експресију вирусом стимулираних гена. HCV core протеин инхибира JAK/STAT пут активације, NS5A инхибира активацију PKR и 2'-5' OAS, E2 инхибира активацију PKR. Извор: Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clinical immunology* 2008; 128: 133-47.

Створени IFN- $\beta$  активира експресију бројних интерфероном стимулираних гена (ISG од енгл. *Interferon Stimulated Genes*) путем Јак/STAT сигналног пута. HCV core протеин инхибира активацију STAT-1 и функцију интерфероном стимулираног генског фактора 3 (ISGF3 од енгл. *Interferon-Stimulated Gene Factor 3*). NS5A смањује активацију PKR и индукује стварање IL-8 који инхибира активност интерферона (91, 92) (Слика 1.9.).

#### 1.4.2 Исцрпљеност имунског одговора/анергија

Неуспех Т ћелијског одговора у заустављању HCV инфекције лежи у чињеници да је то или због дисфункције DC, или због високог нивоа HCV репликације која надмашује имунске могућности домаћина. Код болесника који нису успели елиминисати HCV вирус примећене су ниже вредности CD4+ Т лимфоцита у раној инфекцији, док су у хроничној инфекцији CD8+ Т лимфоцити били функционално слабији, у смислу мање продукције интерферона у неким, али не у свим студијама (126, 127).

Неке студије упућују на лиганд протеина програмиране ћелијске смрти (PD-L1 од енгл. *Programmed cell Death ligand 1*) супресијски пут, који има инхибиторни ефекат на CD8+ Т лимфоците и стимулисан је у особа с хроничном HCV инфекцијом а чија блокада враћа ефекторске механизме CD8+ Т ћелија (128-130).

#### 1.4.3 Брзина вирусне репликације

HCV успешно избегава механизме неспецифичне имуности (NK, антивирусни цитокини) током ране фазе акутне инфекције, и активно се репликује у јетри (187). Вирусна репликација се наставља, а новонастали вириони се ослобађају у циркулацију. Број копија HCV RNK у серуму болесника врло се брзо повећава након инфекције. Висока виремија је карактеристична за првих 10-12 недеља од почетка инфекције (више од  $10^6$  копија HCV RNK по милилитру серума). HCV вирус има врло велику брзину репликације,  $10^{12}$  вирусног генома дневно чак и у хроничној фази инфекције (131), уз појаву мутације  $1,5-2,0 \times 10^3$  базних супституција по геному, по месту, по години и то због карактеристика своје RNK полимеразе. Тако створене варијанте вируса имају потенцијал да избегну имунско препознавање. Секвенцијске мутације могу смањити везање МНС молекула и HCV епитопа и смањити препознавање Т ћелијског рецептора (TCR од енгл. *T cell receptor*) (132).

#### 1.4.4 Т регулаторне ћелије

Имунски систем има развијене механизме одржавања хомеостазе, региструје сваку промену која нарушава равнотежно стање и тежи да то стање поврати. Кључну улогу у процесима регулације и модулације имунских одговора имају Т регулаторни лимфоцити (105). Мада се одавно указивало на то да посебна ћелијска популација има улогу у контроли аутоиминских процеса, тек је Sakaguchi 1995. године описао Т регулаторне лимфоците као посебан субсет периферних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који коекспремира CD25 молекула (алфа ланац рецептора за IL-2, IL-2R) и има кључну улогу у контроли аутореактивних Т лимфоцита (105, 133). Природни CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg лимфоцити су посебна ћелијска линија која настаје у тимусу и има програмирани развој (134-136).

За настајање CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg фенотипа неопходне су интеракције високог афинитета између МНС класе II и аутоантигена, али се сматра да је потребно и континуирано присуство тог антигена у високој концентрацији. За њихов развој и опстанак неопходно је и присуство IL-2, TGF- $\beta$ , сигнали са CD28, CTLA-4 CD40, а најзначајније је присуство Foxp3 молекула. Foxp3 је транскрипциони фактор који припада forkhead фамилији, има 11 егзона, на С терминалном крају има forkhead домен којим се везује за DNK који се директно или у комплексу са NFAT везује за IL-2 промотор и инхибира транскрипцију IL-2. Истраживања су показала да је повећани афинитет TCR-антиген интеракција у тимусу, главни регулатор експресије Foxp3 (137-141).

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ћелије су дефинисане као подскуп CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, које испољавају CD25 молекула на површини ћелије (142, 143).

Иако се CD25 маркер највише користи да означи CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ћелије (137, 139) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> фенотип није специфичан Treg ћелијски маркер.

Тренутно недвосмислени показатељ идентификације CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ћелија је транскрипциони фактор Foxp3 (138). Супресија коју изазивају CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg индуковане HCV вирусом може снизити имунски одговор Т ћелија у раним фазама инфекције и тако онемогућити отклањање вируса, али се тиме може смањити и запаљенски инфилтрат у јетри и спречити масивно оштећење ткива (143). Извесне студије показују да CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ћелије из периферне крви код HCV-инфицираних пацијената потискују HCV-специфичну Т ћелијску пролиферацију и производњу IFN- $\gamma$ .

Treg ћелије у хроничној HCV инфекцији утичу на одржавање хроничитета, подржавајући толеранцију антигена и лимитирајући потенцијално штетне имунолошке одговоре (143). CD4+Foxp3+ Treg могу сузбити ефекторски имунски одговор вирус специфичних CD8+ Т ћелија, као и целуларну пролиферацију (138, 139).

Повећане вредности CD4+Foxp3+ Treg ћелија пронађене су у болесника с хроничном HCV инфекцијом, док је смањење њиховог броја у корелацији са повећаном продукцијом инфламаторних цитокина у првом реду IFN- $\gamma$  и пролиферацијом HCV специфичних CD8+Т лимфоцита (137, 138, 141, 144). Повећан броја CD4+ Foxp3+ Treg ћелија у јетри блиско је повезан и са степеном оштећења хепатоцита: пораст у броју ових ћелија повезан је са мањим оштећењем, а смањен број CD4+Foxp3+ Treg ћелија повезан је са већом некрозом хепатоцита (224). CD4+Foxp3+ Treg ћелије штите хепатоците инхибицијом ефекторских Т ћелија, директним контактом са овим ћелијама (144). У току HCV инфекције имунски одговор лоциран је углавном у јетрином паренхиму, тако да је однос интрахепаталних HCV специфичних CD4+ Т и CD8+ Т ћелија у односу на серум 100:1 или више. У окупљању тих ћелија у јетри значајну улогу имају IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  и моноцитни хемоатрактант протеин 1 (MCP-1 од енгл. *Monocyte Chemoattractant Protein 1*), којег продукују макрофаги и који доводи до регрутације других макрофага, а такође и NK ћелија у то подручје. NK ћелије продукују IFN- $\gamma$  који индукује продукцију хемокина CXCL9 и CXCL10. Болесници са супримованом ћелијском имуносношћу имају убрзан ток HCV инфекције, и могу развити цирозу много пре (146). Ниво HCV специфичног CD4+ Т ћелијског одговора одређује ниво прогресије у хроничну болест јетре и обрнуто је пропорционалан са нивоом јетриног оштећења (230). Према томе он има протективну улогу иако не обезбеђује потпуну превенцију болести (146). С друге стране улога HCV специфичних CD8+ Т указују да су оне медијатор јетриног оштећења, док неке њихове субпопулације могу бити повезане са инхибицијом запаљења преко IL-10 или TGF- $\beta$ . Запаљенски инфилтрати у хроничној HCV инфекцији састоје се од великог броја Т ћелија које нису специфичне за HCV и њихова активација може бити критична за запаљенску активност (138, 147, 148). Код пацијената са HCV инфекцијом запажена је обимна лимфоцитна инфилтрација јетре CD4+Foxp3+ Treg ћелијама, у односу на јетру здравих људи (149). Ове интрахепатичне CD4+Foxp3+ Treg ћелије код пацијената у различитим стадијумима болести јетре показују потпуно диферентовани и високо активирани фенотип, и били су бројнији у HCV инфекцијама јетре са благом фиброзом, сугеришући важну улогу

интрахепатичних CD4+Foxp3+ Treg ћелија у току хроничне HCV инфекције. Код пацијената хронично заражених HCV, постоји велики број Т лимфоцита са високим процентом CD4+Foxp3+ Treg, и они су присутни првенствено у области порталног крвотока (150). Ове ћелије играју кључну улогу у одржавању равнотеже између спречавања имунопатолошког оштећења и омогућавања имунског одговора са отклањањем инфекције (135). Овај ћелијски подскуп представља 5-10% периферних CD4+ Т лимфоцита у људи (151, 152). Значајну улогу у регулисању функционисања CD4+Foxp3+ Treg ћелија игра Протеин програмиране ћелијске смрти (PD-1 од енгл. *Programmed cell Death protein 1*). Протеин програмиране ћелијске смрти је протеин који је код људи кодиран PDCD1 геном. PD-1 има два лиганда, PD-L1 и PD-L2, који су чланови B7 фамилије. (153-156). PD-L1 код пацијената са хроничном HCV инфекцијом регулише активност CD4+Foxp3+ Treg ћелија, ограничавајући STAT-5 фосфорилацију (157).

Релативно нижа експанзија интрахепатичних CD4+Foxp3+ Treg, повезана је са негативном регулацијом од стране PD-1. Имајући ово у виду, блокада интеракција између PD-1 и његовог лиганда PD-L1, *in vitro*, појачава експанзију, пролиферацију и функцију CD4+Foxp3+ Treg изолованих из јетре болесника са хроничном HCV инфекцијом. Регулација равнотеже, између сузбијања и експанзије CD4+Foxp3+ Treg од стране PD-1, може довести до финог подешавања нивоа CD4+Foxp3+ Treg ћелија, а све у циљу минимизирања штетних имунских одговора али без потпуног искључивања оних намењених за ограничавање прекомерног вирусног ширења (157).

#### **1.4.5 Цитокини и цитокински рецептори у HCV инфекцији**

Цитокини су протеини које секретују ћелије урођеног и стеченог имунитета и посредују у многим функцијама ових ћелија. Цитокини су полипептиди продуковани у одговору на микроорганизме и друге агенсе, а посредују и регулишу имунске и инфламаторне реакције. Цитокини имају врло важну улогу у имунопатогенези хроничне HCV инфекције, а утичу и на ниво оштећења јетре. Већина литературних података о цитокинима у хроничној HCV инфекцији заснива се на анализи Th1 и Th2 цитокинског профила као и IFN-индуцибилним цитокинима у односу на HCV виремију, активност јетриних ензима и исход антивирусне терапије (158-160).

Цитокини су кључни за елиминацију вируса, али њихова неадекватна експресије у HCV инфекцији може довести до оштећења јетриног ткива и перзистирања запаљења.

Цитокини делују у физиолошким и патолошким стањима и неки имају хомеостатско деловање у смислу одржавања одговарајућег имунолошког миљеа, док су инфламаторни цитокини резултати сигнализирња у запаљенским и инфективних стањима. Експресија цитокина у јетри је у корелацији са вредностима у периферној крви (161-163).

Осим привлачења имунских ћелија, цитокини делују у њиховој активацији, пролиферацији, диференцијацији и апоптози. Такође имају улогу у ангиогенези, развоју тумора и процесу регенерације ткива након оштећења (163, 164).

Вирусима подстакнута синтеза цитокина има важну улогу у регрутовању и активацији имунолошких ефектора на место запаљенске реакције у ткивима, па цитокине сматрамо кључним медијаторима антивирусне локалне али и системске имуности (255).

#### **1.4.6 Интерлеукин 12 (IL-12)**

Интерлеукин 12 (IL-12) је главни медијатор раног природног имунског одговора на интрацелуларне микроорганизме. Он је активатор цитолитичке функције NK ћелија, али их, као и T ћелије, стимулише да продукују IFN- $\alpha$ . Антигеном стимулисане Th ћелије индукују продукцију IL-12 у макрофагима и DC (166-168).

Интерлеукин 12 је хетеродимерни цитокин кодиран са два посебна гена, IL-12A (p35) и IL-12B (p40). IL-12 се везује за IL-12 рецептор, који је хетеродимерски и формира се од IL-12R- $\beta$ 1 и IL-12R- $\beta$ 2. За IL-12R- $\beta$ 2 се сматра да игра кључну улогу у функцији IL-12, пошто је нађен на активираним T ћелијама, стимулисан је цитокинима који промовишу развој Th1 ћелијског субсета, а инхибиран онима који промовишу развој Th2 ћелијског субсета. Након везивања, IL-12R- $\beta$ 2 подлеже тирозин фосфорилацији и ствара места за везивање Tyk2 и Jak2 киназа. Ове киназе су важне за активацију критичних транскрипционих фактора као што је STAT4. Овај пут је познат као JAK-STAT сигнални пут (168). IL-12 је фактор диференцијације за Th1 субпопулацију. Секретовани IL-12 делује и на NK ћелије које под његовим дејством продукују IFN- $\gamma$ . Синергистичким дејством IL-12 и IFN- $\gamma$  настаје поларизација ка Th1 путу (112). Главни биолошки ефекат IL-12 је стимулација продукције IFN- $\gamma$  у T или NK ћелијама, уз следствену активацију макрофагне микробицидне активности. Даљи ефекти IL-12 подразумевају стимулацију диференцијације CD4<sup>+</sup> T лимфоцита у правцу Th1 субсета, и појачавање цитолитичке функције NK ћелија и CD8<sup>+</sup> лимфоцита. Један

број студија показује да је један од механизма избегавања имунолошког одговора домаћина, управо блокирање активности IL-12 (169).

#### **1.4.7 Интерферон-гама (IFN- $\gamma$ )**

Интерферон-гама (IFN- $\gamma$ ) је „тип” I про-инфламаторни димеризовани цитокин кога продукују CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити, NK, NKT ћелије (170, 171). Овај интерферон се оригинално звао активациони фактор макрофага, што је термин који се у данашње време користи за описивање веће фамилије протеина којој припада и IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  је изузетан цитокин који, контролом великог броја гена, оркестрира многе различите ћелијске програме (172). IFN- $\gamma$  активира макрофаге, CTL, NK ћелије, утиче на промену класе антитела (IgM у IgG), стимулише продукцију IgG антитела и игра важну улогу у апоптози. IFN- $\gamma$  индукује поларизацију имунског одговора ка Th1 одговору, обзиром да утиче на диференцијацију Th0 у Th1 ћелије (173).

Са друге стране IFN- $\gamma$  супримира продукцију „тип” II цитокина IL-4 и IL-10, чиме спречава поларизацију имунског одговора ка Th2 одговору (173). IFN- $\gamma$  мономер се састоји од основе са шест  $\alpha$ -хеликса и проширене не-савијене секвенце у C-терминалном региону (174-176). IFN- $\gamma$ , или тип I интерферон, је цитокин који је критичан за урођени и адаптивни имунитет против виралних и интрацелуларних бактеријских инфекција као и за контролу тумора. Поремећена IFN- $\gamma$  експресија је повезана са више аутоинфламаторних и аутоимунских болести (176). Значај IFN- $\gamma$  у имунском систему потиче делом од његове способности да директно инхибира виралну репликацију, али што је још важније, од његових имуностимулаторних и имуномодулаторних ефеката. IFN- $\gamma$  продукују NK и NKT ћелије, представници урођеног имунског одговора али и CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити, представници стеченог имунског одговора (173, 177). Ћелијски одговори на IFN- $\gamma$  су активирани путем његове интеракције са хетеро-димерским рецептором који се састоји од интерферон гама рецептора 1 (IFNGR1) и интерферон гама рецептора 2 (IFNGR2). Везивање IFN- $\gamma$  за свој рецептор активира JAK-STAT сигнални пут. IFN- $\gamma$  се такође везује за GAGN и хепаран сулфате на ћелијској површини. Међутим, у контрасту са многим другим хепаран сулфат везујућим протеинима, где везивање промовише биолошку активност, везивање IFN- $\gamma$  инхибира његову биолошку активност (178). IFN- $\gamma$  главни је медијатор активације макрофага. Главни ћелијски извори овог цитокина су Th1 лимфоцити, NK ћелије CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцити. Главни ефекти су: Активација макрофага, појачавање

експресије МНС молекула I и II класе, појачава експресију костимулатора на APC, индукује диференцијацију ка Th1 субсету лимфоцита, активација NK ћелија. (173).

#### **1.4.8 Интерлеукин 17 (IL-17)**

Интерлеукин 17 (IL-17, или IL-17A) је оснивачки члан групе цитокина познатих као IL-17 фамилија и један је од главних медијатора урођене и стечене имуности (179-181). Поред IL-17A, чланови IL-17 фамилије су IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E и IL-17F. Сви чланови IL-17 фамилије имају сличну протеинску структуру. Ови цитокини су високо конзервирани код сисара, са чак 62–88% аминокиселина конзервираних између људског и мишјег хомолога (182). Ипак међу њима функционално су најсличнији IL-17A и IL-17F. Они су продукт активираних CD4+, CD8+ Т ћелија, CD3+CD4-CD8-Т ћелија,  $\gamma\delta$  Т ћелија и неутрофила (179).

Најзначајнија улога IL-17 је његово учешће у подстицању и посредовању проинфламаторног одговора јер индукује секрецију IL-6 и IL-8 у макрофагима, фибробластима и кератиноцитима (183-185). вероватно кључну улогу у активацији мијелоидних ћелија и Т лимфоцита и регулацији секреције IL-17 (186). Током хепатитиса мијелоидни STAT 3 супримира STAT 1 сигнални пут, превенира продукцију IL-2 и IL-27 у макрофагима и дендритским ћелијама и смањује продукцију IFN- $\gamma$  у CD4+ Т лимфоцитима, чиме спречава диференцијацију Th0 у Th1 ћелије. Уз то STAT3 подстиче секрецију IL-17 у CD4+ Th17 лимфоцитима, а активација STAT3 сигналног пута у хепатоцитима делује превентивно и штити хепатоците од IFN- $\gamma$  /STAT1 посредованог оштећења (186).

Недавно је установљено да тимус специфични нуклеарни рецептор, ROR- $\gamma$ , усмерава диференцијацију Th17 ћелија (187).

#### **1.4.9 Интерлеукин 2 (IL-2)**

Интерлеукин 2 (IL-2) је интерлеукин кога секретују лимфоцити и делује претежно као фактор раста Т лимфоцита. IL-2 активира и друге ћелије одбрамбеног система. Првобитни назив му је био фактор раста Т лимфоцита, јер изазива полиферацију и диференцијацију Т лимфоцита укључених у одбрамбену реакцију. Пошто делује на саме ћелије које га луче, поседије аутокрино дејство. Луче га претежно помагачки CD4+ Т лимфоцити, делимично и цитотоксични CD8+ Т лимфоцити. (188). Интерлеукин 2 остварује дејство везивањем за ћелијске рецепторе. Рецепторе за овај



интерлеукин поседују Т лимфоцити и у мањој мери В лимфоцити и NK ћелије. IL-2 делује претежно на Т лимфоците, али само на оне који учествују у имунском одговору тј. које су активирани антигеном. Рецептор за IL-2 изграђен је из 3 подјединице:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Код неактивних Т лимфоцита је активност  $\alpha$  подјединице ниска, док је код активираних после контакта са антигеном активност ове подјединице већа, тако да ови активирани лимфоцити могу да реагују на IL-2. Услед његовог дејства долази до пролиферације и диференцијације ових лимфоцита. Везивање IL-2 изазиве веома сложене процесе у лимфоцитима које доводе до фосфорилације протеина који преводe лимфоците из G1 у S фазу ћелијског циклуса тј. покрећу процес ћелијске деобе. Такође смањује се и концентрација фактора који инхибишу ћелијски циклус нпр. p27, а повећава концентрација фактора који спречавају апоптозу и продужавају преживљавање лимфоцита нпр. Bcl-2. Запажено је и да дуготрајна активација Т лимфоцита овим фактором раста може имати и супротан ефекат, када може довести до њихове програмиране ћелијске смрти. IL-2 делује такође на NK ћелије, које активира и на В лимфоците, код којих повећава стварање антитела и делује као фактор раста. IL-2 подстиче и стварање других интерлеукина као нпр. IL-4 (189). IL-2 је локализован у цитоплазми хепатоцита што је потврђено хибридоцитохемијом. На ултраструктурном нивоу, IL-2 је присутан углавном у ER и митохондријама (190).

IL-2 је цитокин који припада „типу” I про-инфламаторних цитокина и у току HCV инфекције промовише пролиферацију Т ћелија у Th1 правцу (189). У току HCV инфекције долази до повећања његовог нивоа у јетри (190).

#### **1.4.10 Интерлеукин 10 (IL-10)**

Интерлеукин 10 (IL-10) је антиинфламаторни цитокин. Код људи IL-10 је кодиран IL10 геном (191,192).

У највећој мери IL-10 се синтетише у јетри где га продукују макрофаги, Купферове ћелије, Т и В лимфоцити и хепатоцити (192). Он умањује експресију Th1 цитокина, MHC молекула II класе и костимулаторних молекула на макрофагама. Он увећава преживљавање В ћелија, њихову пролиферацију, и продукцију антитела. Има способност инхибиције синтезе проинфламаторних цитокина као што су IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$  и GM-CSF које стварају ћелије попут макрофага и Th1 помагачких ћелија. IL-10 исто тако манифестује потентну способност да супримира антиген презентациону

способност антиген презентујућих ћелија (188). Поред превентивног дејства IL-10 има и кључну улогу у индукцији имунолошке толеранције (193).

Примењен у лечењу HCV-а, IL-10 је показао задовољавајуће резултате, како у погледу смањења серумског AST, тако и нивоа фиброзе јетриног ткива. IL-10 је довео до смањења HCV специфичних CD4+, CD8+ и IFN- $\gamma$  секретујућих Т ћелија али и до измене у производњи цитокина ка Th2 профилу. Упоредо са овим резултатима, забележено је и повећања вирусне HCV RNK. (194).

#### **1.4.11 Интерлеукин 9 (IL-9)**

Интерлеукин 9 (IL-9) је цитокин који делује као регулатор низа хематопоетских ћелија. Овај цитокин производе Т-ћелије, а посебно CD4+ помагачке ћелије. IL-9 стимулише ћелијску пролиферацију и спречава апоптозу (195-197). Своје ефекте испољава преко интерлеукин 9 рецептора (IL9R), који активира различите протеине за пренос сигнала и активаторе (STAT). Тиме се овај цитокин повезује са различитим биолошким процесима (195). Доказано је да Интерлеукин-9 има различите ефекте на различитим типовима ћелија. Ови ефекти укључују активирање маст ћелије да луче неколико производа, укључујући IL-13, који испољава своје ефекте на епителним ћелијама плућа и црева. Поред тога, изгледа да IL-9 има директан утицај на регулаторне Т и Th17 ћелије (195).

#### **1.4.12 Интерлеукин 22 (IL-22)**

Интерлеукин 22 (IL-22) је члан групе цитокина која се зове IL-10 фамилија или IL-10 суперфамилија (укључујући IL-19, IL-20, IL-24, и IL-26) (197). IL-22 иницира урођени имунски одговор против бактеријских патогена посебно у епителним ћелијама као што су респираторне и епителијалне ћелије дигестивног система (198), а може бити произведен и од стране Th17 ћелија. Он вероватно игра улогу у координираном одговору оба, адаптивног и урођеног имунског система. Своје биолошке ефекте испољава посредством IL-22 рецептора. Активација овог рецептора доводи до активирања различитих ћелијских сигналних путева, (JAK/STAT и MAPK). IL-22, као Th1 цитокин, игра важну улогу запаљенским процесима и процесима зарастања рана (196, 197).

#### **1.4.13 Интерлеукин 6 (IL-6)**

Интерлеукин 6 (IL-6) је интерлеукин који може да дејствује као проинфламаторни и антиинфламаторни цитокин. Он се излучује из Т ћелија и макрофага. Овај цитокин иницира имунски одговор на трауму, посебно опекотине и друга оштећења ткива које доводе до инфламације. Улога IL-6 цитокина као антиинфламаторног агента је посредована путем његових инхибиторних ефеката на TNF- $\alpha$  и IL-1, и активацију IL-10 (188).

IL-6 своје ефекте испољава преко рецептора на ћелијској површини. Рецептор IL-6 је тип I цитокински рецепторски комплекс који се састоји од лиганд-везујућег IL - 6R $\alpha$  ланца (CD126), и сигнал-преносеће компоненте gp130 (познате као CD130). CD130 је заједнички сигнални преносилац за неколико цитокина међу којима су Инхибиторни фактор леукемије (LIF), цилијарни неуротрофни фактор, онкостатин М, IL-11 и кардиотрофин 1, и он је скоро свеprisутно изражен у већини ткива, док је експресија CD126 ограничена на одређена ткива. Интеракција IL-6 са његовим рецептором, подстиче gp130 и IL-6R протеине да формирају комплекс, чиме се активира рецептор. Ови комплекси приближавају интрацелуларне gp130 регионе чиме се иницира каскада преноса сигнала кроз одређене транскрипционе факторе, Јанус киназе (JAKs) и STAT факторе (199).

#### **1.4.14 Интерлеукин 13 (IL-13)**

Интерлеукин 13 (IL-13) је цитокин који луче многи типови ћелија, а посебно Th2 ћелије (200), које су важан медијатор алергијске инфламације и болести (188). Поред ефекта на имунске ћелије који су слични онима од блиско сродног цитокина IL-4, IL-13 је (што је важније) имплициран као централни медијатор физиолошких промена индукованих алергијском инфламацијом многих ткива. IL-13 производи своје ефекте путем рецептора који се састоји од више подјединица: алфа ланац IL-4 рецептора (IL-4R $\alpha$ ), и најмање једног од два позната IL-13-специфична везујућа ланца. Већина IL-13 биолошких ефеката, попут IL-4 ефеката, су везане за један транскрипциони фактор, претварач сигнала и активатор транскрипције (STAT6) (200).

#### **1.4.15 Интерлеукин 4 (IL-4)**

Интерлеукин 4 (IL-4) је главни стимулатор диференцијације CD4<sup>+</sup> лимфоцита у Th2 субпопулацију (201). IL-4 је интерлеукин кога луче помагачки Th2 лимфоцити и

делује на В лимфоците, мастоците, базофиле као и на Th2 помагачке лимфоците (који га и производе) Дејства овог интерлеукина на ћелије одбрамбеног система су супротна дејству INF- $\gamma$ , који појачава функцију макрофага и целуларног имунитета. На тај начин IL-4 подстиче хуморални, а инхибира целуларни тип имунског одговора (188).

Изазива пролиферацију В лимфоцита (првобитно је назван фактор раста В лимфоцита), индукује синтезу антитела Е класе, диферентовање Т лимфоцита у правцу помагачких Th2 лимфоцита. Интерлеукин 4 делује тако што се везује за мембранске рецепторе лимфоцита (и других ћелија). Везивањем IL-4 за поменуте рецепторе Т лимфоцита активира се STAT 6 сигнални пут који изазива диференцијацију лимфоцита у помагачке Th2 лимфоците. IL-4 такође активира и други сигнални пут - супстрат који одговара на инсулин (енг. insulin response substrate-IRS2), што доводи до пролиферације (размножавања) лимфоцита. Интерлеукин 4 такође изазива производњу имуноглобулина Е код В лимфоцита, који има улогу у борби против паразитарних инфекција, али и у настанку алергијских реакција (I тип хиперсензибилности) (188).

#### **1.4.16 Интерлеукин 5 (IL-5)**

Интерлеукин 5 (IL-5) је интерлеукин кога луче помагачки Th2 лимфоцити и мастоцити. Делује на еозинофилне леукоците и изазива сазревање и диференцијацију незрелих и активацију „зрелих“ еозинофилних леукоцита. Дејства IL-5 усклађена су са дејством IL-4, кога такође луче помагачки Th2 лимфоцити. IL-4 и IL-5 индукују стварање антитела класе Е из В лимфоцита, која су битна за одбрану од паразитарних инфекција, али и за настанак неких алергијских реакција. Ова антитела се везују за антигене на површини паразита, а својим другим крајем за еозинофилне леукоцита (који се акумулирају под дејством IL-5), што доводи до активације еозинофила и елиминације паразита. Под утицајем IL-5 долази и до активације В-лимфоцита, као и стварања антитела класе А (188).

#### **1.4.17 Фактор некрозе тумора (TNF alpha)**

TNF alpha или фактор некрозе тумора (од енгл. *Tumor Necrosis factor*), откривен је као цитокин који је важан у индукцији хеморагијске некрозе тумора, па отуда и његов назив (202). TNF alpha је цитокин кога продукују макрофаги, лимфоцити, мастоцити, ендотелне ћелије и фибробласти (203), и независно од типа ћелија које га продукују има про-инфламаторно дејство (204). На мембрани ћелија присутан је као трансмембрански

протеин али постоји и секретована тро-компонентна форма овог цитокина. Своје дејство остварује посредством рецептора за TNF- $\alpha$ : TNF рецептор 1 (TNF R1, p55), и TNF рецептор 2 (TNF R2, p75), који су присутни на готово свим ћелијама у организму (202). TNF alpha има значајну улогу у многим биолошким процесима: он индукује снажан ћелијски имунски одговор, утиче на пролиферацију лимфоцита, затим стимулише продукцију медијатора запаљења и игра значајну улогу у апоптози (204).

TNF alpha у јетри, игра значајну улогу у патогенези вирусног хепатитиса, масне јетре, цирози јетре али је укључен и у репаративним процесима у јетри: индукује пролиферацију хепатоцита и помаже регенерацију оштећене јетре (204). Велики број студија показују да пораст TNF alpha у крви, као и повећана *in situ* експресија и активација TNF рецептора, корелирају са оштећењем хепатоцита у акутним и хроничним болестима јетре (204).

#### **1.4.18 Интерлеукин 1 бета (IL-1 $\beta$ )**

Интерлеукин 1 породица је групе од 11 цитокина, који играју веома значајну улогу у регулацији имунског и запаљенског одговора у току инфекција. IL-1 $\beta$  је про-инфламатори цитокин и продукују га многе ћелије, укључујући макрофаге, моноците, NK ћелије и неутрофили. IL-1 $\beta$  игра важну улогу у великом броју хроничних и акутних запаљенских болести (184). (202).

Антивирусно дејство у HCV инфекцији, IL-1 $\beta$  показује тако што инхибира репликацију RNK HCV (205). Неке студије показују да је продукција IL-1 бета смањена у пацијената са хроничним хепатитисом C (205).

### **1.5 Клинички знаци хепатитис Ц инфекције**

Оптимални приступ откривању HCV инфекције је скрининг лица са историјом ризика од изложености вирусу, као и тестирање одабраних појединца који имају идентификовани фактор ризика (206). Могућност хроничног хепатитиса Ц треба размотрити код болесника са знацима и биолошким симптомима хроничног обољења јетре, повезаног са анамнестичким подацима “великих” или “малих” фактора ризика за HCV инфекцију. Велики фактори ризика су трансфузије крви пре 1990 или подаци из прошлости о интравенској употреби дрога. Мали фактори ризика везани су за мање очигледне парентралне или перкутане контакте са зараженом крви. Средњи период

инкубације код хепатитис Ц инфекције је 6 до 12 недеља. Међутим, са великом инокулацијом, као што је у случајевима после примене фактора VIII, период инкубације се своди на 4 недеље или мање (207-209).

Хепатитис Ц вирус изазива и акутни и хронични хепатитис. Међутим, типичан акутни хепатитис Ц се ретко среће у општој пракси, јер је болест готово асимптоматска. Акутни ток HCV инфекције је клинички благ, а максимални пикови серумске ALT су мање од оних који се налазе код акутног хепатитиса А или В. Само 25% случајева су праћене иктеричним променама. Субклиничка болест је честа, такви пацијенти се могу јавити након прве деценије са последицама као што су цироза или хепатоцелуларни карцином. Током ране клиничке фазе ниво серумског ALT може осциловати и може постати нормалан или близу нормалног, што отежава одређивање правог опоравка (210). У хроничним хепатитису Ц, 50% пацијената је без симптома а многи се само жале на необјашњив замор. Пошто су симптоми или непостојећи или су сувише неодређени, дешава се да се пацијенти јаве лекару тек када се развије озбиљна болест јетре. Физикални преглед може проћи неупадљиво, увећана јетра се назире само у 25 одсто пацијената (211).

Удружене манифестације повезане са имунским комплексима (нпр. уртикарија, пурпура, осип коже, артралгија) се могу видети код муњевиног хепатитиса или субакутног хепатитиса што је реткост током акутне примарне HCV инфекције. Хронични хепатитис Ц класично је претстављен перзистентно повишеним нивоом ALT, најмање 6 месеци. Хронични хепатитис Ц обично се открива случајно, као последица спровођена анти-HCV антитела скрининга даваоца крви, или у контексту општег здравственог (систематског) прегледа или током других медицинских прегледа који у себи укључују и испитивање функције јетре. Присутни симптоми у себи могу садржати и: продужено грипозно стање, малаксалост, мијалгију, анорексију, мучнину, грозницу или болове у мишићима и зглобовима и бол у јетри (212).

## **1.6 Преношење и фактори ризика HCV**

Прецизан начин преноса хепатитиса Ц је често неизвестан, али је са сигурношћу потврђено да се преноси парентералним путем (209). Интравенско узимање дроге је примарни начин преноса HCV у САД, тако да сва лица која користе или су користила нелегалне супстанције у садашњости или прошлости, чак и ако је то било само једном,

као и интраназални наркомани који деле прибор, треба да се тестирају на HCV инфекцију (206, 213-215).

Фактори ризика су и старост, мушки пол, трансфузије крви, инвазивни медицински поступци (хирургија, катетеризације, ендоскопије и дијализа). Парентерална траса преноса HCV је одговорна за скоро две трећине случајева оболевања од хепатитиса Ц и представља најчешће признат и најбољи окарактерисан трансмисиони механизам HCV (215, 216).

Пре спровођења обавезног анти-HCV скрининга у 1990 постојао је широк спектар трансфузиолошки-повезаних инцидената оболевања од вирусног хепатитиса Ц. Скрининг давалаца крви за анти-HCV је допринео искорењивању овог начина трансмисије, тако да се трансфузија крви више не сматра примарним фактором ризика за HCV инфекције. Такође, пресађивањем органа реципиенти су изложени ризику за добијање HCV инфекције. (215, 216). Друге студије као могуће факторе ризика помињу тетовитање и пирсинг. Ризични групу представљају и особе са хемофилијом које су примиле крв или производе крви пре 1990. Након тог времена примењивани су поступци инактивације вируса (217). Једна од индикација за HCV тестирање је и појава необјашњиво високих вредности аминотрансфераза (аланин и/или аспартат аминотрансфераза, ALT/AST), затим пацијенти на хемодијализи, деца рођена у HCV-инфицираних мајки, или оне са вирусом хумане имунодефицијенције (HIV) треба тестирати на присуство HCV инфекције (218-220). Ране студије о вертикалној трансмисији, на бази откривања антитела нису успеле да пруже доказе о HCV преносу на новорођенчад, изузев за децу рођену од мајки са присутном HIV инфекцијом (220). Међутим остали извештаји су показали да чак и у одсуству HIV коинфекције, перинатални пренос HCV се јавља у 3% до 5% новорођенчади са мајки и да је ризик од преноса изгледа у корелацији са HCV-RNK нивоом код мајки. Могућност да дође до преноса је мала када је ниво HCV-RNK испод  $10^6$  геном еквивалент/ml. Један број студија указује да дојење не носи ризик од преноса (220). Остали потенцијални извори HCV преноса укључују излагање инфицираним партнеру или више сексуалних партнера (221-223).

Опасност од заразе постоји и код здравствених радника (контакт са HCV континираном крви и продуката од крви. Здравствени радници имају већу преваленцу за серопозитивношћу од даваоца крви. Чини се да су стоматолози у посебном ризику од HCV инфекције, где је серопозитивност пропорционално повезана

са бројем клијената, интравенских наркомана, бројем интервенција у оралној хирургији и година праксе. Дакле, преваленца HCV инфекције међу здравственим радницима повезана је на првом месту, са радом са ризичним групама и ризиком од могућности настанка случајних перкутаних повреда (215, 218, 223, 224).

## 1.7 Дијагноза HCV инфекције

Пацијенти долазе на дијагностику за хепатитис Ц, било зато што су даваоци крви који су били позитивни на скрининг тесту или зато што су са физичким тегобама са сумњом на хепатитис. Дијагноза се постиже процесом тестирања и физичког прегледа, или у случају асимптоматских донора чији су резултати теста потврдили високу вероватноћу HCV инфекције. Симптоми и повишене вредности јетриних ензима повећавају ову вероватноћу а биопсија јетре представља наставак дијагностике (225).

Дијагноза хепатитиса Ц поставља се у неколико корака:

1. На темељу пораста вредности аминотрансфераза у крви (AST и ALT), можемо посумњати на некроинфламаторни процес у јетри.
2. Доказивање антитела на HCV је први корак у специфичној дијагнози хепатитиса Ц. Позитиван налаз значи да је човек некада био у контакту с овим вирусом. Инфицирана особа може "победити" овај вирус и елиминисати га заувек из свог организма, али антитела могу доживотно остати присутна. Овај "сценарио" се дешава у 20% инфицираних.
3. Да бисмо знали да ли је инфицирана особа елиминисала вирус или се он још увек ствара, као у случају хроничног хепатитиса, потребно је направити тест којим доказујемо управо вирус HCV у крви. То је PCR тест (од енг. *Polymerase Chain Reaction*). PCR може бити квалитативан и тада се одређује има ли вируса у крви или нема. Квантитативан PCR је тест којим се одређује тачна количина вируса, а исказује се бројем копија у 1ml крви или интернационалним јединицама у 1ml крви (IU/ml).
4. Следећи корак у дијагнози је генотипизација којом се утврђује генотип HCV.



5. Ултразвук јетре показа ће нам постоје ли фокалне лезије које би могле указивати на развој карцинома јетре уколико хронични хепатитис траје довољно дуго и није се лечио.
6. Биопсија јетре показаће нам стадијум оштећења јетриног ткива узрокованог хепатитис Ц вирусом. Биопсија јетре је и даље метод избора за добијање јетриног паренхима и патохистолошку верификацију некроинфламаторне активности и стадијума фиброзе. У ту сврху се користе различити скоринг системи (METAVIR, Кнодел, Исак) (226-230).

Након акутне фазе која је обично субклиничка, спонтана резолуција HCV инфекције догађа се у само 20 % оболелих.

### **1.7.1 Лабораторијско Тестирање**

Дијагностика хепатитиса Ц се спроводи детекцијом анти-HCV антитела, детекцијом HCV-RНК и детекцијом антигена HCV. Ови тестови немају никакву улогу у процени тежине болести или прогнозе (231, 232).

### **1.7.2 Серолошки тестови**

Антитела усмерена на различите антигене HCV, углавном су увек присутна у хроничној HCV инфекцији. Само у малом броју болесника (5-10%), најчешће имунокомпромитованих, не стварају се детектабилни нивои антитела или је њихова продукција успорена (343). Анти-HCV антитела се могу најраније детектовати (6-8 недеља) тестовима треће генерације имуноензимских тестова (EIA од енг. *Enzyme Immunoassay*) (235-237).

У серуму болесника прво се појављују антитела усмерена на NS3 регион (anti-c33) и антиген нуклеокапсида (anti-c22), а после на NS4 регион и на E1 и E2 (346,347). Специфичност EIA тестова износи више од 99% (232, 237). Обзиром да су могући лажно позитивни резултати (232, 238-240), сваки позитиван налаз EIA теста потребно је потврдити тзв. потврдним тестовима. Најчешће употребљавани потврдни тестови за дијагностику HCV су western blot и imunoblot- (RIBA од енл. *recombinant immunoblot assay*) којима је могуће доказати специфична антитела на сваки поједини антиген HCV. Анализом њихове динамике, могуће је пратити њихову појаву у серуму, трајање и нестајање (235). Налаз анти-HCV антитела у серуму, доказ је контакта са HCV.

Међутим у око 20% болесника инфицираних са HCV долази до спонтане елиминације вируса, па налаз антитела на значи инфекцију, већ имунолошки контакт са HCV. За потврду инфекције неопходно је доказивање HCV-RNK (235).

### 1.7.3 Молекуларни тестови

Геном вируса (HCV-RNK) појављује се у крви рано током инфекције већ око 14. дана од уласка у организам. HCV-RNK је присутна у крви током акутне и хроничне инфекције и јасан је доказ HCV инфекције. За детекцију HCV-RNK најчешће се користи молекуларна метода која комбинује реверзну транскрипцију вирусне RNK и PCR (RT-PCR) (241). Молекуларним методама се може доказати акутна инфекција у време тзв. имунолошког прозора, тј. пре сероконверзије. Поред квалитативних тестова, постоје и квантитативни тестови којима се одређује количина HCV-RNK у серуму - тзв. вирусно оптерећење (од енг. "*viral load*") што је корисно за праћење резулата терапије. Граница осетљивости ових тестова износи 50 интернационалних јединица (IU) HCV-RNK /ml серума (241-243). Ниво HCV-RNK у акутној инфекцији показује осциловање од неколико стотина до неколико милиона IU/mL, а неки болесници имају чак интермитентно негативан PCR налаз. На основу ових флукуација може се разликовати акутна од хрониче HCV инфекције код које је ниво HCV-RNK стабилан и не мења се више од једног декадског логаритма (241). Године 1997, Светска здравствена организација прописала је први Међународни стандард за HCV-RNK технологију нуклеинских киселина (244).

За потребе мониторинга, важно је да се користити исти лабораторијски тест пре и током терапије.

### 1.7.4 Тестови генотипизације

HCV генотипизација је корисна у епидемиолошким студијама и у клиничком менаџменту за предвиђање вероватноће одговора и утврђивања оптималног трајања терапије. За одређивање генотипа примењује се неколико метода:

- PCR хибридизацијска метода
- PCR рестрикцијска метода
- Метода секвенцирања којом се одређује нуклеотидни след PCR продуката (245, 246).

### **1.7.5 Хепатитис Ц кор антиген**

HCV кор антиген појављује се у крви готово истовремено са HCV-RNK (може се детектовати 1-2 дана након HCV-RNK) и присутан је око два месеца (361). EIA тестом могуће је одредити слободни кор антиген (у раној фази инфекције, када још нема антитела) и везани (комплекс антиген/анти-HCV). Обзиром да је присутан кратко време, може бити репер акутне инфекције. Одређивањем кор антигена у анти-HCV позитивних особа може се одредити да ли је дошло до елиминације вируса или је он и даље присутан, док у случају негативног анти-HCV, налаз кор антигена у периоду “имунског прозора” јасно указује на акутну HCV инфекцију (237, 244).

### **1.7.6 Корисност биопсије јетре и неинвазивни тестови за фиброзу**

Постоје три основна разлога за обављање биопсија јетре: даје корисне информације о тренутном статусу оштећења јетре, идентификује карактеристике које су корисне за доношење одлуке да се крене на терапију, а може открити напредну фиброзу или цирозу која диктира надзор за хепатоцелуларни карцином (HCC) и/или скрининг за варикозитете. Биопсијом се процењују стадијум и степен оштећења јетре, али нам такође пружа информације и о другим хистолошким карактеристикама које могу имати утицаја на прогресију болести јетре. Степен дефинише обим некроинфламаторних активности, док стадијум утврђује унапредовалост фиброзе или присуство цирозе (230, 247). Биопсија јетре је и даље метод избора за добијање јетриног паренхима и патохистолошку верификацију некроинфламаторне активности и степена фиброзе. У ту сврху се користе различити скоринг системи (METAVIR, Кнодел, Исак). Биопсија јетре је широко сматрана "златним стандардом" за дефинисање статуса болести јетре (248), али има недостатака који су подстакли питања о њеној вредности (249, 250). Поступак није без ризика (укључујући бол, крварење и перфорација других органа) (251, 252), присутна је могућност грешке при узорковању (253), Захтева посебну стручност за тумачење хистопатологије, повећава цену медицинске неге, а ту и је провоцирана анксиозност за пацијента. Дакле, у току су напори да се пронађу алтернативни начини успостављања информације о стадијуму фиброзе, фокусирајући се на неинвазивно одређивање стадијума фиброзе (254). Ови маркери су корисни за сагледавање два краја спектра фиброзе (минимална фиброза и цироза), али су од мање помоћи у процени средњих вредности фиброзе или за праћење прогресије фиброзе.

## 1.8 Терапија HCV инфекције

Број болесника с одмаклим стадијумом хроничне болести јетре изазване са HCV, је током последњих година у порасту упркос све широј примени мера којима се спречава његово преношење. Ове мере подразумевају строгу контролу крви и крвних деривата, откривање особа код којих постоји повећан ризик за добијање инфекције (интравенски наркомани, особе на сталној хемодијализи, новорођенчад заражених мајки, промискуитетне особе и друге), као и едукацију становништва. Историја природних студија показује да ће 55% до 85% појединаца који развију акутни хепатитис Ц развити и HCV-инфекцију (254-256). Спонтана резолуција је чешћа код заражених беба и младих жена него код особа које су старије када се развије акутни хепатитис (256). Хронична HCV инфекција представља велики здравствени проблем за пацијента из разлога: први су у ризику за напредовање болести ка цирози и/или HCC, велики ризик и од добијања неке друге вирусне инфекције. Ризик од развоја цирозе креће се од 5% до 25% у односу на период од 25 до 30 година (256). Студије које су пратиле заражене жене и децу у млађем узрасту и праћење у периоду од 20 до 30 година, показује ниске стопе цирозе, 1% 3% (257-259). Прогресија цирозе може бити убрзана код старијих особа, код гојазних, код особа на имуносупресивној терапији (нпр. HIV), алкохоличара (260-261). Лица са HCV-ом показују већу стопу развоја декомпензације јетре (30% преко 10 година), као и хепатоцелуларног карцинома (1% до 3% годишње) (262, 263). Свака промена или мутација у геному HCV вируса, је покушај бега од IFN терапије (389). Досадашњи неуспеси у производњи вакцине додатно отежавају мере спречавања инфекције овим вирусом. Стога примена антивирусног лечења има два битна циља: први је трајно заустављање или макар заустављање размножавања вируса на дуже време, чиме се постиже други циљ – спречавање даљег развоја, стабилизација или чак побољшање патолошких промена у јетри.

### 1.8.1 Оправдање за лечење, индикације и контраиндикације

Одлука о примени антивирусног лечења заснива се на стручној и савесној процени лекара терапеута шта се лечењем жели и може постићи у односу на нежељена дејства доступне терапије и њене велике цене.

Потенцијалним кандидатом за антивирусну терапију може се сматрати готово свака особа са хроничном HCV инфекцијом, предност у лечењу имају болесници код којих је, према клиничком налазу и хистолошком прегледу ткива јетре, израженија

прогресија болести (средње изражена и тешка фиброза). У односу на међународне нумеричке системе, примену антивирусне терапије обавезује хистолошки налаз стадијума болести који је једнак или већи од два, према METAVIR скали, и једнак или већи од три, према скали по Исаку (247, 248).

Успех лечења условљен је многим факторима који зависе од вируса и болесника. Утврђено је да је успех лечења бољи уколико је генотип вируса 2 или 3 (у односу на генотип 1) и када је у крви мања количина вирусне РНК (мање од  $2 \times 10^6$  вирусних честица у милилитру). Такође, терапијски одговор је бољи када је фиброза мање изражена, затим код жена и младих особа, код особа с телесном тежином мањом од  $30 \text{ kg/m}^2$ , код особа с неоштећеним имунским системом, у одсуству истовремене инфекције вирусом хепатитиса Б и HIV, затим када особа прекине са узимањем тешких дрога и смањи конзумацију алкохола (за мушкарце мање од 20g, за жене мање од 10g дневно), као и када је мањи садржај масти и гвожђа у јетри (265). Национални консензус и неколико међународних консензуса су сачињени последњих година углавном садрже слична упутства и индикације које се односе на примену антивирусне терапије код одраслих болесника (266, 267).

Новије препоруке које су донели експерти Америчког удружења за болести јетре проширују индикације за лечење тиме што стриктно не обавезују претходно урађену биопсију јетре и одређен стадијум болести (268).

Лечење особа оболелих од хроничног хепатитис Ц се не може применити код свих болесника. Контраиндикације могу бити апсолутне и релативне. Оне се односе на стадијум болести, удруженост других инфекција или хроничних болести, лабораторијске (биохемијске и хематолошке) налазе, старост болесника, преосетљивост на лекове и друго. Договорене апсолутне контраиндикације за примену антивирусног лечења су следеће: декомпензована цироза јетре, тежак облик депресије који се не може контролисати лековима, пресађени органи (бубрег, срце, плућа), малигне болести јетре или других органа, коронарна болест, тежак облик хипертензије, попуштање функције срца, нелечен хипертиреозидизам, лоше контролисан дијабетес, опструкциона болест плућа, гравидност и лактација, активни абзус алкохола и тешких дрога, немогућност или непостојање жеље да се примене мере контрацепције, узраст до три године, старост већа од 65 година и преосетљивост на лекове који се примењују. Релативне контраиндикације за примену антивирусне терапије се односе на особе с хроничном болести бубрега без обзира на то да ли су на хемодијализи, особе млађе од 18 година,

болеснике који су истовремено заражени с HIV-ом, болеснике са хемоглобинопатијом, на особе које се лече од злоупотребе дрога и алкохола, односно на особе које су неповољно или делимично повољно одговориле на претходно лечење (268).

### **1.8.2 Оптимално лечење хроничне HCV инфекције: Пегилирани интерферон-алфа и рибавирин**

Тренутно препоручена терапија хроничне HCV инфекције је комбинација пегилирани интерферон  $\alpha 2$  (PEG IFN- $\alpha$ ) и рибавирин (Rib) у трајању од 24 до 48 недеља а на основу генотипа вируса и саме виремије. Механизам деловања интерферона састоји се у спречавању везивања вируса на ћелије, индукцији протеин киназе која инхибира синтезу протеина фосфорилацијом иницијацијског фактора транслације (eIF2a), смањењу нивоа вирусне RNK, и стимулацији цитотоксичних Т лимфоцита и NK ћелија (269-272).

Испитивања су дефинисала неколико кључних компоненти терапије, односно одговарајуће дозе лекова, оптимално трајање терапије и потребу за различитим режимима за пацијенте са генотиповима G1, G2 и G3. Постоје два лиценцирана Интерферона у Сједињеним Америчким Државама, Пегинтерферон алфа-2b (PEG-IFN- $\alpha$ -2b) и Пегинтерферон алфа-2a (PEG-IFN- $\alpha$ -2a) (273).

Дозе ова два облика пегилованог Интерферона се разликују. Оптимална доза PEG-IFN- $\alpha$ -2b, на основу наведених испитивања, је 1,5 $\mu$ g/kg/недељно дозирање према телесној тежини. Иако је доза рибавирин која се користи по наведеној студији фиксирана на 800mg дневно, каснији резултати студија пацијентата са инфекцијом генотипа G1, показали су да је доза рибавирин различита за пацијенте различите масе (800mg за пацијенте до 65kg; 1.000mg за пацијенте тежине 65kg до 85kg; 1.200mg за пацијенте тежине 85 до 105kg; и 1.400mg за пацијенте тежине 105kg до 125kg) (274, 275).

PEG-IFN- $\alpha$ -2a се примењује у фиксној дози од 180 $\mu$ g/недеље субкутано заједно са рибавирином 1.000 до 1.200mg дневно у зависности од телесне тежине (1.000mg за оне који су до 75kg и 1.200mg за оне који су тежи од 75kg) (270).

Један број студија говори да се оптимално трајање лечења заснива на вирусном генотипу. Студије су утврдиле да пацијенте са генотипом G1 треба третирати током 48 недеља са (PEG IFN- $\alpha$ ) плус стандардна доза рибавирин, док пацијенти са генотиповима G2 и G3 могу бити третирани са (PEG IFN- $\alpha$ ), плус мала доза рибавирин

(800mg) (266). За генотип 4 HCV инфекције, комбинације лечења (PEG IFN- $\alpha$ ) плус рибавирин у току 48 недеља (276). Недавна ретроспективна анализа лечења болесника са HCV генотипа G6 довела је до закључка да је лечење (PEG IFN- $\alpha$ ) плус рибавирин за 48 недеља било ефикасније и боље од лечења у трајању од 24 недеља (277), обзиром да је све више болесника који спадају у групу тешких за лечење, где нисмо успели да ерадикујемо HCV инфекцију (парцијални респондери, нулл-респондери, релапс-респондери), све је више значајна примена трећег лека у лечењу ових болесника у комбинацији са конвенционалном терапијом. То су директни антивирусни агенси, пре свега протеазни инхибитори (bocoprevir, telaprevir), који пружају шансу и овој популацији болесника за ерадикацију HCV инфекције (278).

### **1.8.3 Могуће нежељене појаве услед лечења**

Пажљивим одабиром болесника избегавају се могуће нежељене појаве у току лечења. Оне се испољавају непосредно пре почетка или у току лечења. Локална реакција у виду некрозе на местима примене ињекције интерферона се ретко јавља, док се једна или више системских нежељених појава очекује код 75% болесника. Нежељене појаве услед примене интерферона углавном се испољавају у виду „грипа” током првих дана лечења (повишена температура, болови у зглобовима и мишићима, главобоља, малаксалост). Ове појаве могу се отклонити парацетамолом. Касније се током лечења могу испољити друге појаве, као што су супресије костне сржи (неутропенија, тромбоцитопенија), депресија, надражљивост, поремећај сна, концентрације и памћења, сметње вида и слуха, обољење штитасте жлезде (хипертиреозидизам или хипотиреозидизам), опадање косе и друго. Хемолитичка анемија, малаксалост, свраб и осип су најчешће нежељене појаве услед примене рибавирин. Такође, рибавирин може деловати на плод, те се код жена саветује строга примена мера контрацепције током и шест месеци после завршетка лечења (279, 280).

### **1.8.4 Циљеви и исходи лечења.**

Примарни циљ лечења HCV инфекције је излечење као и спречавање настанка компликација и смрти. Краткорочни позитивни резултати могу бити биохемијски мериви (нормализација ALT серумских нивоа), вирусолошки (одсуство HCV-RНК из серума) и хистолошки (2 тачке побољшања некроинфламаторног резултата без погоршања резултата фиброзе) (278).

Разликујемо неколико врста или типова одговора на терапију, и то:

**Брзи вирусолошки одговор** (RVR од енг. *Rapid Viral Response*,) одређује се након 4 недеља терапије и добар је показатељ потребног трајања терапије. Након тог периода вирусна RНК се не детектује. Болесници инфицирани HCV-ом генотип 1 који постигну рапидни вирусолошки одговор (RVR-недетектабилна HCV RНК после 4 недеље терапије) и ниску базалну виремију (<800.000IU/ml), лече се 24 недеље. Са високом базалном виремијом лечиће се 48 недеља (281-283).

**Раним одговором** (EVR од енг. *Early Viral Response*,) сматра се пад виремије за бар два логаритма од почетних вредности и оцењује се након 12 недеља терапије. Болесници који су инфицирани HCV генотип G1 и постигну рани вирусолошки одговор (EVR-HCV RНК детектабилна у 4. а недетектабилна у 12. недељи) лечи ће се 48 недеља (281).

**Трајни вирусолошки одговор** (SVR од енг. *Sustained Viral Response*) дефинише се одсутношћу вируса у крви (недетектабилна HCV RНК <50IU/ml), 6 месеци након завршетка терапије и он износи око 50% за генотип G1 и око 80% за генотип 2 и 3. SVR је генерално удружен са резолуцијом болести јетре у болесника без цирозе. Болесници са цирозом јетре могу добити HCC и након ерадикације HCV инфекције. Најзначајнији предиктори успостављања SVR су скоро верификовани генетски полиморфизам локализован на хромозому 19 у близини гена који кодира синтезу интерферина B28 (или интреферона λ), тј. генотип cc, генотип HCV и стадијум фиброзе. Други предиктори укључују базални ниво HCV RНК, body-mass индекс домаћина, старост, инсулинску резистенцију, нивое аминотрансфераза, коинфекција са HBV или HIV вирусом, стеатоза јетре, злоупотребу алкохола (281).

**Продужени брзи вирусолошки одговор** (eRVR од енг. *Extended Rapid Virologic Response*) је онај одговор, где се вирусна RНК не детектује након периода од 4-12 недеља.

**Респондер** је пацијент који је негативан на контролним HCV RНК тестовима током терапије и који је постигао SVR по завршетку процеса лечења.

**Релапсер** је пацијент који је био негативан на бар једном од контролних HCV RНК тестова током терапије и на самом крају терапије (ETR), али коме се вирус повратио (наставио да се реплицира) по завршетку терапије и самим тим није постигао



стабилан, односно трајни вирусолошки одговор (SVR) по завршетку процеса лечења (шест месеци од краја терапије).

**Нон-респондер** је пацијент коме број копија у крви није довољно опао (за 99% или 2 лога) у 12-ој недељи односно није постигао негативан рани вирусолошки одговор (EVR) на терапију. Термин се односи и на оне код којих се и после 24 недеља лечења вирус ипак детектује у крви PCR методом.

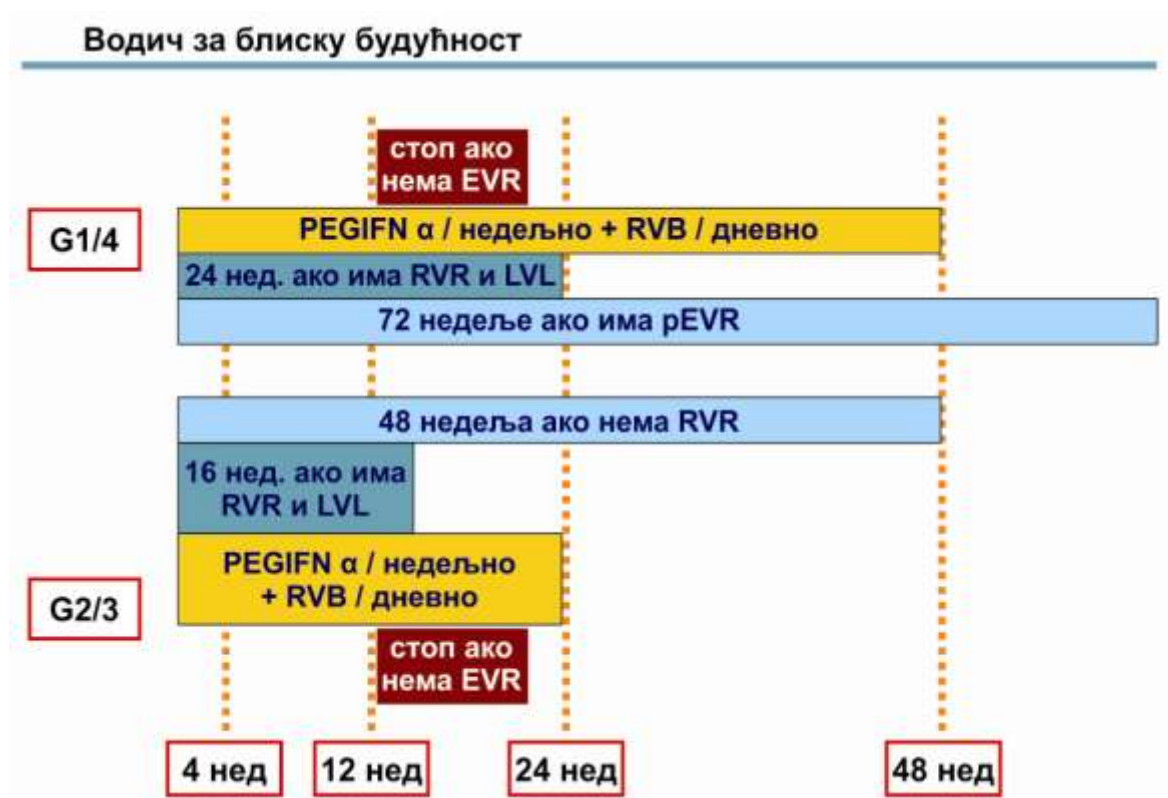
**Нулти-респондер** је пацијент који не само што није у неком тренутку добио негативан резултат на HCV RNK тесту, већ се ни у једном тренутку током лечења није регистровао значајно умањени број вирусних копија у крви PCR методом.

Код **парцијалних респондера PR** дошло је до пада виремије за два логаритма али се HCV RNK детектује и након 24 недеља, тз. „пробој” манифестује се поновном појавом RNK, за време трајања терапије.

**Повратници (RR** од енг. *Responder-relapser*), су пацијенти код којих долази до поновног јављања RNK, након терапије (270, 284, 285). И поред спровођења лечења PEG-IFN и рибавирином само 42 до 52% пацијената са HCV генотипом G1 има трајно повољан одговор односно елиминацију вируса (247, 275, 286). Бројни фактори домаћина (старост, пол, стадијум фиброзе, имунолошки статус, адипозитет, метаболички синдром) фактори везани за вирус (висина виремије, генотип, развој вирусних квазиспецијеса), и утицај околине (алкохол, коинфекција с HBV и HIV, лекови) утичу на исход терапије. Брзи пад виремије на почетку терапије показао се као добар прогностички показатељ успеха лечења, што је често пресудно у одлуци о настављању или прекиду лечења (287). Недовољно је података да се добије јасан одговор, зашто једна група лечених болесника има добар одговор на терапију, а друга не. Фактори домаћина као што су године живота и стадијум фиброзе предвидљиви су за исход лечења, али су само индиректни показатељи дешавања у целуларном имунитету, који има кључну улогу у решавању инфекције или њеном даљем перзистирању (288).

Као одговор имунског система на присуство HCV вируса, долази до сакупљања имунских ћелија у јетри, а уједно и покушаја контроле вирусне репликације. Нажалост у већини случајева развија се хронична инфекција. У току ране фазе имунски одговор има истовремено и користан и штетан учинак на домаћина. Снажно антивирусно деловање свакако је потребно у контроли инфекције што се види по егзацербацији тока хепатитиса Ц у особа које примају имunosупресивне или цитотоксичне лекове, или у

особа имуносупримираних HIV инфекцијом. С друге стране имунске ћелије окупљене у јетри могу допринети развоју некроинфламаторног оштећења и прогресије према фибрози (288). Процеси ремоделовања, пролиферације хепатоцита, жучних путева и стварање фибротичких септи су последица дуготрајног запаљења јетре. Даље долази до разарања нормалне архитектуре јетре уз погоршање физиолошког тока крви кроз јетру, уз развој њене метаболичке и имунолошке дисфункције. Епидемиолошка су истраживања показала да више од 80% особа с акутном HCV инфекцијом не успева ерадикувати вирус што доводи до успостављања хроничне инфекције (289). Ефекторски механизми урођене и стечене (целуларне и хуморалне) имуности имају важну улогу у елиминацији односно перзистенцији HCV-а и значајно доприносе оштећењу јетре у смислу колатералне штете (421) (Слика 1.10).



Слика 1.10. Пад вирусне количине се прати на крају терапије тј након 48 недеља и препоруке за поједине генотипове.

### 1.8.5 Имуноски одговор у току антивирусне терапије

Имуноски одговор у току терапије може бити модулисан деловањем PEG-IFN- $\alpha$  и рибавирина (290). PEG-IFN- $\alpha$  и рибавирин исказују снажну антивирусну активност, али имају и важну имуномодулативну активност *in vivo*. PEG-IFN- $\alpha$  подстиче антиген презентујуће ћелије и CD4<sup>+</sup> Т лимфоците, али уз мало деловања на CTL Т лимфоците.

Виши нивои CD4+ у току почетка терапије били су повезани са SVR (290). Камал и сарадници су показали повећање HCV-специфичних CD4+ Т-лимфоцита у крви успешно лечених болесника (291). Анализа CD8+ Т лимфоцита специфичних за HCV показала је да се проценат ових ћелија не повећава током лечења PEG-INF- $\alpha$  и рибавирином (292). Супротно томе, Рахман и сарадници су показали смањење HCV-специфичних Т-лимфоцита у болесника с повољним учинком лечења (293). Из тог разлога за сада није познато да ли елиминација HCV-а током лечења омогућава реконституцију специфичне имуности на овај вирус. Међутим, резултати на моделу лечења хроничне HBV инфекције Lamivudinom показују да лечење може повећати фреквенцију и реконструовати функционалне CD4+ и CD8+ Т-лимфоците специфичне за вирус (294).

Са друге стране рибавирин подстиче Th1 профил реакције (295), и инхибира продукцију IL-10. Код HCV инфекције запажено је ослабљено сазревање DC. Терапија интерфероном има улогу у реституцији броја DC које могу бити снижене у HCV инфекцији. Фреквенције DC пре терапије биле су значајно ниже код болесника са HCV инфекцијом него у здравих контрола, а успешна терапија нормализује број DC (296). Могући механизми неуспеха Т ћелијског одговора који доприносе перзистирању HCV су дакле: исцрпљеност Т ћелијског састава; развој вирусних мутанта; дисфункција Т ћелија у смислу слабије пролиферације, цитотоксичности и слабије продукције интерферона; слабији одговор и због изложености високим нивоима антигена; слабије сазревање Т ћелија; супресија Т ћелијских функција због фактора вируса, али и због деловања Treg ћелија; мањак акумулације Т ћелија у јетри; и убрзана деплеција у јетри (297).

Будућа истраживања антиген-специфичне имуности омогућиће нам боље разумевање имуномодулаторног учинка лечења PEG-IFN- $\alpha$  и рибавирином као и нових стратегија за HCV-специфичну имунотерапију. Наиме, разлика у амплитуди и репертоару HCV-специфичне имуности у самоограничавајућој у односу на хроничну инфекцију указује на то да би терапијска реконституција антивирусне имуности могла придонети контроли вирусне репликације и болести. Истраживање кинетике антиген-специфичне имуности у нелечених и лечених HCV болесника омогућиће стицање знања која ће представљати темељ стварања нових стратегија за оптимизацију терапијске вакцинације (298).



## 2 ЦИЉ РАДА

Утврдити присуство и одредити апсолутни и релативни број CD4+/CD25+/Foxp3+ (Treg), CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцита у јетри и периферној крви пацијената са хроничном HCV инфекцијом, испитати цитокински профил (Th1/Th17) имунског одговора у хроничној HCV инфекцији као и постојање евентуалне повезаности ових параметара, вирусне репликације и нивоа оштећења јетриног паренхима.

У складу са општим циљевима истраживања постављени су и конкретни задаци:

- Одредити релативан број CD4+/CD25+/Foxp3+ Т лимфоцита у јетри и периферној крви испитаника, а резултат приказати као проценат CD4+/CD25+/Foxp3+ Т лимфоцита у односу на укупне CD4 Т лимфоците.
- Утврдити ниво експресије PD-1 и фосфорилације STAT-5 у CD4+/CD25+/Foxp3+ Т лимфоцитима испитаника.
- Утврдити повезаност броја CD4+/CD25+/Foxp3+, CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцита и макрофага у јетри и периферној крви са бројем HCV RNK копија, серумским нивоом ALT и AST и степеном фиброзе јетриног паренхима.
- Испитати профил секретованих цитокина (Th1/Th17) у периферној крви и 24h култури мононуклеарних леукоцита испитаника.

## **3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### **3.1 Испитаници**

У истраживање је била укључена група од 181-ог болесника са хроничном HCV инфекцијом, оба пола, старости од 19 до 75 година, који су у периоду 2005-2013 лечени на Инфективној клиници КЦ у Крагујевцу. Од тог броја 153 болесника је чинило ретроспективну а њих 28 проспективну групу.

У циљу постављања дијагнозе пацијентима су урађене лабораторијске анализе (KKS, Se, Le, LF, AST, ALT, ANA, AMA, AGMA, AMZA, AF, fT3, fT4, TSH, UIBC, TIBC, INR, холестерол, триглицериди и албумини), биопсија јетре, испитивање присуства вируса реакцијом ланчане полимеразе и генотипизација. Такође је код свих болесника обављен и ултразвучни преглед абдомена. Узорци плазме и клиничко-патолошки подаци о пацијентима добијени су у сарадњи са Клиником за инфективне болести КЦ Крагујевац и Клиником за хематологију КЦ Крагујевац. Хистопатолошке анализе ткива јетре добијених биопсијом рађене су у Центру за патолошку анатомију КЦ Крагујевац. Квантификација и генотипизација HCV RNK методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену извршена је у вирусолошкој лабораторији Института за микробиологију КЦ Србије у Београду.

Сви болесници били су укључени у програм припреме за интерферонску терапију. Индикације за примену антивирусне терапије су: повећан ниво ALT и AST у серуму, присуство RNK-HCV у плазми или серуму, налаз биопсије јетре који указује да се ради о хроничном хепатитису Ц. Критеријуми за искључење су друге конкомитантне болести јетре (аутоимунске болести, малигне болести, коинфекција другим хепатотропним вирусима), декомпензована цироза јетре, психијатријске болести и алкохолизам. Сви болесници укључени у лечење и истраживање нису претходно никада били лечени антивирусном терапијом због хроничне HCV инфекције.

У истраживање је укључено и 18 одраслих особа, оба пола, старости од 19 до 65 година, без очигледних хематолошких поремећаја, као здраве контроле.

### **3.2 Терапијски протокол**

Од укупне групе испитаника са хроничном хепатитис Ц инфекцијом, њих 181 је укључено у процес лечења пегилираним интерфероном алфа-2а (Pegasys) и

пегилираним интерфероном алфа-2б (Peg-intron) у дози од од 1,5µг/kg sc. 1x недељно и рибавирином *per os* (Rebetol према телесној тежини), дакле према сада стандардном протоколу за хронични хепатитис Ц. Стандардни протокол подразумева терапију болесника са генотипом 1 и 4 у трајању од 48 недеља. Ако лечење доводи до недетектабилне виремије након 4 недеље терапије (рани вирусолошки одговор), терапија се спроводи кроз 24 недеље. Код болесника са генотипом 2 и 3 терапија се спроводи у трајању од 24 недеље. Ако се постигне рани вирусолошки одговор, терапија траје краће, и 16 недеља. Стандардни протокол темељи се на препорукама EASL (Европске асоцијације за болести јетре) и пропозицијама Завода за здравствено осигурање Републике Србије за примену наведене терапије и представља садашњи општеприхваћени начин лечења у већини развијених земаља. Болесници код којих терапије није могла бити спроведена у потпуности због нуспојава или из других разлога, искључени су из студије, јер њихови резултати не би били компатабилни. Њих је у нашем истраживању било 47, тако да смо потпуним резултатима лечења располагали за 134 болесника.

Болесници са недетектабилном HCV RNK на крају терапије дефинишу се као респондери, односно они који су одговорили на терапију. Трајни вирусолошки одговор (SVR-од енг. *Sustained Viral Response*) је дефинисан као недетектабилна HCV RNK 6 месеци након завршетка терапије. Испитаници код којих број вирусних копија у крви није довољно опао (за 99% или 2 логаритма) у 12-ој недељи лечења, означени су као нон-респондери (NR) пошто нису одговорили на терапију. Термин се односи и на оне код којих се и после 24 недеља лечења вирус ипак детектује у крви PCR методом. Болесници код којих на крају терапије HCV RNK није могла да се детектује, али је по завршетку терапије забележено поновно јављање вирусне RNK означени су као повратници (RR-од енг. *Responder-relapser*).

### 3.3 Методе

#### 3.3.1 Узимање биолошких узорака

Узорци серума потребни за квантификацију HCV RNK, генотипизацију вируса и одређивање концентрације цитокина прикупљени су **узимањем 5ml периферне крви у епрувету без антикоагуланса и центрифугирањем на 800g**, 10 минута на собној температури. Узорци су чувани на -20°C до извођења теста. Узорци периферне крви

(5ml) прикупљени у епрувету са антикоагулансом (K<sub>3</sub>EDTA) коришћени су за фенотипизацију мононуклеарних ћелија.

### **3.3.2 Патохистолошка евалуација степена активности хепатитиса и стадијума фиброзе.**

Биопсија јетре иглом, најбољи је дијагностички поступак који даје увид у стварно оштећење јетриног паренхима, не само код хепатитиса Ц већ и код других болести које погађају јетру. Узорак ткива мора бити најмање дужине 1,5cm и ширине 0,2cm, а ако се одређује степен оштећења јетре нумеричким индексом, мора садржати бар 6 целих портних простора.

На ткивном материјалу који је добијен игленом биопсијом (дебљине 1,6mm), вршена је патохистолошка и имунохистохемијска анализа. Наведене анализе су урађене у Служби за патолошку анатомију Клиничког центра Крагујевац.

#### *3.3.2.1 Стандардна патохистолошка обрада*

Добијени узорци ткива фиксирају се у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24 часа, на собној температури. По завршеној фиксацији, узорци се дехидратишу провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације и то следећим редом: најпре 1 минут у 85% алкохолу, затим 2 пута по 50 секунди у 96% и на крају 2 пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу, затим се просветле ксилолом и прожму парафином. Након тога материјал се залива течним парафином, обликује у парафинске коцке које се затим хладе. Следи резање на микротому (микротом Leica RM 2135) и прављење попречних серијских пресека дебљине 4 µm. Ткивни резови се монтирају на плочице, боје стандардном хематоксилин-еозин методом, фиксирају Канада балзамом и прекривају покровним стаклом. Тако добијене препарате посматрали смо под светлосним микроскопом (Carl Zeiss, Axioscop 40) и фотографисали помоћу камере (Canon PC 1089) коришћењем микроскопског увеличања (x10, x20, x40).

#### *3.3.2.2 Микроскопска анализа препарата*

Патохистолошка евалуација градуса и стадијума хепатитиса извршена је применом скоринг система по Кноделу и Исаку. Кноделов скоринг систем сврстава хистолошки налаз јетре у четири скупа у зависности од степена оштећења јетре. Првим скупом обухваћене су парцијалне (*piecemeal*) премошћујуће и мултилобуларне некрозе (0–10 бодова), другим скупом обухваћене су жаришне некрозе и апоптозе унутар лобулуса (0–4 бода), трећи скуп обележава обилност запаљенског инфилтрата у



порталном простору (0–4 бода), а четврти скуп количину пролиферисалог везива (0–4 бода). У клиничким испитивањима уобичајено је да се прва три скупа приказују заједно дајући резултат некроинфламаторне активности или скорa (0-18 бодова), а четврти скор или стадијум фиброза, приказује се посебно (0-4 бода). Нумеричка вредност патохистолошке евалуације активности хепатитиса представљена овим скоринг системом може износити укупно максимално 22 бода, тј. за некроинфламаторну активност 18 бодова и стадијум фиброзе 4 бода. Исаков скоринг систем одваја конфлуентну некрозу од перипортне парцијалне некрозе, а у одређивању стадијума фиброзе уводи нове класе према броју фиброзираних портних простора (појединачни или већина, са или без кратких портно-портних везивних мостова) и према правој мостној портно-портној или портно-централној фибрози, са или без стварања појединачних регенераторних нодулуса. Овај скоринг систем уводи појмове који дефинишу степен, односно нумерички индекс за активност оштећења (парцијалне некрозе, конфлуирајуће и премошћујуће некрозе, жаришне некрозе и апоптозе и портно запаљење и креће се у распону од 0 до 18 бодова), и стадијум односно нумерички индекс за промене у грађи јетре, количину фиброзе, односно цирозу као крајњу фазу болести (у распону од 0 до 6 бодова). Нумеричка вредност патохистолошке евалуације активности хепатитиса, представљена овим скоринг системом може износити укупно максимално 24 бода.

### **3.3.3 Анализа популација мононуклеарних ћелија јетре методом имунохистохемије**

Имунохистохемијски метод се заснива на реакцији антиген-антитело. Применом одговарајућих моноклонских антитела, специфичних за одређене врсте молекула у једру, цитоплазми или на мембрани ћелија, могућа је визуелизација комплекса антиген-антитело, а самим тим и одређивање броја ћелија које су експримирале специфични молекула, као и интензитет те експресије. За имунохистохемијско одређивање нивоа експресије CD4, CD8, CD14, CD20, Foxp3, DC-SIGN и PD1 коришћени су ткивни узорци фиксирани и укалупљени у парафин. Анализа је обављена применом палете моноклонских антитела различитих произвођача и карактеристика приказаних у табели 3.1.

*Табела 3.1. Панел антитела коришћених за имунохистохемију*

Име антитела	Произвођач	Кат.број	Клон	Разблажење
Anti-CD4 antibody	Invitrogen	08-1282	1F6	1:50-1:200
Anti-CD8 antibody	Abcam	ab17147	144B	1:25-1:50
Anti-CD14 antibody	Abcam	ab49755	7	1:50-1:100
Anti-B-Cell (CD20) antibody	Invitrogen	18-0088	L26	1:50-1:200
Anti-Foxp3 antibody	Abcam	ab20034	236A/E7	1:100
Anti-DC-SIGN antibody	Abcam	ab59192	5D7	1:50-1:200
Anti-PD-1 antibody	Abcam	Ab52587	NAT105	1:50

### *3.3.3.1 Методологија имунохистохемијског бојења*

Резови дебљине 3-4  $\mu\text{m}$  монтирани су на високоадхерентне плочице SuperFrost® и сушени на температури од 56°C у току 1 сата. За детекцију експресије CD4, CD8, CD14, CD20, Foxp3, DC-SIGN и PD1 примењена су моноклонска хумана антитела и високо сензитивна специфична стрептавидин-биотин имунохистохемијска метода у којој је стрептавидин обележен пероксидазом, а као хромоген коришћен је 3,3-диаминобензидин. У току бојења, истовремено су тестирани и познати негативни и позитивни ткивни узорци, а један ткивни пресек из испитиваног парафинског калуца, тестиран је реагенсом који замењује примарно антитело.

Процедура подразумева поступке демаскирања антигена, блокирање ендogene пероксидазе, инкубирање препарата са примарним антителом и поступак извођења стрептавидин-биотин имунохистохемијске методе. Након депарафинизације и рехидрације ткивних пресека, обављено је демаскирање антигена одговарајућим поступцима. Формалдехид у току фиксације, као и парафин у току калупљења, изазивају конфигурацијске промене протеина у ткиву формирањем интермолекуларних веза. Дуготрајна формалинска фиксација може да маскира антигене и умањи ефекат специфичног бојења. Стога се поступком демаскирања антигена постиже обнављање примарне конфигурације антигена уклањањем нежељених интермолекуларних веза. Демаскирање антигена постигнуто је излагањем ткивних исечака високој температури у микроталасној пећници (Samsung, TDS), у 0,1М цитратном пуферу (pH 7,0), на 700W, у трајању од 20 минута. Следећи корак је блокирање ендogene пероксидазе, 3% воденим раствором  $\text{H}_2\text{O}_2$  у трајању од 10 минута, након чега се наноси примарно антитело. Овако припремљени препарати инкубирају се 1h на собној температури, у влажној комори.

За идентификацију циљних молекула користили смо индиректну имунохистохемијску методу. Код ове методе се прво примарно антитело веже за циљни антиген, а затим се секундарно антитело, које је обележено и специфично за Fc фрагмент примарног антитела, везује за примарно антитело. Индиректна метода је осетљивија од директне због појачавања сигнала путем секундарног антитела. У поступку имунохистохемијског бојења користили смо стрептавидин биотин (SAB) методу у којој биотинизирано секундарно антитело реагује са неколико стрептавидинских молекула коњугованих пероксидазом, што омогућава вишеструку амплификацију сигнала. Поступак се завршава инкубацијом препарата у мешавини супстрат-хромогена, 5 минута на собној температури (Mouse HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit, Abcam, ab64259). Како присуство ендогеног биотина или биотин-везујућих протеина у ткиву може да допринесе повећању неспецифичног позадинског бојења, исечци ткива су пре додавања примарног антитела третирани Avidin/Biotin Blocking Kit-ом (Vector Laboratories, Cat. No. SP/2001).

Као општи растварач антитела и средство за испирање између различитих корака у току имунохистохемијске процедуре бојења коришћен је фосфатни пуфер 150mM NaCl pH7,5 (PBS). На крају исечци су бојени Мајеровим хематоксилином око 30 секунди.

### *3.3.3.2 Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења*

Сва имунохистохемијска бојења изведена су уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према стандардним пропозицијама.

Као позитивни контролни узорци за тестирање коришћени су исечци тонзила, који су раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Припремани су на исти начин као и испитивани узорци у овом истраживању. Као негативна контрола у току имунохистохемијског бојења коришћени су узорци ткива који су, уместо примарним антителима, третирани индиферентним пуфером који нема афинитет везивања за анализиране антигене.

### *3.3.3.3 Очитавање резултата*

За квантитативну анализу имунохистохемијских резултата користили смо некомерцијалну веб апликацију ImageJ (public domain ImageJ software<sup>17</sup>, National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) уз имплементацију алгорита који омогућава полуаутоматску или аутоматску анализу имунохистолошке слике.

У нашој студији је коришћен алгоритам за полуаутоматску анализу који одређује пропорцију и интензитет бојења позитивно обојених ћелија на имунохистолошкој слици. Овим алгоритмом се однос броја позитивних и укупног броја ћелија процењује као однос површине позитивних ћелија и укупне површине препарата. На овај начин се избегава потреба да се тачно сегментирају поједине ћелије. Поред тога, интензитет бојења се може проценити на основу интензитета пиксела позитивно обојених ћелија.

За аквизицију слика коришћен је микроскоп Carl Zeiss, Axioscop 40 и камера Canon PC 1089. Сlike су снимљене на увећању од 100, 200 и 400 пута, са резолуцијом 1536x2048 пиксела и сачуване су у TIFF формату. За семиквантитативну анализу коришћене су фотографије микроскопског увећања 400. За потребе софтверске анализе коришћене су фотографије високе резолуције, при чему је цео препарат фотографисан коришћењем микроскопског увећања 100 и 200 (Слика 3.1а.).

Први корак у анализи имунохистолошке слике је корекција слике на основу корекционе слике камере уклањањем остатака позадине чије су карактеристике уочене у *RGB* колор-простору. Наиме, чињеница да *G* компонента позадине на сликама има знатно већу вредност од *G* компоненте самог препарата омогућава одабир погодног прага који обезбеђује прецизно раздвајање позадине од самог препарата. Као резултат, добија се монохроматска слика са означеним регионом препарата (Слика 3.1б.)

Даља анализа слике се односи на издвајање области од интереса, односно региона који заузимају позитивне ћелије, из претходно издвојеног региона препарата. Чињеница да се позитивне ћелије на имунохистолошкој слици боје смеђом, а негативне плавом бојом је искоришћена за њихову даљу сегментацију. Како *B* (*blue*) компонента *RGB* колор-простора необојених ћелија има већу вредност од оне коју имају позитивне ћелије, за свако индивидуално антители се одабира праг детекције који омогућава раздвајање негативних и позитивних ћелија у одвојене регионе. Као резултат се добија слика са означеним регионом који заузимају обојене, тј. позитивне ћелије (Слика 3.1в).

<b>а</b>	<b>Б</b>	<b>в</b>	% Препарата у односу на слику	% Обојене површине у односу на слику	% Обојене површине у односу на препарат	Број ћелија на препарату
			80,971	0,203	0,251	38,68
			78,829	0,028	0,030	16,06
			69,098	0,035	0,039	13,53
			71,985	0,013	0,013	6,06
			66,225	0,052	0,068	35,10
			67,853	0,099	0,108	13,07
			66,984	0,649	0,792	109,16
			52,325	0,428	0,698	72,45
			67,024	1,45	1,883	110,13
			64,903	0,215	0,331	12,70
<b>УКУПНО:</b>			81,520	0,317	0,421	426,95



Слика 3.1. Квантитативна анализа имунохистохемијских резултата помоћу ImageJ софтвера. (а) Репрезентативна имунохистохемијска слика експресије CD4 молекула добијена помоћу Carl Zeiss, Axioscop 40/Canon PC 1089 система. Линеарни размерник (200µm) служи за израчунавање апсолутних површина од интереса. (б-в) Процес анализе експресије мембранских маркера. (б) ImageJ појачана 8-bit монохроматска слика са дефинисаном површином од интереса (цео препарат) је површина која представља бројилац. (в) Позитивно имунохистохемијско бојење (дефинисано црвеном бојом) за CD4 примарно антитело (праг детекције се подешава за свако индивидуално антитело) је површина која представља именилац. На основу постављених параметара ImageJ израчунава број позитивно обојених ћелија.

Обојена једра ћелија се лако идентификују на основу боје, облика и величине и резултати се приказују као број позитивних нуклеуса/ћелија по  $\text{mm}^2$  препарата. Интерпретација мембранског бојења је тежа, поготову у деловима препарата у којима је густина ћелија већа. Стога се резултати мембранске експресије приказују као пропорција где је именилац површина ћелија детектованих као позитивно мембранско бојење, а бројилац површина препарата. Укратко, помоћу софтвера се израчунава површина целокупне фотографије, површина сваког од оивчених препарата, али и региона са ћелијама које су експримирале специфични молекул.

Након обраде целокупног препарата, проценат који је заузимао регион са специфичним ћелијама се помоћу алгоритма израчунава на основу формуле:  $F = C/B * 100$ , где је  $F$  - % површине коју је у односу на цео препарат заузимао регион са обојеним ћелијама;  $C$  - % површине коју је у односу на целокупну слику заузимао регион са обојеним ћелијама;  $B$  - % површине препарата у односу на целу слику. Алгоритам затим на основу односа површине позитивних ћелија и површине целог препарата даје процену броја позитивних и негативних ћелија, а коначни резултат се, еквивалентно бројању позитивних и негативних ћелија изражава по јединици површине препарата ( $n/\text{mm}^2$ ).

### **3.3.4 Анализа популација моноклеарних ћелија периферне крви методом проточне цитометрије**

Применом проточне цитометрије одредили смо релативну, односно процентуалну заступљеност и апсолутни број моноклеарних и полиморфонуклеарних ћелија у периферној крви. Одређивали смо проценат и број Б лимфоцита, различитих субпопулација Т лимфоцита, моноцита и дендритских ћелија. Такође испитиван је и функционални фенотип субпопулација Т лимфоцита и дендритских ћелија. Узорци периферне крви пацијената анализирани су коришћењем проточне цитометрије са пет боја.

#### *3.3.4.1 Бојење мембранских маркера*

Овом методом одређивана је експресија молекула који се експримирају на површини ћелијске мембране и то: CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD57, CD83, CD11c, CD123 и HLA-DR. У те сврхе примењена су моноклонска антитела специфична за ове антигене, коњугована са различитим флуоресцентним бојама (Табела 3.2). Процедура бојења површинских маркера је изведена тако што је у  $100\mu\text{l}$  пуне крви

додавана одговарајућа количина коњугованих моноклонских антитела. Ћелије су такође инкубирани и са одговарајућим изотипским контролама. Бојење изотипским контролама помаже да се разграничи специфично од неспецифичног бојења. Затим је пуна крв са антителима краткотрајно вортексована и затим инкубирана у мраку на +4°C у трајању од 25 минута. Након тога у узорке је додато 400µl PBS-а и узорци су анализирани на проточном цитометру.

*Табела 3.2. Панел антитела коришћених за проточну цитометрију*

<b>Име антитела</b>	<b>Произвођач</b>	<b>Кат.број</b>
Anti-CD3-ECD	Invitrogen	MHCD0417
Anti-CD4-PE	Beckman Coulter	IM0449U
Anti-CD4-ECD	Invitrogen	MHCD0417
Anti-CD8-FITC	Beckman Coulter	IM0451U
Anti-CD19-PC5	Beckman Coulter	IM2470U
Anti-CD19-FITC	Beckman Coulter	IM1284U
Anti-CD14-PC5	Beckman Coulter	IM2640U
Anti-CD14-FITC	Beckman Coulter	IM0645U
Anti-CD57-FITC	Beckman Coulter	IM0466U
Anti-HLA-PE	Beckman Coulter	IM0464U
Anti-Foxp3-APC	eBioscience	17-4777
Anti-Foxp3-FITC	eBioscience	11-4777-42
Anti-CD123-PE-Cy7	eBioscience	25-1239-42
Anti-CD11c-PerCP	R&D Systems	FAB1777C
Anti-HLA DR-ECD	Invitrogen	MHLDR17
Anti-CD83-PE	R&D	FAB 1774P
IgG1 mouse-FITC	Beckman Coulter	IM0639
IgG1 mouse-PE	Beckman Coulter	IM0670
IgG1 mouse-ECD	Beckman Coulter	IM2714
IgG1 mouse-PC5	Beckman Coulter	IM2663
IgG1 mouse-PC7	Beckman Coulter	737662

#### *3.3.4.2 Интрацелуларно бојење Foxp3 транскрипционог фактора*

Први корак у овој процедури је бојење мембранског CD4 маркера: у 100µl суспензије моноклеарних ћелија ( $2 \times 10^5$ ) изолованих из периферне крви, додаје се 10µl CD4-PE антитела, и затим суспензија инкубира 25 минута у мраку на +4°C. За фиксацију и пермеабилитацију ћелијске мембране коришћен је пуферски сет (Foxp3-Transcription Factor Staining Buffer Set, eBioscience, Cat. No. 00-5523-00). По завршетку инкубације са CD4-PE антителом додаје се 1ml фиксатора (Fixation/Permeabilisation Buffer), јако вортексује и инкубира 40 минута на собној температури у мраку. Затим се

додаје 2ml пермеабилзатора (Permeabilisation Buffer) и центрифугира 5 минута на 400g. Талог се ресуспендује у 100µl пермеабилзатора и, без вортексовања, инкубира 15 минута на собној температури у мраку. Након тога се додаје 5µl Foxp3-FITC антитела, благо вортексује и инкубира 30 минута на собној температури у мраку. По завршетку инкубације ћелије се оперу у 4ml PBS-а. Ћелијски талог се ресуспендује у 400µl PBS-а и анализира на проточном цитометру.

#### *3.3.4.3 Очитавање резултата на проточном цитометру*

Проточна цитометрија је технологија која мери и анализира карактеристике ћелија приликом њиховог протока кроз апарат. Честице се мере и анализирају у односу на релативну величину, релативну густину и сложеност и релативни интензитет флуоресценције. У припреми за проточну цитометрију ћелије се инкубирају са једном или више врста флуорохромом обележених антитела која су специфична за мембранске или цитоплазматске молекуле. Детекцијом флуоресценције на појединачним ћелијама у суспензији може се одредити број ћелија које експримирају одређене молекуле, а количина антитела везаних за сваку појединачну ћелију одговара нивоу експресије испитиваног молекула. Резултати се приказују као проценат ћелија за која су се везала специфична, флуорохромом обележена антитела, што нам даје информацију о релативној заступљености појединих ћелијских популација, и/или као интензитет флуоресценције који омогућава процену експресије молекула.

### **3.3.5 Мерење концентрације цитокина у серуму испитаника методом проточне цитометрије**

#### *3.3.5.1 Принцип извођења теста*

За мерење концентрације цитокина у серуму пацијената и здравих испитаника користили смо FlowCytomix (Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit, eBioscience, Cat. No. BMS817FF) који омогућава квантитативну детекцију IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22 и TNF- $\alpha$ , методом проточне цитометрије.

FlowCytomix детекциони систем се заснива на коришћењу две групе флуоресцентних куглица микроскопске величине (4µm и 5µm), при чему унутар сваке групе постоје подгрупе куглица које се разликују по интензитету флуоресценције. За екситацију флуоресцентне боје може се користити аргонски, хелијум-неон или UV ласер, а емисија се мери на 690nm. Комбинација две величине и више интензитета



флуоресценције омогућавају разликовање до 20 сетова куглица на једном флуоресцентном каналу. Куглице из сваког сета су обложене антителима специфичним за молекуле које желимо да се детектујемо. Мешавина куглица се инкубира са узорцима (серум, крв, супернатанти културе ћелија) и молекули из узорка се везују за специфична антитела на куглицама. Додаје се мешавина секундарних антитела коњугованих са биотином која се специфично везују за молекуле везане антителима за куглице. Додаје се стрептавидин-фикоеритрин који се везује за биотин-коњугат и емитује се флуоресцентни сигнал. Јачина флуоресцентног сигнала зависи од количине испитиваног молекула у узорку. FlowCytomix сет садржи и протеине стандарде који омогућавају прављење стандардне криве помоћу које се израчунава количина испитиваног молекула у узорку. Овако формиран систем омогућује брзо и лако мерење већег броја анализата истовремено и из малог узорка (25µl).

За обраду резултата користили смо FlowCytomix Pro 3.0 Software (eBioscience, Cat. No. BMS8402FF).

#### 3.3.5.2 *Методологија FlowCytomix*

Мешавина куглица се припрема тако што се одређена количина сваког сета куглица ресуспендује у дилуционом пуферу (Reagent Dilution Buffer - RDB). Волумен зависи од броја узорка, при чему се узима у обзир и количина потребна за слепу пробу и стандарде. Суспензија се центрифугира 5 минута на 3000g. Течност се пажљиво уклони, дода се иста количина дилуционог пуфера и вортексује око 5 секунди.

За стандардну криву прави се мешавина стандарда у пуферу тако да разблажење сваког у финалној суспензији буде 1:20, а затим се праве серијска разблажења мешавине (укупно 7 разблажења). Мешавина биотин-коњугата (специфична антитела за које је везан биотин) припрема се тако што се одређена количина сваког биотин-коњугата ресуспендује у дилуционом пуферу (волумен зависи од броја узорка) тако да разблажење сваког у финалној суспензији буде 1:20. Streptavidin-PE раствор се прави тако што се концентровани стрептавидин-фикоеритрин разблажи у пуферу. У обележене епрувете се сипа по 25µl мешавине стандарда (епрувете 1-7 за 7 различитих разблажења), пуфера (за слепу пробу), првог разблажења мешавине стандарда (за подешавање проточног цитометра) и узорка. У сваку епрувету, укључујући и слепу пробу, дода се по 25µl припремљене мешавине куглица и 25µl мешавине биотин-коњугата. Узорци се добро промешају и инкубирају 2 сата на собној температури, заштићени од светла. По завршеној инкубацији у сваку епрувету се дода по 1 ml пуфера

и центрифугира 5 минута на 200g. Одбаци се супернатант тако да у свакој епрувети остане по 100 $\mu$ l течности, а затим се овај корак понови још једном. Затим се у сваку епрувету сипа по 50 $\mu$ l Streptavidin-PE раствора, добро промеша и инкубира 1 сат на собној температури, заштићено од светла. По завршеној инкубацији у сваку епрувету се дода по 1ml пуфера и центрифугира 5 минута на 200g. Одбаци се супернатант тако да у свакој епрувети остане по 100 $\mu$ l течности, а затим се овај корак понови још једном. На крају се у сваку епрувету сипа по 500 $\mu$ l пуфера и до анализирања на проточном цитометру чува на 2-8°C заштићено од светла, највише 24 сата.

### 3.3.6 Статистичка анализа

Након спроведеног лечења болесници су разврставани у подгрупе на два начина. На основу терапијског одговора на пацијенте са добрим (SVR) или лошим одговором на терапију (RR/NR) и на основу стадијума фиброзе на пацијенте са ниским/средњим (F0-F2) или високим (F3-F4) степеном оштећења јетриног паренхима. За приказивање категоријских варијабли коришћене су апсолутне вредности и њихова процентуална заступљеност у групама, а разлике у учесталости унутар релевантних подгрупа утврђене су  $\chi^2$  или Фишеровим тестом. За представљање континуираних нумеричких вредности, распоређених према типу нормалности, употребљена је средња вредност и стандардна девијација, а значајности разлике између аритметичких средина утврђене су Студентовим Т тестом за независне узорке. Вредности које нису распоређене према типу нормалности представљене су медијаном и интерквartilном разликом, а значајност је одређена непараметријским Вилкоксон или Ман-Витни У тестом. Разлике између пацијената пре и након терапије су анализирани применом упареног Т теста, односно једнофакторском анализом варијанси (ANOVA) или Фридмановим тестом поновљених мерења, у случају да дистрибуција није била нормална. За идентификацију фактора ризика и предиктивних фактора коришћена је бинарна логистичка регресија и резултати су представљени као унакрсни однос (OR од енг *Odds Ratio*) уз 95% интервал поверења и *p*-вредност. Сви параметри анализирани су у униваријантном моделу, а статистички значајни укључени су у мултиваријантну анализу. Међусобна повезаност посматраних варијабли и јачина везе испитивана је тестовима линеарне регресије и корелације (одређивањем Пирсон/Спирман коефицијената). Статистичка значајност одређивана је на нивоу  $p < 0,05$  коришћењем статистичког софтвера SPSS (верзија 18).

## 4 РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Повезаност предиктивних фактора и исхода инфекције и терапије

Исход акутне HCV инфекције, али и одговор на примењену терапију зависе од бројних фактора, како домаћина, тако и вируса. Најзначајнији предиктори успостављања повољног исхода инфекције и терапије су старост, пол, фактори ризика (начин трансмисије), ниво аминотрансфераза, базални ниво виремије, генотип вируса, коинфекција са HBV или HIV вирусом, злоупотреба алкохола, стеатоза јетре и стадијум фиброзе јетриног паренхима.

#### 4.1.1 Основне карактеристике пацијената са HCV инфекцијом

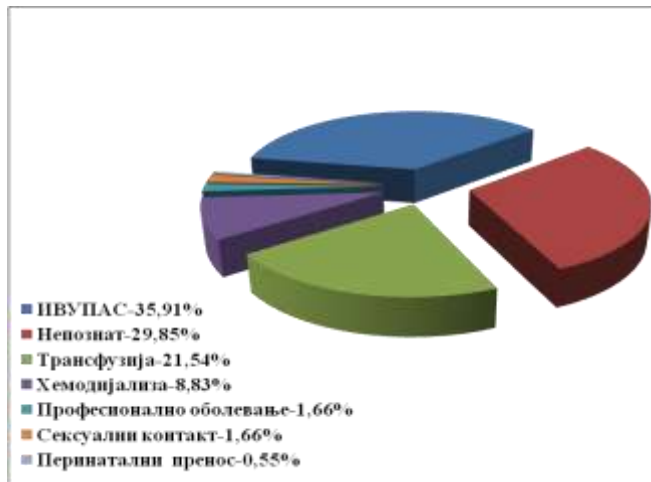
У истраживање је укључен 181 болесник са хроничном HCV инфекцијом, просечне старости 41 годину. Готово две трећине испитаника, 66% (119/181), су биле особе мушког пола, док су жене биле заступљене у знатно нижем проценту чинећи 34% (62/181) испитаника ( $p < 0.001$ ). Просечна вредност базалне виремије износила је 7.401.420 IU/ml, а медијана 3.505.210 IU/ml, просечне вредности трансминаза су биле: AST=116 IU/L, ALT=148 IU/L, док је просечна вредност AFP1 износила 2,78 ng/ml (Табела 4.1.)

Табела 4.1. Основне карактеристике болесника у испитиваној групи.

	Вредност
Број испитаника	181
Старост (године)	41 ± 12,2
Пол (м/ж)	119/62 (66/34%)
HCV RNK (копије/ml x 10 <sup>6</sup> )	3.5 ± 5.5
AST (IU/L)	116 ± 59.9
ALT (IU/L)	148 ± 86.2
AFP1 (ng/ml)	2.8 ± 2.6

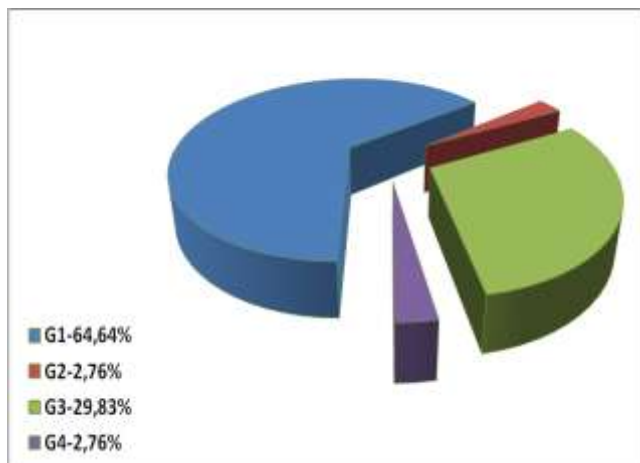
Најчешћи фактор ризика у испитиваној групи била је интравенска употреба психоактивних супстанци (ИВУПАС) забележена код 35,91% (65/181) испитаника, затим трансфузија крви код 21,54% (39/181) испитаника и хемодијализа у 8,83% (16/181) случајева. Сексуални контакт и професионално оболевање (медицинско особље) били су фактор ризика за по 1,66% (3/181) испитаника, док је перинатални пренос забележен само у једном случају 0,55% (1/181). За 29,85% (54/181) испитаника, фактори ризика били су нам непознати (Графикон 4.1.). Разлике у заступљености

фактора ризика за оболевање од HCV инфекције достижу статистичку значајност ( $p < 0.001$ ).



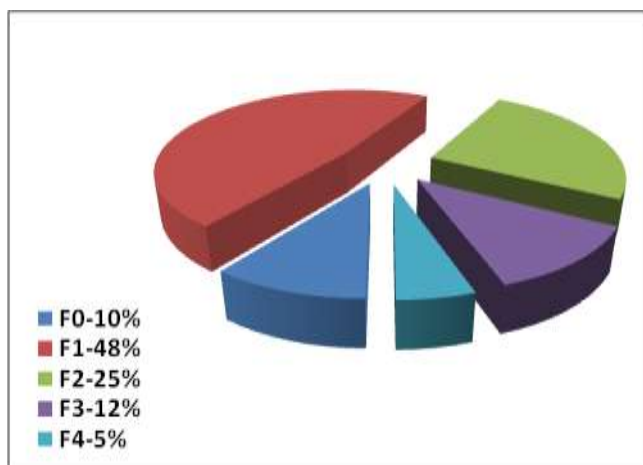
**Графикон 4.1.** Фактори ризика код пацијената са хроничном HCV инфекцијом.

Резултати заступљености појединих генотипова вируса, показали су да постоји статистички значајна разлика у учесталости појединих генотипова ( $p < 0.001$ ). Наиме највећу заступљеност показао је генотип 1 са 64,64% (117/181) испитаника, затим генотип 3 са 29,83% (54/181) испитаника, док је заступљеност генотипова 2 и 4 била знатно нижа и износила је по 2,76% (5/181) испитаника (Графикон 4.2.).



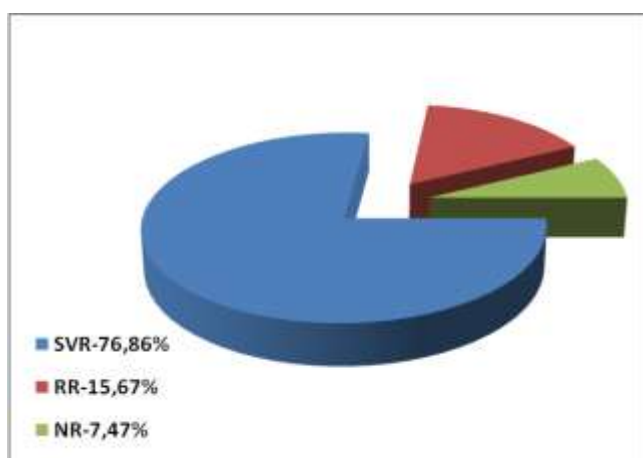
**Графикон 4.2.** Заступљеност генотипова вируса код пацијената са хроничном HCV инфекцијом.

За 159 испитаника, имали смо резултате патохистолошке анализе биоптата јетре. Резултати су показали да постоји статистички значајна разлика у дистрибуцији стадијума фиброзе ( $p < 0.001$ ). Испитаници код којих није забележено оштећење јетриног ткива (F0) представљени су са 10% (16/159) од укупног броја. Највећи број испитаника, њих 48% (76/159), имао је лаку фиброзу (F1). Са умереном фиброзом (F2) било је 25% (40/159) испитаника, док је 12% (19/159) испитаника имало тешки облик фиброзе (F3). Најтежи стадијум фиброзе јетре (цироза), фиброзу четвртог стадијума (F4) забележили смо код 5% (8/159) испитаника. (Графикон 4.3.).



**Графикон 4.3.** Стадијуми фиброзе код пацијената са хроничном HCV инфекцијом

Одговор на терапију пратили смо код 134 испитаника и на основу резултата формирали смо три групе: Прву групу представљали су испитаници са трајним вирусолошким одговором (SVR - од енг. *Sustained Viral Response*) које карактерише одсутност вируса у крви (недетектабилна HCV RNK <50IU/ml) 6 месеци након завршетка терапије. Ову групу чинило је 76,86% (103/134) испитаника. Другу групу, представљали су релапсери тј. испитаници код којих је забележено поновно јављање вирусне RNK након завршетка терапије (RR- од енг. *Responder-Relapser*). У овој групи је било 15,67% (21/134) испитаника. Трећу групу представљали су нон-респондери (NR- од енг. *Non-Responder*), испитаници који нису постигли рани вирусолошки одговор, тј. испитаници којима број вирусних копија у крви, након 12 недеља лечења, није пао за 99% или 2 логаритма у односу на почетну вредност виремије. Код ових испитаника се и после 24 недеља лечења, вирус ипак детектује у крви. Ових испитаника је било 7,47% (10/134). (Графикон 4.4.).



**Графикон 4.4.** Терапијски одговор код пацијената са хроничном HCV инфекцијом

#### 4.1.2 Пол, старосна доб и виремија као предиктивни фактор

Заступљеност полова у нашој студијској популацији је била неравномерна, тако да је готово две трећине испитаника укључених у нашу студију било мушког пола, док су жене биле заступљене у знатно нижем проценту чинећи једну трећину укупног броја испитаника ( $p < 0.001$ ). Просечна старост испитаника (37 година) је била статистички значајно низа у односу на старост испитаница (44 године) ( $p = 0.041$ ).

Ниво базалне виремије (медијана) особа мушког и женског пола укључених у ову студију се није значајно разликовао и износио је 3.027.600IU/ml за мушкарце и 3.712.500IU/ml за жене ( $p = 0.398$ ). Насупрот томе, учесталост појединих фактора ризика показује различиту полну дистрибуцију ( $p = 0.002$ ). Наиме, ИВУПАС је са учесталашћу од 44% најчешћи фактор ризика за мушкарце, док се на другом и трећем месту налазе трансфузија са 15% и дијализа са 9% испитаника. Насупрот томе, код особа женског пола на првом месту се са 34% случајева налази трансфузија, а затим ИВУПАС са 21% и дијализа са 8% случајева. Учесталост различитих генотипова HCV између особа мушког и женског пола је готово идентична и не разликује се од учесталости у односу на читаву групу испитаника ( $p = 0.948$ ). Слично, ниво оштећења јетриног паренхима не показује полно зависну дистрибуцију иако је у групи мушкараца забележена нешто мања учесталост виших стадијума фиброзе ( $p = 0.502$ ). Полно зависна дистрибуција није показана ни у случају терапијског одговора иако су особе мушког пола имале нешто виши проценат испитаника са повољним одговором на терапију ( $p = 0,944$ ) (Табела 4.2.).

Старост испитаника и базални ниво виремије као континуиране нумеричке вредности анализиране су међусобно и у односу на стадијум фиброзе употребом Пирсоновог теста корелације. Резултати анализе су показали да су старост испитаника и ниво базалне виремије у слабој позитивној корелацији која достиже ниво статистичке значајности ( $r = 0.176$ ,  $p = 0.018$ ).

Сличан резултат је добијен и анализом повезаности виремије и стадијума фиброзе ( $r = 0.178$ ,  $p = 0.018$ ). Са друге стране, истим тестом је, уз високу статистичку значајност, показано да између броја година испитаника и стадијума фиброзе постоји позитивна корелације, тако да се са повећањем броја година живота повећава и стадијум фиброзе ( $r = 0.434$ ,  $p < 0.001$ ).

*Табела 4.2. Пол као предиктивни фактор*

<b>Карактеристике болесника</b>	<b>Мушкарци n=119</b>	<b>Жене n=62</b>
Учесталост %	<b>66%</b>	34%
Године	37 ± 11.0	<b>44 ± 13.1</b>
HCV RNK (копије/ml x 10 <sup>6</sup> )	3.0 ± 5,1	3.7 ± 5,7
Фактори ризика %		
ИВУПАС	<b>44%</b>	21%
Трансфузија	15%	<b>34%</b>
Дијализа	9%	8%
Сексуално	2%	2%
Професионално	1%	3%
Перинатално	0%	2%
Непознат	29%	31%
Генотип %		
G1	64%	66%
G2	3%	3%
G3	31%	27%
G4	3%	3%
Стадијум %		
F0%	8%	13%
F1%	55%	34%
F2%	22%	32%
F3	10%	15%
F4	5%	6%
Одговор %		
SVR	78%	74%
RR/NR	22%	26%

#### **4.1.3 Пут инфекције као предиктивни фактор**

Интравенска употреба психоактивних супстанци је најчешћи фактор ризика и уједно најчешћи начин преношења HCV у нашој популацији пацијената, док се трансфузија и дијализа као фактори ризика налазе на другом и трећем месту. Обзиром да се други фактори ризика (сексуални контакт, професионални ризик, перинатално преношење) јављају у занемарљивом проценту испитаника (5%) у даљој анализи смо разматрали само три најбитнија фактора ризика.

Просечна старост испитаника ИВУПАС групе (33 године) је била статистички значајно нижа у односу на пацијенте који су заражени трансфузијом (54 године) или

дијализом (47 година) ( $p < 0.001$ ). У односу на трансфузију и дијализу, испитаници из ИВУПАС групе су знатно чешће били мушког пола. У групи пацијената који су заражени трансфузијом, мушкарци су чинили свега 46%, док је у групи испитаника инфицираних дијализом тај проценат био виши (69%), мада још увек нижи у односу на ИВУПАС групу где су мушкарци чинили чак 80% испитаника ( $p = 0.002$ ). Пут инфекције је повезан и са нивоом базалне виремије која је знатно нижа у ИВУПАС групи (5.931.493 IU/ml) него у групи пацијената који су заражени трансфузијом (8.841.043 IU/ml) или дијализом (9.067.889 IU/ml).

Табела 4.3. Пут инфекције као предиктивни фактор

Карактеристике болесника	ИВУПАС n=65	Трансфузија n=39	Дијализа n=16	Сексуално n=3	Професионално n=3	Перинатално n=1	Непознато n=54
Учесталост %	<b>36%</b>	22%	9%	2%	2%	1%	30%
Године	33 ± 9,8	<b>54 ± 16,0</b>	<b>47 ± 13,9</b>	45 ± 13,3	50 ± 14,8	19 ± 5,6	40 ± 11,9
Пол (ж/м) %	<b>20/80%</b>	54/46%	31/69%	33/67%	33/67%	100/0%	35/65%
HCV RНК (копије/ml × 10 <sup>6</sup> )	5.9 ± 9.2	<b>8.8 ± 13.8</b>	<b>9.0 ± 14.1</b>	9,5 ± 14.9	6.9 ± 10.8	0.9 ± 1.4	6.8 ± 10.7
Генотип %							
G1	49%	<b>79%</b>	<b>81%</b>	67%	33%	100%	69%
G2	0%	5%	6%	0%	33%	0%	2%
G3	<b>46%</b>	13%	13%	33%	33%	0%	27%
G4	5%	3%	0%	0%	0%	0%	2%
Стадијум %							
F0%	<b>8%</b>	3%	0%	0%	0%	100%	16%
F1%	<b>65%</b>	<b>29%</b>	0%	100%	33%	0%	40%
F2%	<b>25%</b>	<b>23%</b>	0%	0%	3%	0%	30%
F3	0%	<b>31%</b>	<b>50%</b>	0%	33%	0%	12%
F4	2%	<b>14%</b>	<b>50%</b>	0%	0%	0%	2%
Одговор %							
SVR	<b>87%</b>	58%	64%	67%	67%	100%	86%
RR/NR	13%	<b>42%</b>	<b>46%</b>	33%	33%	0%	14%

Ипак, забележене разлике не достижу ниво статистичке значајности ( $p = 0.120$ ). Иако је генотип 1 био најчешће детектован у читавој групи испитаника, његова учесталост код пацијената који су инфицирани путем трансфузије (79%) или дијализом (81%) је била знатно виша у односу на ИВУПАС групу у којој је овај генотип био забележен код приближно сваког другог пацијента (49%). Са друге стране генотип 3 који је у осталим групама забележен у релативно ниском проценту је у групи ИВУПАС пацијената био заступљен скоро као и генотип 1 (46%) ( $p < 0.001$ ). Анализом стадијума фиброзе код испитаника који имају различите факторе ризика утврдили смо да готово сви пацијенти из ИВУПАС групе, њих чак 98%, има неки од нижих стадијума фиброзе



(F0-F2), док је тај проценат код пацијената заражених трансфузијом знатно нижи (55%). Значајан је податак да у групи пацијената заражених дијализом, ниједан испитаник није имао фиброзу нижег стадијума (0%). Сходно томе, сви пацијенти ове групе су имали фиброзу вишег стадијума и то подједнако F3 (50%) и F4 (50%), док је у ИВУПАС групи само 1 испитаник имао фиброзу највишег стадијума F4 (2%) ( $p < 0.001$ ). На крају, разлике између испитиваних група су биле уочљиве и у одговору на терапију. Наиме, проценат пацијената који су повољно одговорили на терапију је статистички значајно виши у групи ИВУПАС испитаника (87%) него у друге две групе (трансфузија: 58%, дијализа 64%). Супротно томе, пацијенти који су неповољно одговорили на терапију су били знатно чешће заступљени у групи пацијената заражених трансфузијом (42%) или дијализом (46%), него у групи ИВУПАС пацијената (13%) ( $p = 0.008$ ) (Табела 4.3.).

#### 4.1.4 Генотип вируса као предиктивни фактор

Генотип вируса је клинички важан у предвиђању терапијског одговора и дужине лечења интерфероном. У нашој групи испитаника најчешће је дијагностикован генотип 1, а затим генотип 3. Генотип 2 и генотип 4 су детектовани у свега 6% испитаника, тако да смо у даљој анализи поредили само два најчешће откривена генотипа, G1 и G3.

Просечна старост испитаника ове студијске популације се кретала од 37 до 46 година, при чему је просечна старост испитаника G3 групе (37 године) била статистички значајно нижа у односу на пацијенте G1 групе (43 година) ( $p = 0.005$ ). Између испитиваних група нису забележене разлике у полној дистрибуцији ( $p = 0.948$ ). Иако је ниво базалне виремије у групи пацијената код којих је детектован генотип 1 (3.953.000 IU/ml) биле више у односу на групу пацијената са генотипом 3 (2.605.500 IU/ml), те разлике не достижу ниво статистичке значајности ( $p = 0.208$ ). Са друге стране, анализирајући повезаност вирусног генотипа и фактора ризика утврдили смо да је ИВУПАС као фактор ризика у 56% случајева удружен са генотипом 3, док су ИВУПАС (27%) и трансфузија (26%) равномерно удружени са генотипом 1 ( $p < 0.001$ ). Генотип вируса је повезан и са тежином оштећења јетриног паренхима. Наиме, утврдили смо да је генотип 1 удружен са вишим стадијумима фиброзе (F3 и F4) у 23% случајева, што је статистички значајно више у односу на пацијенте који су инфицирани генотипом 3 код којих се виши стадијуми фиброзе детектују у само 4% случајева ( $p = 0.019$ ).

Одговор на терапију је у нашој популацији био статистички високо повезан са генотипом вируса. Неповољан терапијски одговор смо два пута чешће детектовали у

групи пацијената са генотипом 1 (26%) него у групи пацијената који су инфицирани генотипом 3 (13%) ( $p=0.0038$ ) (Табела 4.4.).

Табела 4.4. Генотип вируса као предиктивни фактор

Карактеристике болесника	G1 n=117	G2 n=5	G3 n=54	G4 n=5
Учесталост %	<b>64%</b>	3%	30%	3%
Године	<b>43 ± 12.8</b>	46 ± 13.7	37 ± 11.0	41 ± 12.2
Пол (ж/м) %	35/65%	40/60%	32/68%	32/68%
HCV RNK (копије/ml x 10 <sup>6</sup> )	3.9 ± 6.1	2.6 ± 4.0	2.6 ± 4.0	1.0 ± 1.6
Фактори ризика %				
ИВУПАС	<b>27%</b>	0%	<b>56%</b>	60%
Трансфузија	<b>26%</b>	40%	9%	20%
Дијализа	11%	20%	4%	0%
Сексуално	2%	20%	2%	0%
Професионално	1%	0%	2%	0%
Перинатално	1%	0%	0%	0%
Непознат	32%	20%	27%	20%
Стадијум %				
F0%	12%	0%	<b>8%</b>	20%
F1%	43%	0%	<b>56%</b>	80%
F2%	22%	33%	<b>32%</b>	0%
F3	<b>16%</b>	67%	2%	0%
F4	<b>7%</b>	0%	2%	0%
Одговор %				
SVR	74%	50%	<b>87%</b>	100%
RR/NR	<b>26%</b>	50%	13%	0%

#### 4.1.5 Повезаност предиктивних фактора и стадијума фиброзе код пацијената са HCV инфекцијом

Након акутне фазе болести која је обично субклиничка, спонтана резолуција HCV инфекције догађа се само код малог броја оболелих. Најчешће инфекција добија карактеристике хроничне болести чији је резултат стално присутан процес инфламације, регенерације и фиброзе, па у великом броју случајева коначно долази до знатног оштећења јетриног ткива па чак и до развоја цирозе и хепатоцелуларног карцинома. Имајући све ово у виду, ми смо испитанике у зависности од стадијума оштећења (фиброзе) јетриног ткива, поделили у две групе. У првој групи су били пацијенти без фиброзе F0, пацијенти са лаком F1 и умереном F2 фиброзом. Ову групу

је чинило 132 испитаника. Друга група је била састављена од 27 испитаника код којих је верификована тешка F3 фиброза и фиброза четвртог стадијума F4 (цироза).

Између формираних група постојала је статистички значајна разлика у старости испитаника ( $p < 0.001$ ). Наиме просечна старост у првој групи испитаника била је 38 година а у другој групи испитаника 54 година. Са друге стране, у случају полне дистрибуције, није забележена статистички значајна разлика ( $p = 0.502$ ). У првој групи испитаника 68% (90/132) су чинили мушкарци а 32% (42/132) жене, док је у другој групи било 59% (16/27) мушкараца и 41% (11/27) жена. Анализа вредности базалне виремије у испитиваним групама показују статистички значајну разлику ( $p < 0.042$ ). Медијана вредност базалне виремије у групи испитаника без или са нижим стадијумом фиброзе је износила 2.581.200IU/ml., док је код испитаника са вишим стадијумом фиброзе била 5.589.000IU/ml. Између испитиваних група није забележена разлика у медијана вредностима AST, ALT и AFP1. (Табела 4.5.).

*Табела 4.5. Основне карактеристике пацијената са различитим стадијумом фиброзе*

<b>Карактеристике болесника</b>	<b>F0-F2 (n =132)</b>	<b>F3-F4 (n =27)</b>
Старост (године)	38 ± 11.3	54 ± 16.0
Пол (м/ж)%	68/32%	59/41%
HCV RNK (копије/ml x 10 <sup>6</sup> )	2.5 ± 3.9	5.6 ± 8.8
AST (IU/L)	135 ± 69.7	115 ± 59.3
ALT (IU/L)	157 ± 91.4	149 ± 86.7
AFP1 ng/ml	2.54 ± 2,1	4.14 ± 3.6

Анализа фактора ризика за оболевање од HCV инфекције показала је да између формираних група испитаника постоји статистички значајна разлика у учесталости појединих фактора ризика ( $p < 0.001$ ). У првој групи испитаника најчешћи фактор ризика је ИВУПАС забележен код 48,5% (64/132) испитаника, док је ИВУПАС у другој групи испитаника заступљена са свега 3,7% (1/27) испитаника. За значајан проценат испитаника из прве групе, фактор ризика за оболевање од HCV инфекције била је трансфузија крви, за њих 14,4% (19/132), док је у другој групи испитаника трансфузија као фактор ризика по учесталости на првом месту, са 59,3% (16/27) испитаника. Хемодијализа као фактор ризика за оболевање од HCV инфекције није била забележена међу испитаницима F0-F2 групе, али је са 7,4% (2/27) учесталости била на другом месту код испитаника F3-F4 групе. Остали фактори ризика за оболевање од HCV инфекције међу формираним групама су процентуално дати у Табели 4.6.

**Табела 4.6.** Фактори ризика за оболевање од HCV инфекције код пацијената са различитим стадијумом фиброзе.

Фактори ризика	F0-F2 (n =132)	F3-F4 (n =27)
ИВУПАС	48,5%	3,7%
Трансфузија крви	14,4%	59,3%
Хемодијализа	0,0%	7,4%
Сексуални контакти	2,3%	0,0%
Професионално оболевање	1,5%	3,7%
Перинатална трансмисија	0,7%	0,0%
Непознат	32,6%	25,9%
Укупно	100%	100%

Резултати заступљености генотипова вируса показују да постоји значајна статистичка разлика у учесталости појединих генотипова код испитиваних група ( $p=0.019$ ). Наиме, иако је генотип 1 најчешћи у обе испитиване групе, учесталост овог генотипа је значајно већа у групи пацијената са вишим стадијумом фиброзе. У првој групи испитаника генотип 1 је заступљен са 57,58% (76/132) испитаника, док је у другој групи тај проценат знатно виши и износи 85,18% (23/27). На другом месту по учесталости се налази генотип 3, који је у првој групи забележен у 37,87% (50/132) случајева, док је тај генотип у другој групи заступљен у само 7,41% (2/27) испитаника. Насупрот, генотип 2 и 4 су слабије заступљени у популацији пацијената. Генотип 2 је у групи пацијената са вишим стадијумом фиброзе забележен у 7,41% (2/27), док генотип 4 није детектован ни у једном случају. У првој групи генотип 2 забележен је само код једног болесника што износи 076% (1/132), док је генотип 4 заступљен у 3,79% (5/132) случајева (Табела 4.7.).

**Табела 4.7.** Заступљеност генотипова вируса код пацијената са различитим стадијумом фиброзе

Генотип	F0-F2 (n=132)	F3-F4 (n =27)
G1	57,6%	85,2%
G2	0,7%	7,4%
G3	37,9%	7,4%
G4	3,8%	0.0%
Укупно	100%	100%

Униваријантном логистичком регресијом, као значајни предиктивни фактори издвојили су се старост испитаника и генотип. Резултати показују да развој виших стадијума фиброзе зависи од старости испитаника ( $p<0.001$ ) тако да свака година живота повећава шансу за настанак тешке фиброзе за 9,5% (Odds ratio=1,095; 95% CI=1,050-1,142;  $p<0.001$ ). Униваријантна логистичка регресија је показала да генотип 2

носи око 7 пута мањи ризик за настанак теже фиброзе од генотипа 1 (Odds ratio = 0,132; 95% CI=0,300-0,585;  $p=0.008$ ). У мултиваријантном моделу као најзначајнији предиктивни фактор издвојила се старост испитаника. Резултати показују да свака година живота повећава шансу за настанак тешке фиброзе за 10,7% (Odds ratio=1,107; 95% CI=1,065-1,152;  $p<0.001$ ). Пол, базална виремија, фактори ризика и генотип вируса не представљају статистички значајне предиктивне факторе.

#### **4.1.6 Повезаност предиктивних фактора и одговора на терапију код пацијената са HCV инфекциом**

Одговор на терапију пратили смо код 134 болесника, и на основу тога испитанике сврстали у три групе: SVR, RR и NR. Обзиром да испитаници из група RR и NR представљају пацијенте који нису повољно одговорили на терапију, у статистичкој анализи смо испитанике ових група сврстали у исту групу пацијената са неповољним терапијским одговором, док су SVR пацијенти чинили групу испитаника са повољним одговором на терапију.

Анализа старосне доби испитаника је показала да постоји статистички значајна разлика ( $p=0,016$ ) у старосној дистрибуцији између пацијената са повољним и неповољним одговором на терапију. Резултати су показали да је повољан одговор на терапију (SVR), учесталији код млађих пацијената. Просечна старост испитаника у овој групи била је 40 година, за разлику од групе испитаника са неповољним одговором на терапију (RR/NR), где је средња вредност старосне доби износила 46 година. Заступљеност полова међу утврђеним групама се није разликовала ( $p=0,944$ ). У групи испитаника са SVR одговором 64% (66/103) су били мушкарци, а 36% (37/103) жене. Код испитаника са RR/NR одговором мушкарци су били заступљени са 61% (19/31), а жене 39% (12/31). Анализа базалног нивоа HCV RНК показала је статистички значајне разлике између испитиваних група болесника ( $p=0,020$ ). Број вирусних честица регистрован у групи испитаника са повољним одговором на терапију је био 3.145.500IU/ml, док је у групи испитаника са неповољним одговором износио 6.095.500IU/ml. Такође, статистички значајна разлика утврђена је и за вредности трансминаза. Медијана вредности AST ( $p=0,026$ ) и ALT ( $p=0,029$ ) су биле ниже у групи пацијената са повољним одговором у односу на групу са неповољним одговором на терапију. Иако пацијенти са неповољним одговором имају више серумске вредности AFP1, између испитиваних група није забележена статистички значајна разлика. (Табела 4.8.).

**Табела 4.8.** Основне карактеристике код пацијената са различитим одговором на терапију

<b>Карактеристике болесника</b>	<b>SVR (n=103)</b>	<b>RR/NR (n=31)</b>
Старост (године)	40 ± 11.9	46 ± 13.7
Пол (м/ж)%	64/36%	61/39%
HCV RNK (копије/ml x 10 <sup>6</sup> )	3.1	6.0
AST (IU/L)	105 ± 54.2	135 ± 69.7
ALT (IU/L)	143 ± 83.2	181 ± 105.4
AFP1 ng/ml	2.5 ± 2.3	4.3 ± 4.0

Анализирајући учесталост фактора ризика за оболелевање од HCV инфекције утврдили смо да између група испитаника формираних на основу одговора на терапију постоји статистички значајна разлика ( $p=0.008$ ). Најчешћи фактор ризика код испитаника са повољним одговором на терапију (SVR) била је ИВУПАС са 38%, (39/103), док су трансфузија са 17% (18/103) и хемодијализа са 9% (9/103) испитаника на другом и трећем месту. Насупрот, у групи пацијената са неповољним одговором (NR, RR), најчешћи фактор ризика је трансфузија са 42% (13/31) испитаника, на другом месту је ИВУПАС са 19% (6/31), а затим хемодијализа са 16% (5/31) испитаника. Остали фактори ризика забележени су у знатно нижем проценту (Табела 4.9.).

**Табела 4.9.** Фактори ризика за оболелевање од HCV инфекције у групи испитаника са различитим одговором на терапију

<b>Фактори ризика</b>	<b>SVR (n=103)</b>	<b>RR/NR (n=31)</b>
ИВУПАС	38%	19%
Трансфузија крви	17%	42%
Хемодијализа	9%	16%
Сексуални контакти	2%	3%
Професионално оболелевање	2%	3%
Перинатална трансмисија	1%	0%
Непознат	31%	17%
Укупно	100%	100%

Посматрајући одговор на терапију у односу на генотип вируса, утврдили смо да између формираних група постоје статистички значајне разлике ( $p=0,0038$ ). Иако је генотип 1 најзаступљенији у обе групе испитаника, његова учесталост је већа код болесника са неповољним одговором код којих је овај генотип регистрован у 77% (24/31) случајева, док се у групи пацијената са повољним одговором овај генотип јавља у 65% (67/103) случајева. На другом месту по учесталости је генотип 3 који је чешћи у групи пацијената са SVR одговором где је забележен у 32% (33/103) случајева, у односу на RR/NR групу где се јавља у 16% (5/31). Генотип 2 регистрован је у групи болесника

са RR/NR одговором у 7% (2/31), а у групи са SVR одговором у 2% (2/103) болесника. Генотип 4 је детектован само код једног пацијента у SVR групи. (Табела 4.10.).

**Табела 4.10.** Заступљеност генотипова у групи испитаника са различитим одговором на терапију

Генотип	SVR (n=103)	RR/NR (n=31)
G1	65%	77%
G2	2%	7%
G3	32%	16%
G4	1%	0%
Укупно	100%	100%

Повезаност одговора на терапију и фиброзе пратили смо код 117 болесника. Испитанике смо у зависности од стадијума оштећења (фиброзе) јетриног ткива, поделили у две групе. У првој групи су били пацијенти без фиброзе F0, пацијенти са лакоом F1 и умереном F2 фиброзом, укупно 91 испитаник. Друга група је била састављена од 26 испитаника код којих је верификована тешка F3 фиброза и фиброза четвртог стадијума F4 (цироза). Иако су пацијенти без фиброзе или са лакшим стадијумом фиброзе (F0-F2) били бројнији у обе групе испитаника, овај проценат је знатно виши у групи пацијената са повољним терапијским одговором у односу на пацијенте са неповољним одговором (SVR: 88%, 80/91; RR/NR: 65%, 17/26). Насупрот томе, пацијенти са тежим стадијумом фиброзе (F3-F4) су готово три пута чешће регистровани у групи пацијената са неповољним одговором на терапију (SVR: 12%, 11/91; RR/NR: 35%, 9/26). Утврђене разлике достижу статистичку вероватноћу ( $p=0.017$ ) (Табела 4.11).

**Табела 4.11.** Стадијум фиброзе код пацијената са различитим одговором на терапију

Стадијум фиброзе	SVR (n=91)	RR/NR (n=26)
F0-F2	88%	65%
F3-F4	12%	35%
Укупно	100%	100%

Од параметара анализираних у униваријантном моделу, као значајни предиктивни фактори издвојили су се старост испитаника, фактори ризика и стадијум фиброзе. Резултати су показали да терапијски одговор зависи од година старости, тако да се шанса за добар терапијски одговор смањује за 3.5 % са сваком годином живота (Odds ratio=0.965; 95% CI=0.935–0.997;  $p=0.032$ ). Поред тога одговор на терапију зависи од фактора ризика ( $p=0.013$ ). Трансфузија, у односу на ИВУПАС, смањује

шансу од доброг одговора око 5 пута (Odds ratio=0.178; 95% CI=0.055 – 0.574;  $p=0.004$ ). Хемодијализа, у односу на ИВУПАС, смањује шансу од доброг одговора око 4 пута (Odds ratio=0.231; 95%CI=0.055 – 0.970;  $p=0.045$ ). Овим моделом је такође показано да одговор на терапију зависи и од стадијума фиброзе. Виши стадијуми фиброзе (F3-F4) смањују шансу од доброг одговора око 4 пута (Odds ratio= 0.260; 95% CI= 0.093 – 0.724;  $p=0.010$ ). Резултати мултиваријантног модела пак, показују да се као најзначајнији предиктивни фактор издвајају фактори ризика ( $p=0.013$ ) и то трансфузија која смањује шансу доброг одговора око 6 пута (Odds ratio=0.160; 95% CI=0.048 – 0.533;  $p=0.003$ ).

## **4.2 Анализа популација моноклеарних ћелија јетре методом имунохистохемије**

Применом одговарајућих моноклонских антитела специфичних за одређене врсте молекула у једру, цитоплазми или на мембрани хепатоцита, могућа је визуелизација комплекса антиген-антитело а самим тим и одређивање броја ћелија које су експримирале специфични молекул, као и интензитета те експресије. У нашем истраживању користили смо специфична антитела за имунохистохемијско одређивање нивоа експресије CD4, CD8, CD14, CD20, Foxp3, DC-SIGN и PD1.

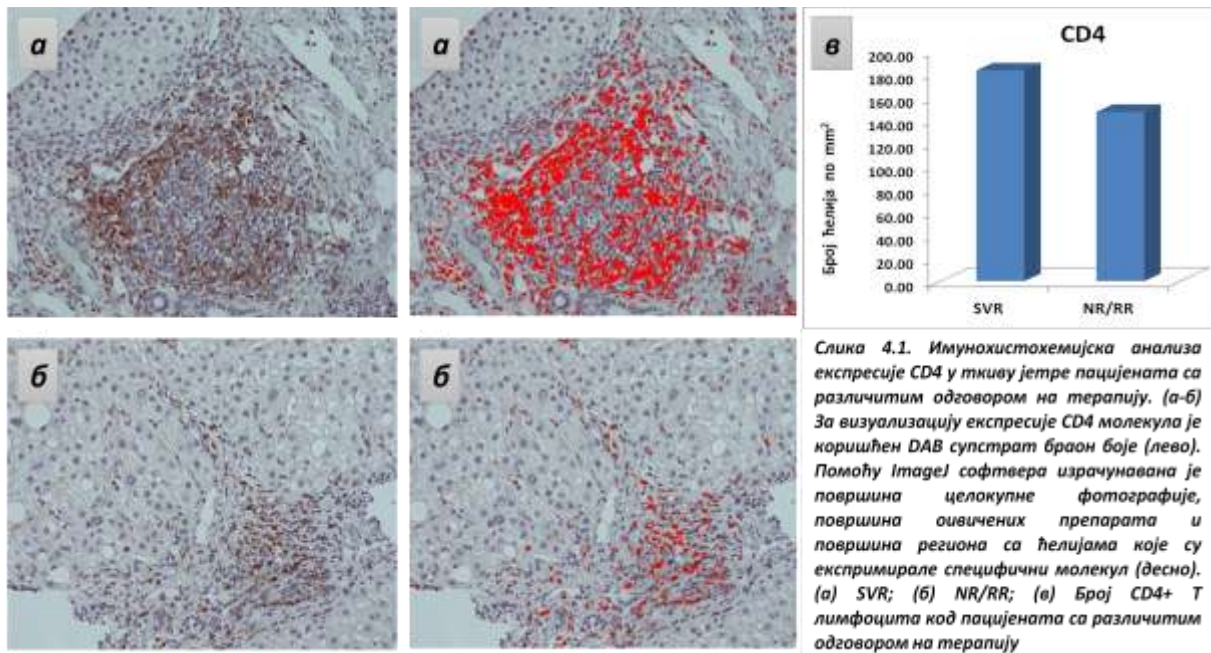
### **4.2.1 Учесталост популација моноклеарних леукоцита код пацијената са различитим одговором на терапију**

Све наведене испитанике смо на основу одговора на терапију, поделили у две групе. У првој групи је било 11 испитаника са повољним одговором на терапију (SVR), од чега је њих 5 (45%) било женског пола, док је испитаника мушког пола био 6 (55%). Просечна старост испитаника ове групе је износила 40 година. У овој групи испитаника најзаступљенији генотип је био G1 са 64% (7/11), док је генотип G3 био заступљен са 36% (4/1) испитаника. Осталих генотипова није било. Патохистолошка евалуација градуса и стадијума хепатитиса извршена је применом скоринг система по *Кноделу* и *Исаку*. *Кнодел скор* медиана је износила 8 (перипортна некроза-1, интралобуларна некроза-3 и портална инфламација-1), док је медиана *Кнодел фиброзе* износила 1. Анализом по *Исаку* добијене су сличне вредности. Медиана *Исак градуса* износила је 8 (перипортални хепатитис-1, конфлуентна некроза-1, интралобуларна инфламација-3 и портална инфламација-3), док је медијана *Исак стадијума* 1. Другу групу са истим бројем испитаника (11) су чинили испитаници са неповољним одговором на терапију (NR/RR). Старосна и полна дистрибуција у овој групи су биле сличне као у групи испитаника са



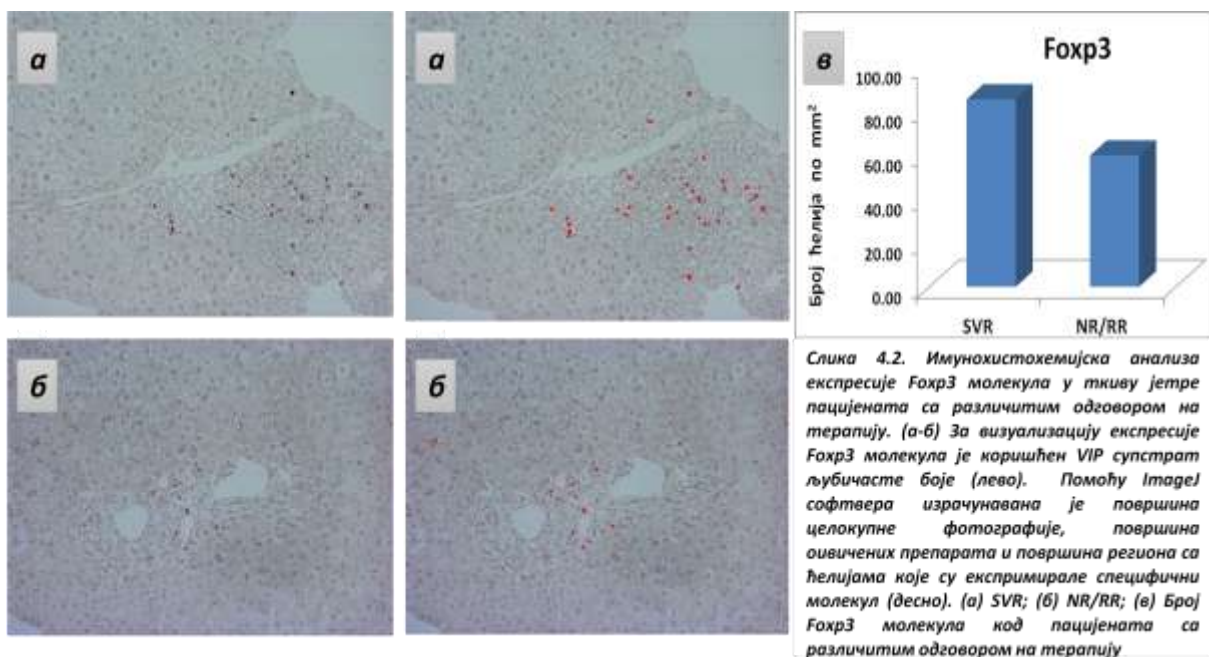
повољним одговором, уз нешто већу заступљеност испитаника мушког пола (М: 7/11, 64%; Ж: 4/11), 36%), просечне староси 40 година. И у овој групи је начешћи генотип био G1, представљен истим процентом као и у првој групи са 64% (7/11), генотип G3 је имало 27% (3/11) испитаника, али је у овој групи у једном случају регистрован и генотип G4 (9%). Пацијената са генотипом G2 није било. Патохистолошка евалуација, применом наведених скоринг система, је показала да су формиране групе готово идентичног градуса и стадијума хепатитиса. Наиме, медиана вредност за *Кнодел скор* износила је 8, а за *Кнодел фиброзу* 1. По *Исаковом* скоринг систему медиана *Исак градуса* износила је 8, а *Исак стадијума* 1.

Имунохистохемијски резултати експресије CD4, CD8, CD14, CD20, Foxp3, DC-SIGN и PD1 у наведеним групама су показали да између пацијената са повољним одговором на терапију и пацијената са неповољним одговором на терапију постоје значајне разлике у броју и локализацији различитих популација мононуклеарних леукоцита у ткиву јетре. Сумарно, пацијенти са повољним одговором на терапију имају значајно већи број CD4+ и Foxp3+ ћелија у односу на пацијенте са неповољним одговором, док је са друге стране број CD8+ ћелија значајно виши у NR/RR групи пацијената у односу на SVR групу. Између испитиваних група није постојала разлика у броју CD20+, CD14+, DC-SIGN+ и PD1+ ћелија.



CD4+ позитивни лимфоцити доминантно су локализовани у портним просторима. Ако су присутни лимфоидни фоликули често су гушће распоређени на њиховој периферији. У много мањем броју, уочавају се и у зонама конфлуентних мостних некроза и формираним везивним септумима, а само ретко интралобуларно, као појединачни CD4+ ћелијски елементи (Слика 4.1.). На приказаним препаратима је јасно уочљиво да су CD4+ позитивни лимфоцити присутни у знатно мањем броју код пацијената са неповољним одговором на терапију.

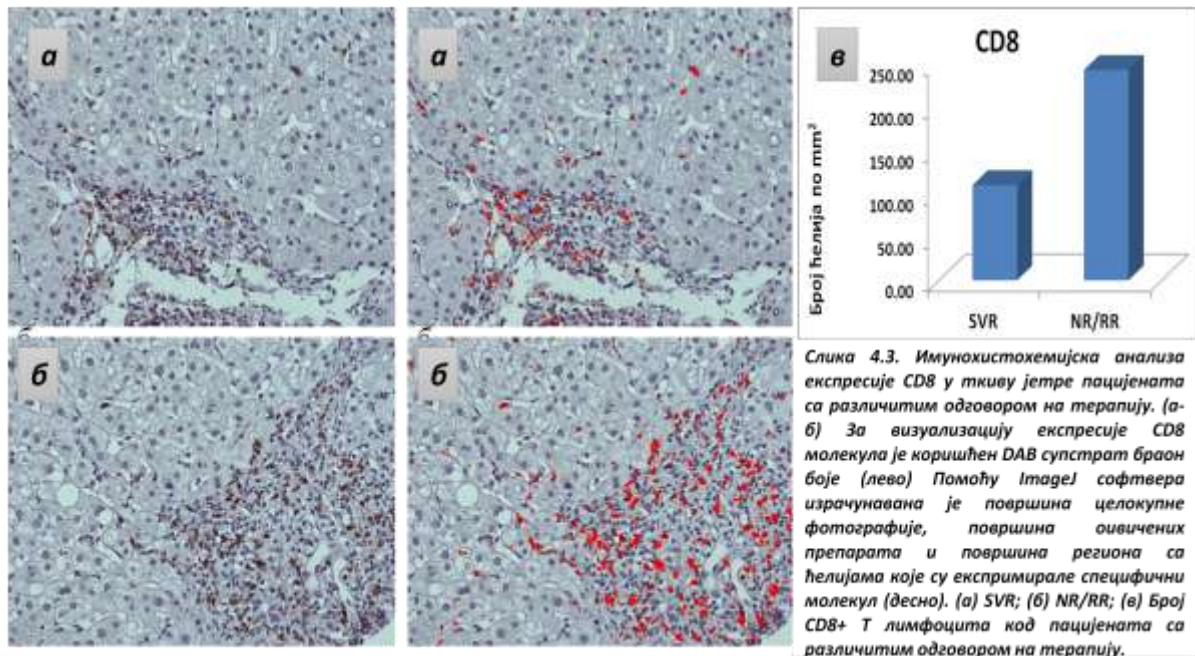
Софтверском анализом прерачунат је број ћелија који експримира CD4 молекул и резултати су приказани на Слици 4.1. У групи пацијената са повољним одговором број CD4+ Т лимфоцита ( $183/\text{mm}^2$ ) је био статистички значајно виши у односу на пацијенте са неповољним одговором на терапију ( $147$  ћелија по  $\text{mm}^2$ ) ( $p=0.026$ ). У знатно мањем броју, у односу на број CD4+ лимфоцита, присутне су Foxp3+ ћелије, појединачне и неправилно размештене, доминантно портно, а ретко и појединачно интралобуларно, у оквиру некроза било ког типа и везивних септума (Слика 4.2.).



Иако је у односу на CD4+ лимфоците фреквенција Foxp3+ ћелија била ниска у обе групе, софтверском анализом добили смо податак да је број Foxp3+ ћелија у групи пацијената са повољним одговором ( $85/\text{mm}^2$ ) статистички значајно виши у односу на пацијенте са неповољним одговором на терапију ( $60/\text{mm}^2$ ) ( $p=0.034$ ) (Слика 4.2.).

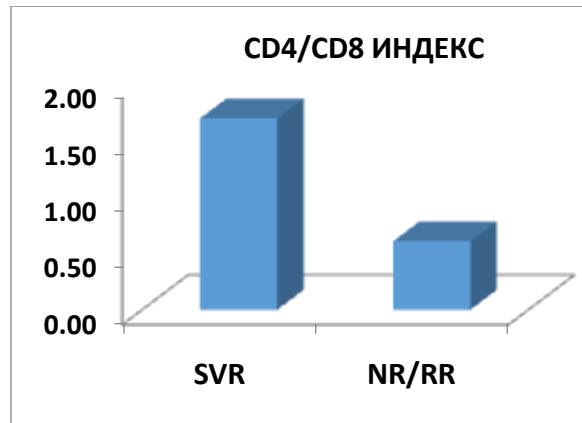
Насупрот CD4+ ћелијама, CD8+ лимфоцити се у нешто већем броју налазе интралобуларно, у синусоидима и у склопу уни и мултицелуларних некроза, а њихов

број је већи у конфлуентним мостним и перипортним парцијалним некрозама, као и у портним просторима (Слика 4.3.). Експресија CD8 молекула је била значајно виша у групи пацијената са неповољним одговором на терапију, што показују и бројчане вредности добијене софтверским прерачунавањем.



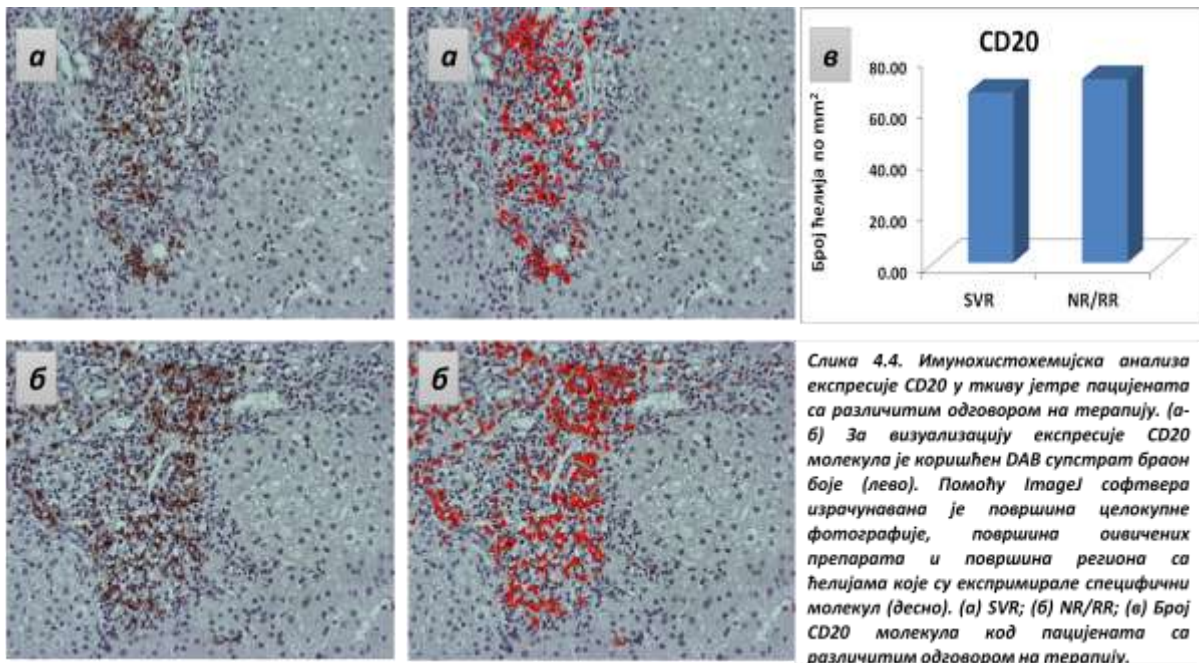
Наиме број CD8+ ћелија је у пацијената са неповољним одговором на терапију ( $243/\text{mm}^2$ ) био статистички значајно виши у односу на пацијенте са повољним одговором на терапију код којих је забележено ( $110/\text{mm}^2$ ) ( $p=0.011$ ) (Слика 4.3.).

CD4/CD8 индекс веома добро рефлектује стадијум активације имунског система. Стога смо уочивши повезаност нивоа експресије CD4 и CD8 молекула са врстом одговора на терапију, одредили овај индекс у испитиваним групама обелелих од хроничне HCV инфекције. Резултат је био више него интересантан обзиром да су пацијенти са повољним одговором на терапију имали CD4/CD8 индекс (1.7) који је веома сличан индексу ових ћелија у периферној крви здравих особа. Са друге стране, пацијенти са неповољним одговором су имали готово три пута нижи CD4/CD8 индекс (0.6) ( $p=0.012$ ). Ова висока разлика последица је како снижених вредности CD4+ ћелија, тако и повишених вредности CD8+ ћелија код пацијената са неповољним одговором на терапију (Графикон 4.5.).



Графикон 4.5. CD4/CD8 индекс код пацијената са различитим одговором на терапију.

Експресија CD20 молекула је била висока у обе групе испитаника, са сличном портном, интралобуларном и септалном дистрибуцијом (Слика 4.4.).

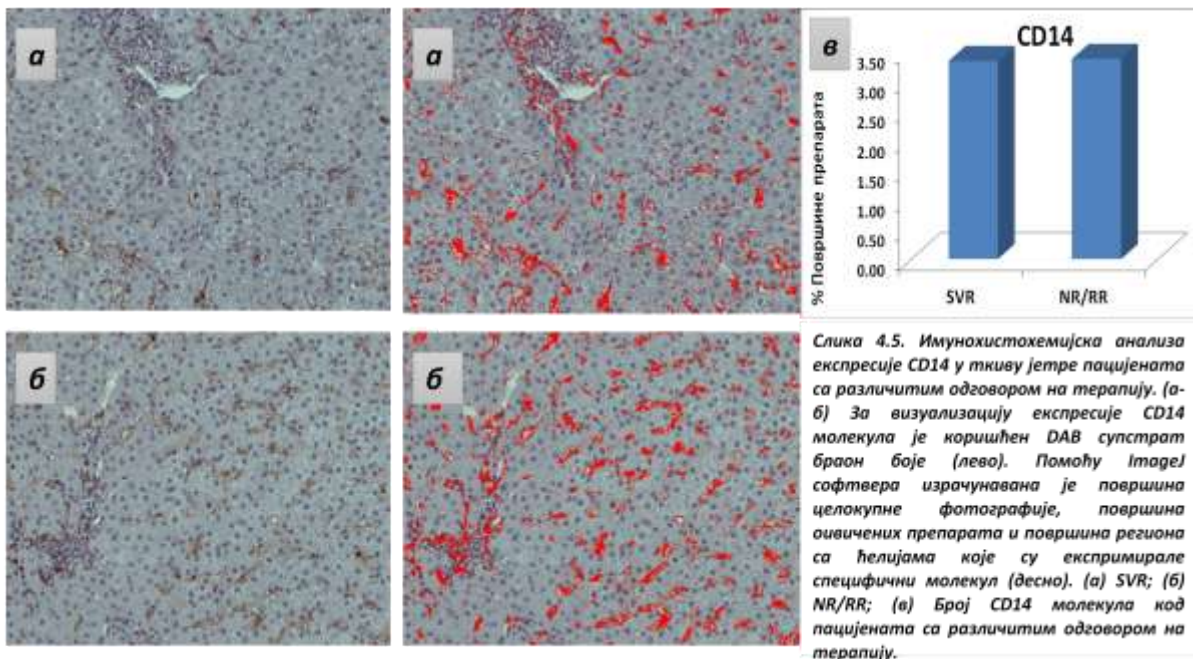


Слика 4.4. Имунохистохемијска анализа експресије CD20 у ткиву јетре пацијената са различитим одговором на терапију. (а-б) За визуализацију експресије CD20 молекула је коришћен DAB супстрат браон боје (лево). Помоћу ImageJ софтвера израчунавана је површина целокупне фотографије, површина овичених препарата и површина региона са ћелијама које су експримирале специфични молекула (десно). (а) SVR; (б) NR/RR; (в) Број CD20 молекула код пацијената са различитим одговором на терапију.

Између испитиваних група није постојала статистички значајна разлика у броју CD20+, ћелија ( $p = 0.171$ ). Подаци о броју ћелија које експримирају CD20 молекул добијени софтверском анализом били су готово идентични у испитиваним групама. У првој групи пацијената просечан прој ћелија које експримирају CD20 је  $68/\text{mm}^2$ , док је у другој групи тај број био незнатно виши и износио је  $71/\text{mm}^2$  (Слика 4.4.).

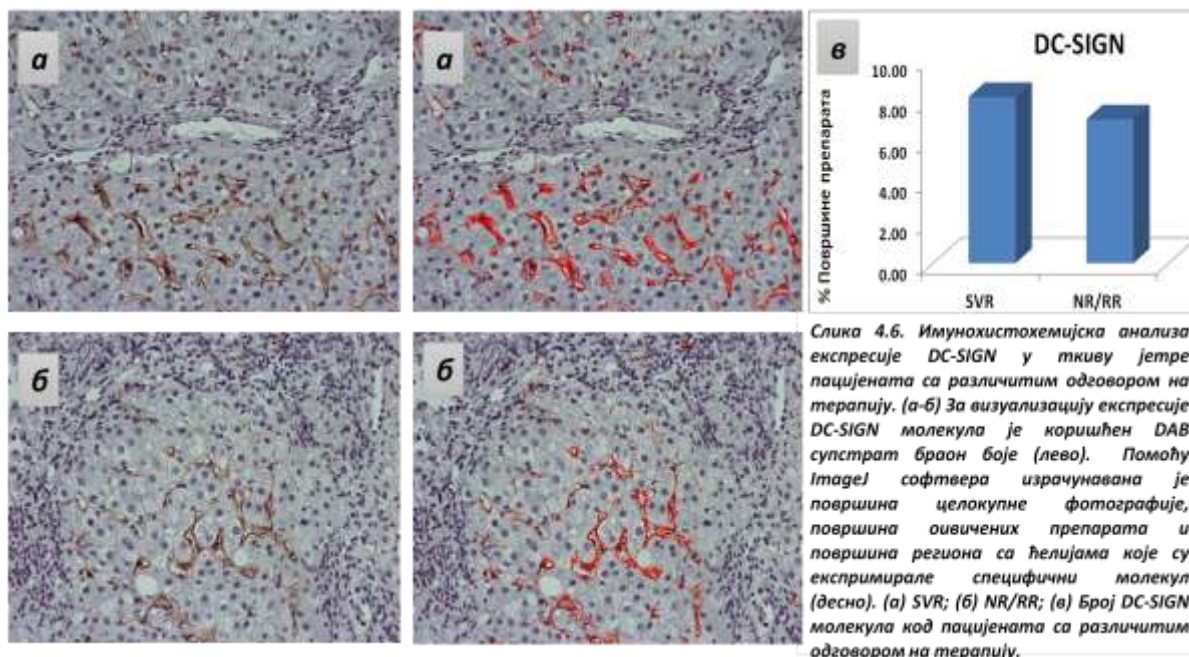
Због карактеристичне презентације, ћелије које експримирају специфичне маркере за CD14, DC-SIGN, и PD1 приказали смо као проценат површине препарата коју је заузимао регион са специфичним ћелијама. CD14 експримирају ендотелне

ћелије синусоида јетре и појединачне мононуклеарне ћелије које цитолошки одговарају Купферовим ћелијама. Изоловане и појединачне CD14+ мононуклеарне ћелије распоређене су ирегуларно у портним просторима, конфлуентним мостним некрозама, везивним септама и ретко интралобуларно у синусоидима. Ирегуларну дистрибуцију у експримирању 14. кластера диференцијације имају и ендотелне ћелије, некад појединачно, а чешће континуирано у већим ћелијским групама (Слика 4.5.).

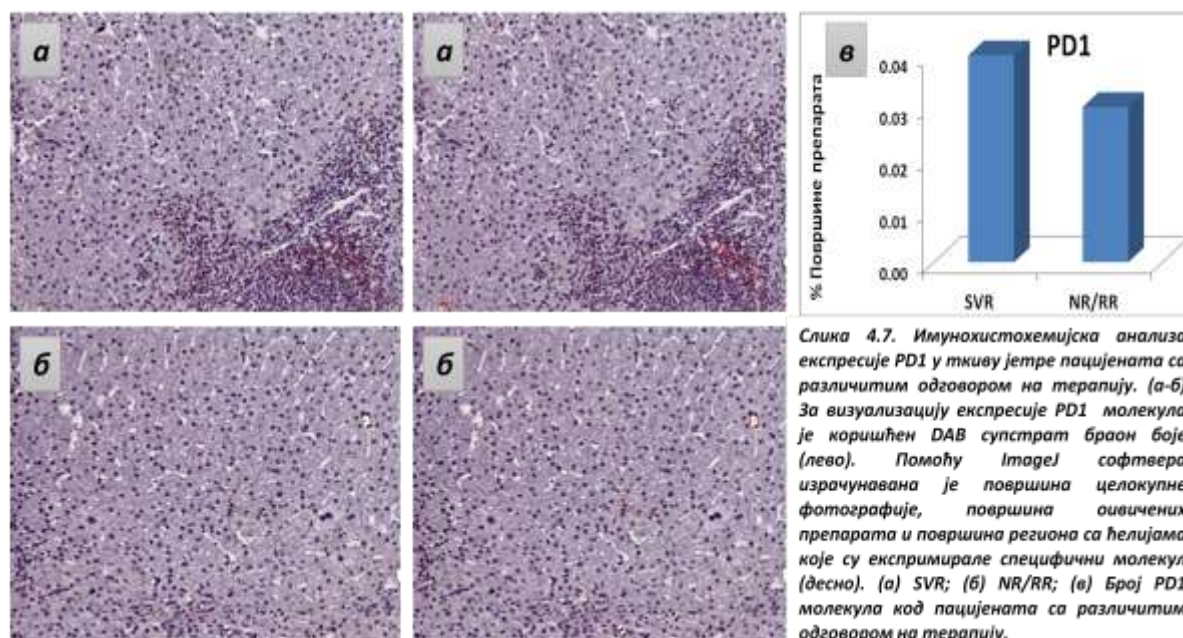


Софтверском анализом прерачунат је проценат површине коју у односу на цео препарат заузимају CD14+ ћелије. Анализа је показала да између испитаника са повољним (3,35%) и неповољним одговором (3,38%) не постоје статистички значајне разлике у експресији CD14 молекула ( $p=0.764$ ). Ендотелне ћелије синусоида чешће и интензивније експримирају DC-SIGN рецептор у јетрином паренхиму без фиброзе, нарочито у перивенуларној зони. Такође, појединачне и изоловане DC-SIGN+ ћелије се уочавају, ретко интралобуларно, а чешће у портним просторима и везивним некомплетним и комплетним септумима (Слика 4.6.).

Иако је експресија DC-SIGN молекула израженија код пацијената са повољним одговором на терапију, софтверски генерисан проценат површине специфично обележених DC-SIGN+ ћелија, у обе групе испитаника је сличан и не достиже статистичку значајност (SVR: 8,16%; NR/RR: 7,06%) ( $p=0.322$ ).



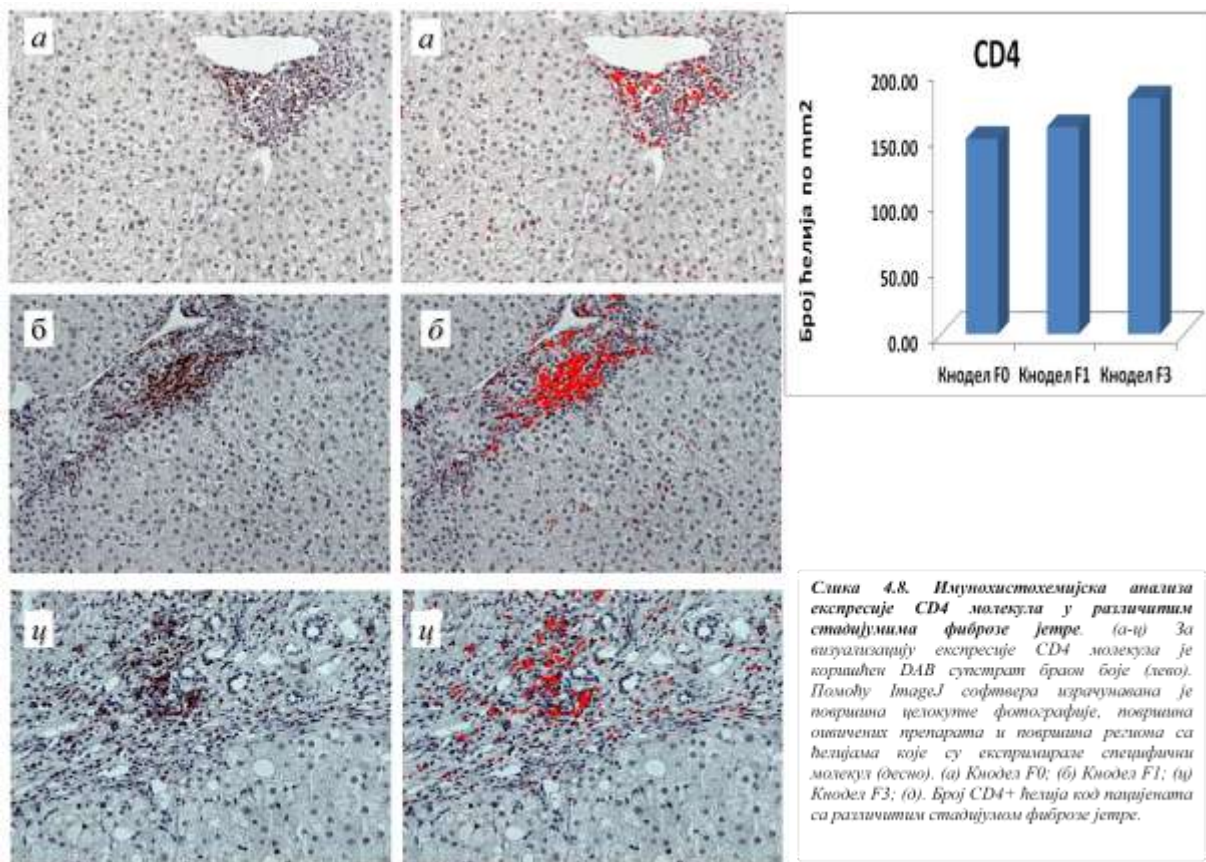
PD1 молекул у веома ниском броју експримирају појединачне мононуклеарне ћелије које цитолошки одговарају лимфоцитима. PD1+ ћелије су присутне као појединачне и неправилно размештене ћелије локализоване искључиво у портним просторима (Слика 4.7.).



Резултати софтверског прерачунавања за PD1 молекул показују да између пацијената са повољним одговором (0,04%) и пацијената са неповољним одговором на терапију (0,03%) нема статистички значајне разлике у експресији PD1 молекула ( $p=0.208$ ).

### 4.3 Учесталост популација мононуклеарних леукоцита код пацијената са различитим стадијумом фиброзе јетре

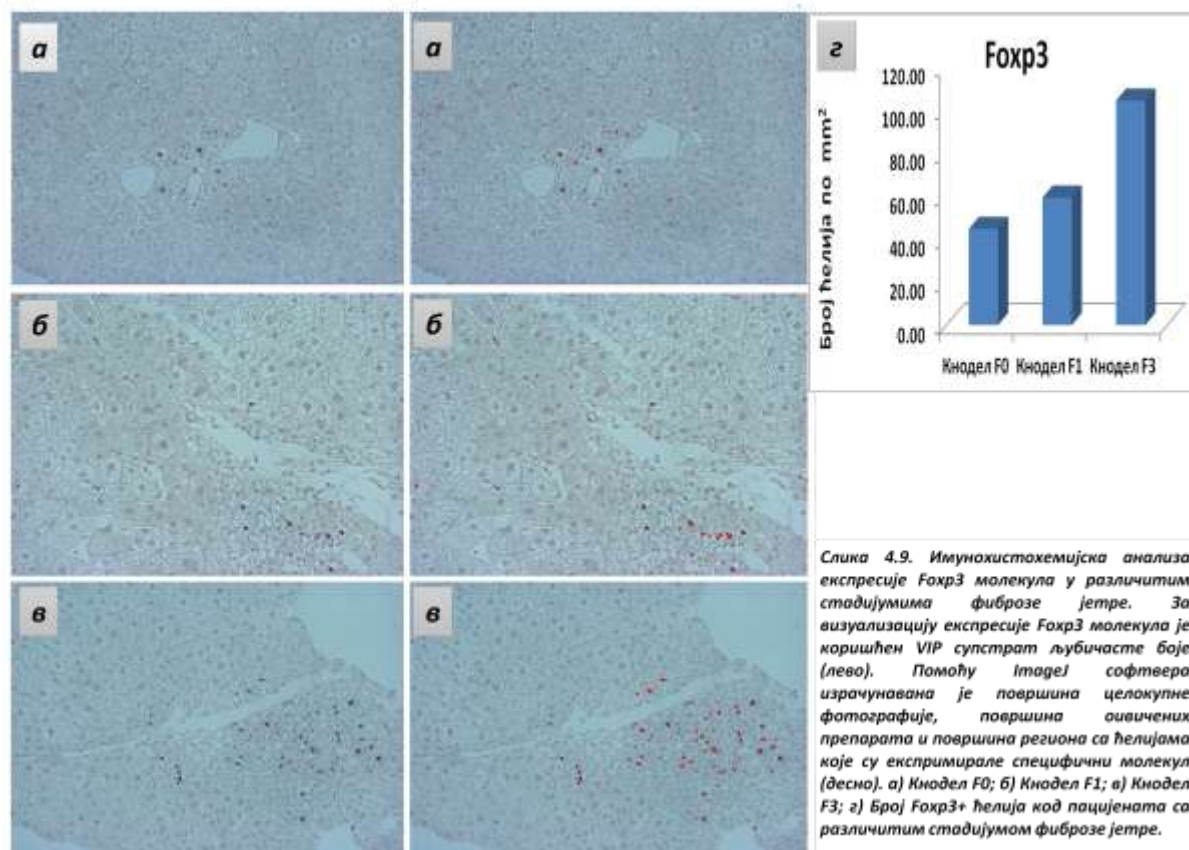
У зависности од резултата фиброзе јетриног трива одређеног на основу *Кнодел* скоринг система, све испитанике смо поделили у три групе. Прву групу испитаника чинили су испитаници са одсуством фиброзе (F0), другу групу испитаници са благим обликом фиброзе (F1), а трећу групу су чинили испитаници код којих је забележен најтежи стадијум фиброзе (F3).



CD4+T позитивни лимфоцити су доминантно локализовани у портним просторима. У случајевима где су присутни лимфоидни фоликули често су густо распоређени на њиховој периферији. У много мањем броју се уочавају и у зонама конфлуентних мостних некроза и формираним везивним септумима, а само ретко интралобуларно, као појединачни CD4+ T ћелијски елементи (Слика 4.8.).

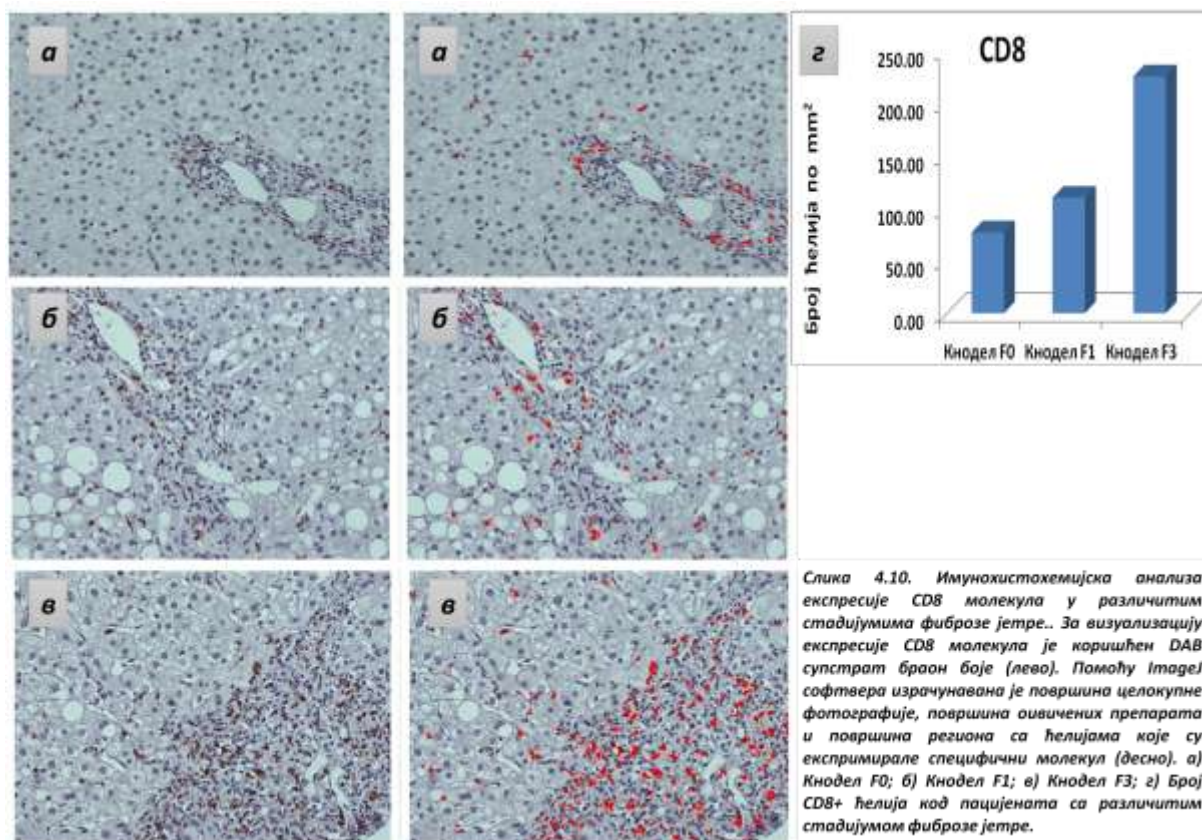
Софтверском анализом је прерачунат број ћелија који експримира CD4 молекула и резултати су приказани на Слици 4.8. У групи пацијената код којих није забележена

фиброза ( $F0$ ), број  $CD4+$  Т лимфоцита ( $149/mm^2$ ) је био нижи у односу на пацијенте са фиброзом ( $F1:158/mm^2$ ;  $F3:180/mm^2$ ), међутим статистички значајна разлика није забележена ( $p=0.389$ ). У много мањем броју, у односу на број  $CD4+$ Т лимфоците, присутне су  $Foxp3+$  ћелије, појединачне и неправилно размештене, са доминантном портном локализацијом, а ретко и појединачно интралобуларно, у оквиру некроза било ког типа и везивних септума. Запажено је да њихов број расте са стадијумом фиброзе (Слика 4.9.).



Слично експресији  $CD4$  молекула, експресија  $Foxp3$  молекула у наведеним групама испитаника расте са порастом стадијума фиброзе, тако да код испитаника прве групе ( $F0$ ) тај број износи  $44/mm^2$ , код испитаника са нижим стадијумом фиброзе ( $F1$ ), бележи се пораст, и забележени број  $Foxp3+$  ћелија износи  $59/mm^2$ , док је у групи испитаника са унапредовалом фиброзом ( $F3$ ) тај број највиши и износи  $104/mm^2$  ( $p=0.002$ ).  $CD8+$ Т лимфоцити се у већем броју налазе интралобуларно, у синусоидима и у склопу уни и мултицелуларних некроза, а њихов број је већи у конфлуентним мостним и перипортним парцијалним некрозама, као и у портним просторима (Слика 4.10.).

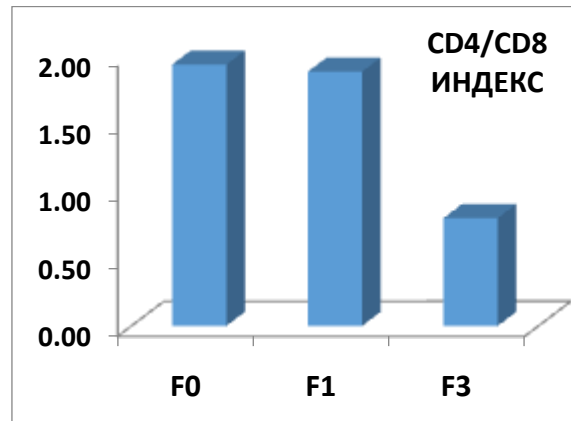




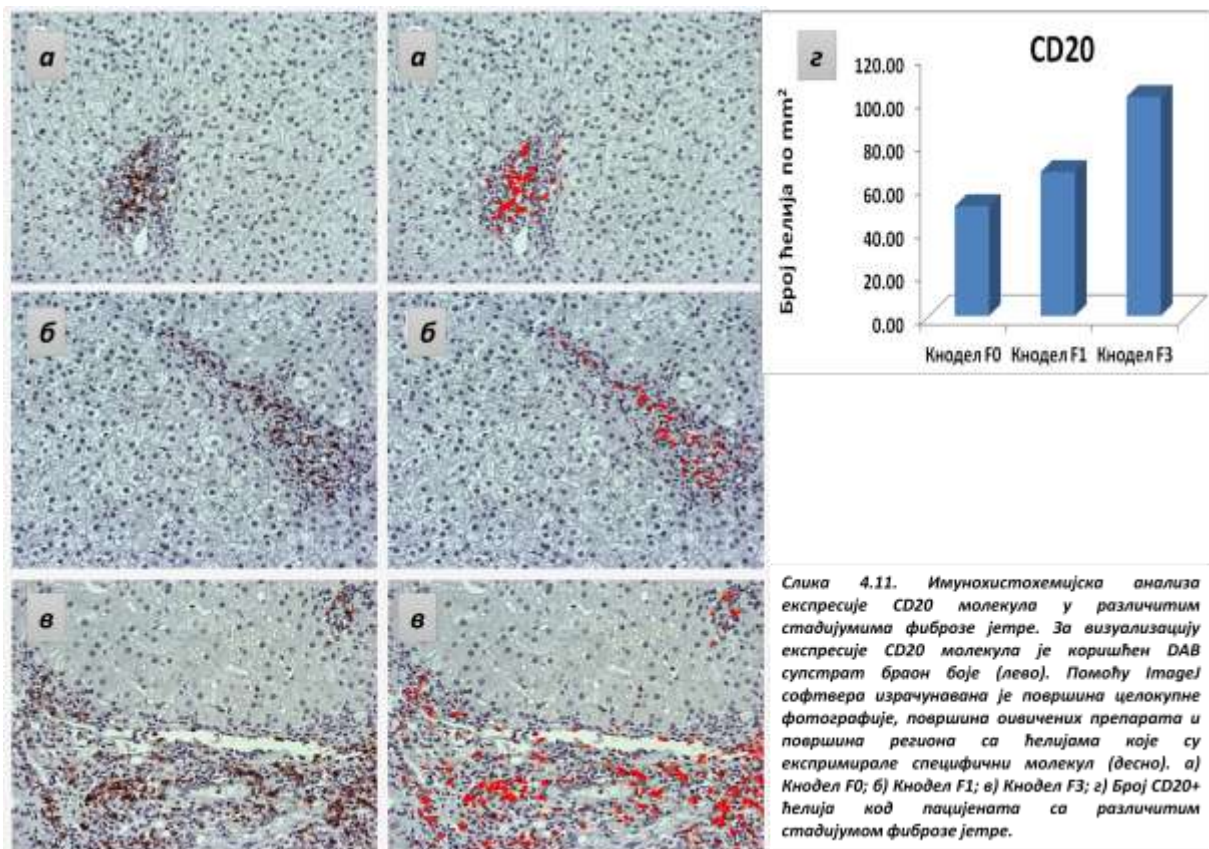
Софтверском анализом експресије CD8 молекула у наведеним групама испитаника, запазили смо да број CD8+ ћелија расте са порастом стадијума фиброзе ткива јетре. У првој групи испитаника, који немају фиброзу (F0), CD8 молекул експримира 77 ћелија/mm<sup>2</sup>. Повећање броја CD8+ Т лимфоцита забележено је како у другој групи испитаника (110/mm<sup>2</sup>) са блажом фиброзом (F1), тако и у трећој групи испитаника са израженом фиброзом (F3) код којих је забележен статистички значајан раст у броју ових ћелија у односу на претходне две групе испитаника (226/mm<sup>2</sup>) ( $p=0.029$ ).

Наглашени пораст броја CD8+лимфоцита код пацијената са вишим стадијумом фиброзе, подстакло нас је да код пацијената са различитим стадијумом оштећења јетриног паренхима одредимо CD4/CD8+ индекс. Очекивано, пацијенти без фиброзе (F0) имају CD4/CD8+ индекс (1.94) компарабилан са нормалним вредностима овог индекса у периферној крви здравих особа. Насупрот томе, са напредовањем фиброзе, овај индекс опада на рачун CD4+ ћелија, а услед израженог повећања броја CD8+ лимфоцита у вишим стадијумима фиброзе, тако да код пацијената са низим стадијумом фиброзе (F1) овај индекс износи 1.88, да би код пацијената са узнапредовањем

фиброзом (F3) стрмоглаво пао на вредности готово три пута ниже у односу на нормалне (0.88) ( $p=0.014$ ) (Графикон 4.6.).



Графикон 4.6. CD4/CD8+ код пацијената са различитим стадијумом фиброзе.

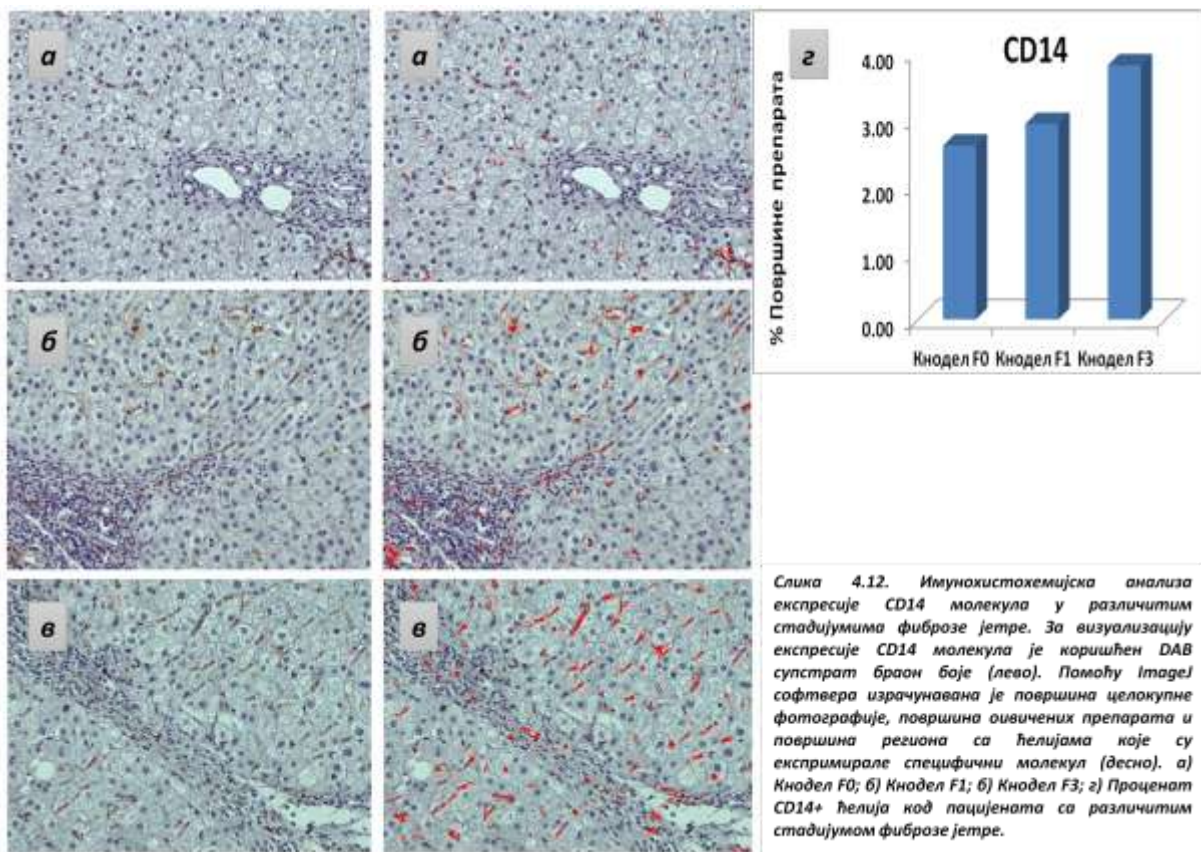


Слика 4.11. Имунохистохемијска анализа експресије CD20 молекула у различитим стадијумима фиброзе јетре. За визуализацију експресије CD20 молекула је коришћен DAB супстрат браон боје (лево). Помоћу ImageJ софтвера израчунавана је површина целокупне фотографије, површина оивчених препарата и површина региона са ћелијама које су експримирале специфични молекул (десно). а) Кнодел F0; б) Кнодел F1; в) Кнодел F3; г) Број CD20+ ћелија код пацијената са различитим стадијумом фиброзе јетре.

Са повећањем стадијума фиброзе расте и број CD20+ В лимфоцита, који показују сличну портну, интралобуларну и септалну дистрибуцију, при чему се већи број ових ћелија детектује у потним просторима и септално, док се интралобуларно налазе појединачне, изоловане ћелије (Слика 4.11).

Анализа броја ћелија које експримирају CD20 молекула је показала да пораст нивоа експресије овог молекула прати развој фиброзе, тако да је у првој групи

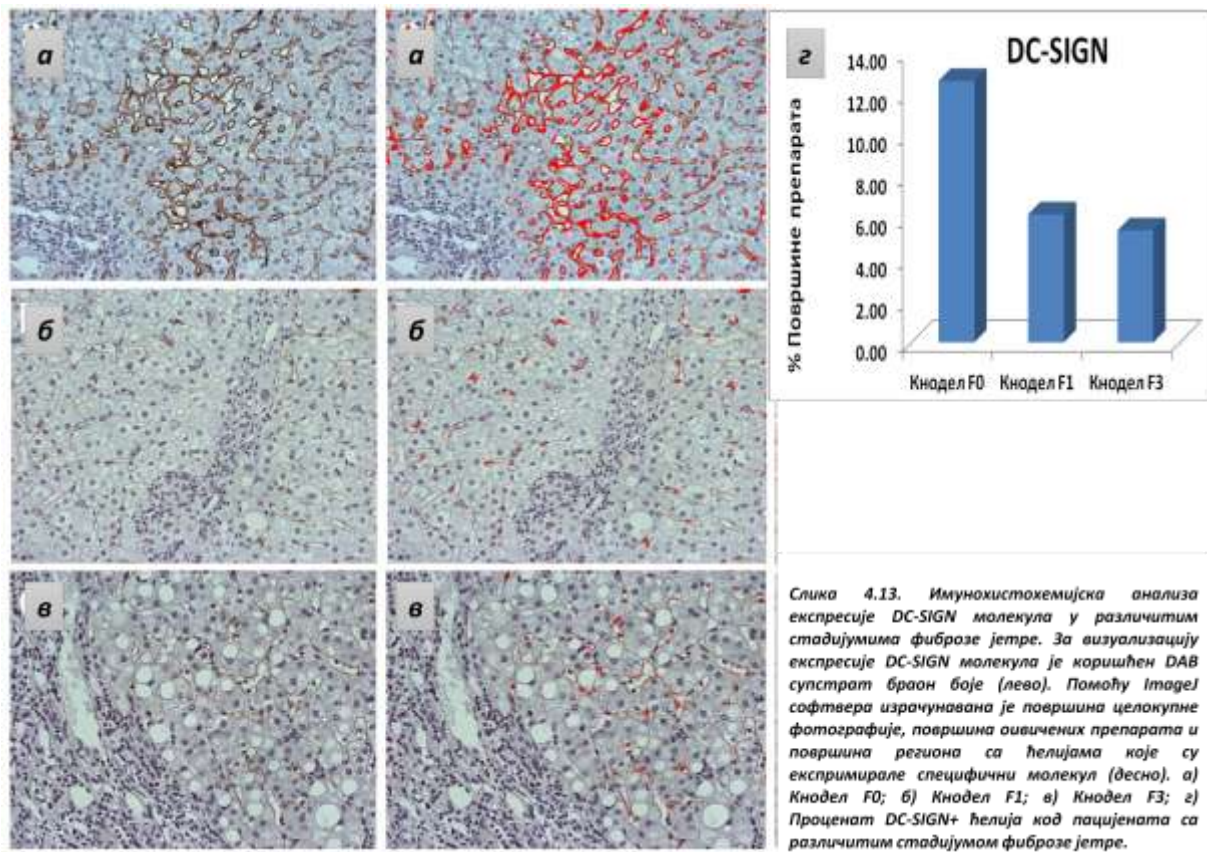
испитаника број CD20+ ћелија износио  $50/\text{mm}^2$ , у другој групи  $66/\text{mm}^2$ , док је у трећој групи забележен највећи број ћелија које експримирају CD20 и то  $101/\text{mm}^2$  ( $p=0.038$ ). Експресија CD14 молекула је показана на ендотелним ћелијама синусоида јетре и појединачним мононуклеарним ћелијама које цитолошки одговарају Купферовим ћелијама. Број CD14+ изолованих и појединачних мононуклеарних ћелија расте са стадијумом фиброзе. Ове ћелије су распоређене ирегуларно у портним просторима, конфлуентним мостним некрозама, везивним септама и ретко интралобуларно у синусоидима. Ирегуларну дистрибуцију у експримирању 14. кластера диференцијације имају и ендотелне ћелије, некад појединачно, а чешће континуирано у већим ћелијским групама (Слика 4.12.).



Због карактеристичне ткивне дистрибуције ћелије које експримирају специфичне маркере CD14, DC-CIGN и PD1 смо приказали као проценат специфично обојене површине у односу на површину препарата. Са повећањем стадијума фиброзе уочљив је пораст у експресији CD14 молекула. Користећи софтверски алгоритам ImageJ апликације утврдили смо да је код пацијената без фиброзе (F0) CD14 молекул експримиран на 2,60% површине препарата, док је код испитаника из друге групе (F1) тај проценат нешто виши и износи 2,93% укупне површине препарата. Највеће

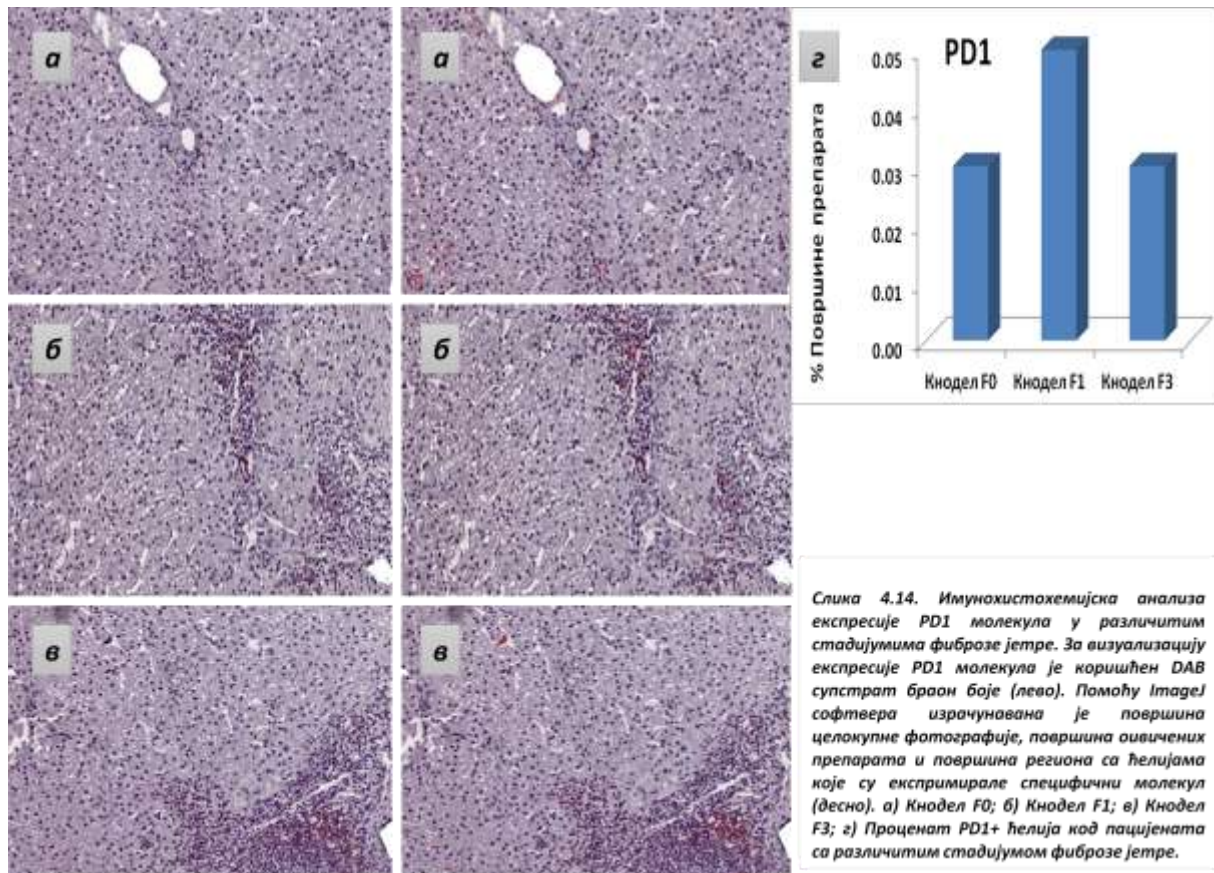
вредности експресије CD14 молекула су утврђене у трећој групи испитаника (*F3*) код којих је проценат ћелија које експримирају овај молекул 3,81% од укупне површине препарата. Ипак, статистичка значајност није показана ( $p=0.079$ ).

DC-SIGN рецептор експримирају ендотелне и појединачне ћелије мононуклеарне цитологије. Експресија овог молекула на ендотелним ћелијама синусоида је интензивнија у јетрином паренхиму без фиброзе, нарочито у перивенуларној зони, а са порастом стадијума фиброзе опада број позитивних ендотелних ћелија, као и интензитет експресије. DC-SIGN+ појединачне и изоловане мононуклеарне ћелије се уочавају ретко интралобуларно, а чешће у портним просторима и везивним некомплетним и комплетним септумима, уз јасно уочљиво повећање њиховог броја са повећањем стадијума фиброзе (Слика 4.13).



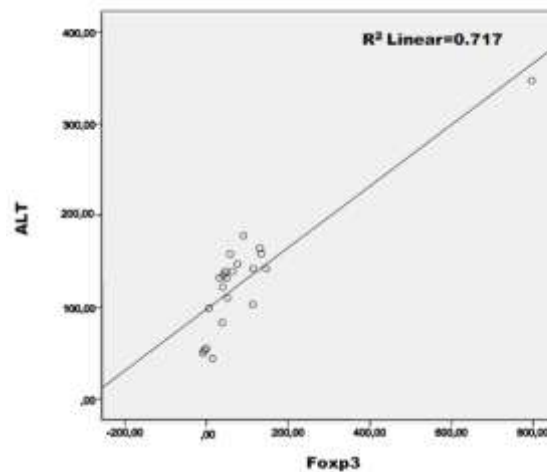
Вредности експресије DC-SIGN молекула у препаратима јетре без фиброзе (*F0*) су биле високе, чак 12,61% од укупне површине препарата. Ниво експресије је био значајно нижи у групи испитаника са благом фиброзом (*F1*) и износио је 6,17% од укупне површине препарата, док су у трећој групи испитаника са највишим стадијумом фиброзе (*F3*) забележене најниже вредности од 5,40% од укупне површине препарата ( $p=0.035$ ).

PD1 молекула у веома ниском броју експримирају појединачне мононуклеарне ћелије које цитолошки одговарају лимфоцитима. PD1+ ћелије су присутне у веома ниском броју као појединачне и неправилно размештене мононуклеарне локализоване искључиво у портним просторима (Слика 4.14.).



Резултати имунохистохемијске анализе експресије PD1 молекула указују да се, уз веома ниске апсолутне вредности, највећа експресија овог молекула, 0.05% укупне површине препарата, уочава у ткиву јетре пацијената са умереном фиброзом (F1), док су код пацијената без (F0) и са израженом фиброзом (F3) те вредности нешто ниже (0.03% укупне површине препарата). Забележене разлике не достижу ниво статистичке значајности ( $p=0.315$ ). Статистичка обрада резултата имунохистохемије је, поред свега наведеног, показала да не постоји значајна повезаност између броја Т лимфоцита и одговора на терапију или стадијума фиброзе, али је показано да постоји високо статистички значајна повезаност броја Т лимфоцита и серумског нивоа AST и ALT као најосетљивијих маркера оштећења јетриног паренхима. Спирмановом анализом утврдили смо статистички високо значајну позитивну корелација између броја CD4+ Т лимфоцита ( $r=0,614$ ,  $p=0,002$ ) и серумског нивоа AST, тако да са порастом броја Т лимфоцита расту и серумске концентрације AST. Интересантно је да је статистички

значајна корелација забележена и између броја Foxp3+ ћелија и серумског нивоа AST, али је насупрот CD4+ Т лимфоцитима, ова корелација негативног предзнака, тако да са повећањем броја Т регулаторних лимфоцита опада концентрација серумског AST ( $r=-0,562$ ,  $p=0,023$ ). Слична само још израженија повезаност је показана у односу на серумски ниво ALT ( $r=0,717$ ,  $p=0,002$ ) (Графикон 4.7.).



Графикон 4.7. Корелација броја Foxp3+ ћелија и серумског нивоа ALT

#### 4.4 Серумске вредности цитокина код пацијената са HCV инфекцијом

Током хроничне HCV инфекције цитокински профил пацијената варира у зависности од различитих фактора као што су генетске и етничке карактеристике пацијента, као и од фазе болести. Вероватно је то разлог што су подаци о серумским нивоима цитокина контрадикторни и крећу се од доминације Th1 или Th2 цитокина до повећане експресије оба типа цитокина. Зато је један од циљева нашег рада био да утврдимо цитокински профил пацијената и корелирамо га са хистопатолошким променама јетре. Анализирали смо нивое Th1 (IL-12p70, IFN $\gamma$  и IL-2), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13) и Th17 (IL-17A, IL-22 и IL-6) цитокина, као и проинфламаторних цитокина IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL-9, и њихове промене у односу на стадијум оштећења ткива јетре.

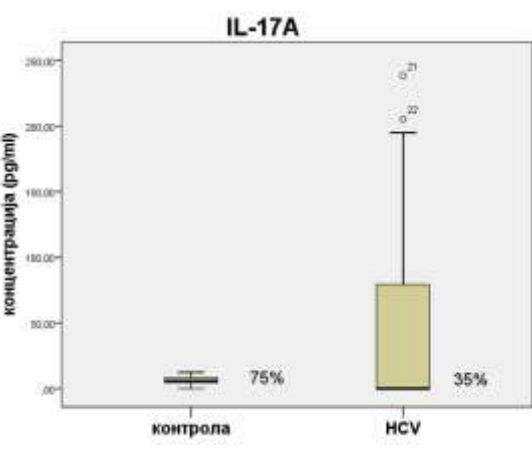
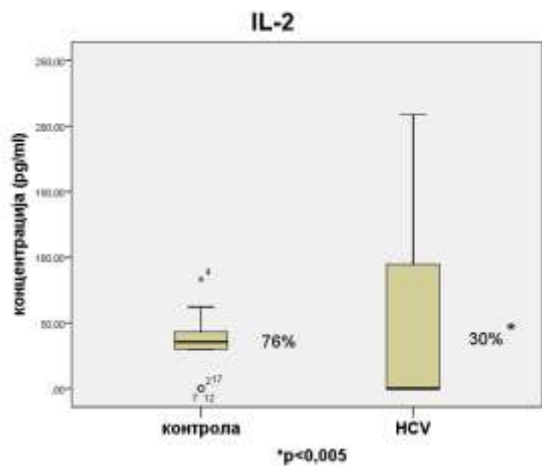
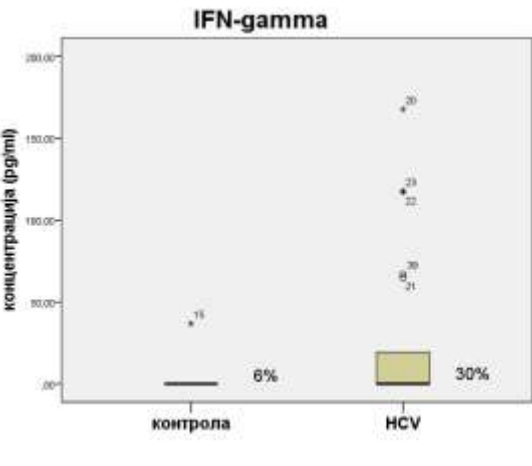
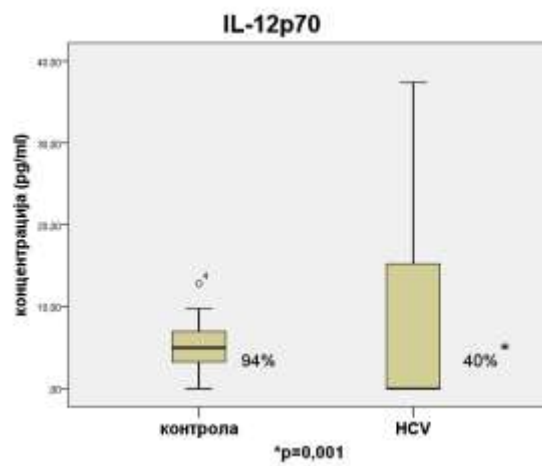
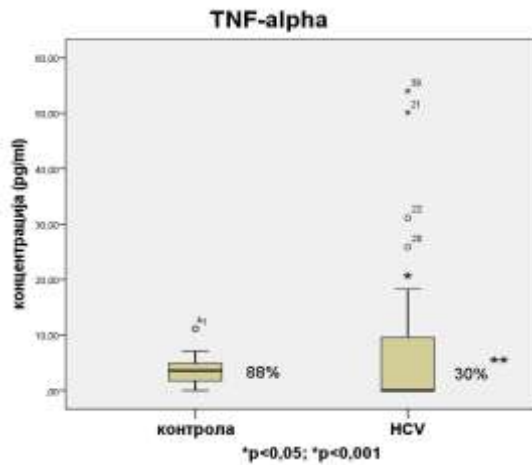
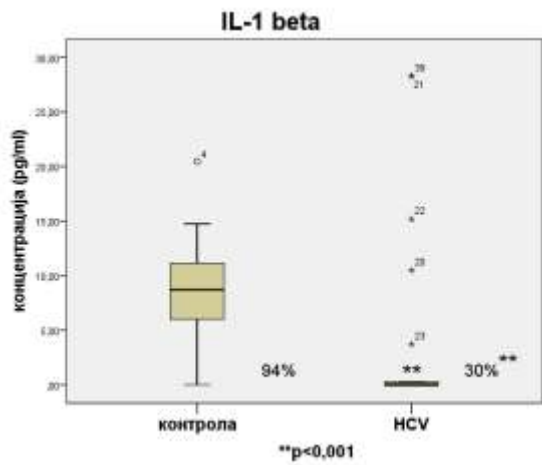
Испитивана група бројала је 23 пацијента просечне старости 43 године а однос међу половима био је 57%:43% у корист мушкараца. Резултати биопсије јетре индексирани су по Кнодел скоринг систему и на основу тога смо све испитанике

поделили у три групе. Прву групу представљали су испитаници без дијагностиковане фиброзе (F0) и њу је чинило 7 пацијената (30%), друга група је укључивла пацијенте са F1 стадијумом фиброзе 48%(11/23), док су трећу групу чинили испитаници са F3 стадијумом фиброзе 22% (5/23) (Табела 4.12.).

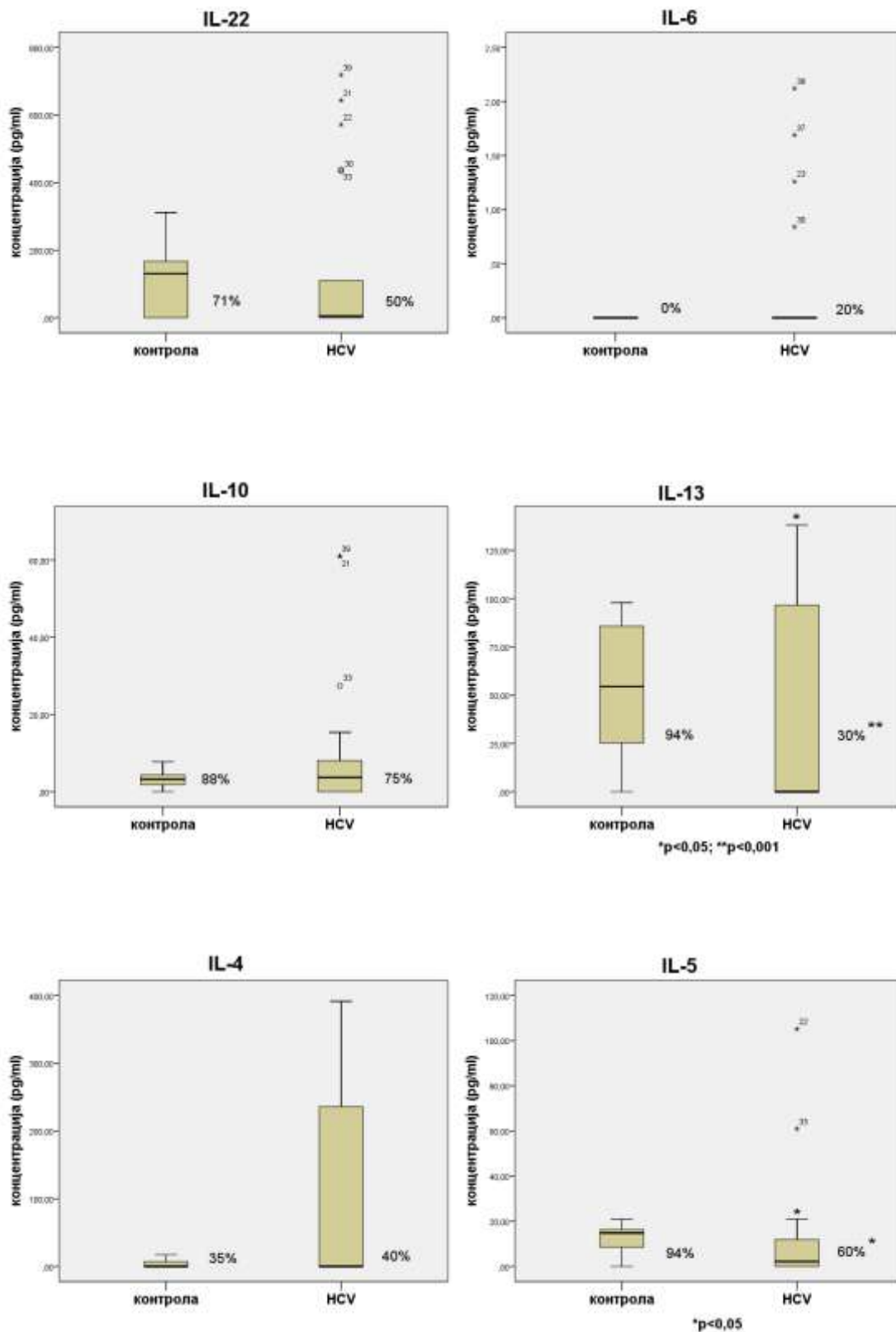
*Табела 4.12. Основне карактеристике болесника.*

<b>Карактеристике болесника</b>	<b>Вредност</b>
Старост (године)	43±12.7
Мушкарци/жене (n)%	13/10 (53/47%)
HCV RNK титар(копије/ml x 10 <sup>6</sup> )	5,1±6.9
AST (IU/l)	127.1±65.6
ALT (IU/l)	155.4±90.5
HCV генотип n (%)	
-1	17 (74%)
-3	6 (26%)
Knodell фиброза n (%)	
-0	7 (30%)
-1	11 (48%)
-3	5 (22%)

Добијени резултати су показали да су нивоа цитокина IL-12p70, IL-17A, IL-2, IL-22, IL-13, IL-5, IL-1β и TNFα били нижи код пацијената у односу на контролу, док вредности цитокина IFN- γ, IL-10, IL-6 и IL-4 нису показале разлику у поређењу са контролом. Статистички значајан пад забележен је код IL-13 (p <0,05), IL-5 (P <0,05), IL-1β (P <0,001) и TNFα (p <0,05) (Слика 4.15.). Значајно је да су серумски нивои свих испитиваних цитокина били испод границе детекције код одређеног броја пацијената и здравих испитаника. Тако је у групи пацијената статистички значајно мањи број субјеката продуковао мерљиве количине IL-12p70, IL-13, IL-1β, TNFα (p <0,001), IL-2 (p = 0,002) и IL-5 (p <0,05 ). Серумски ниво IL-9 је био изнад границе детекције код само једног пацијента, па овај цитокин није даље дискутован.

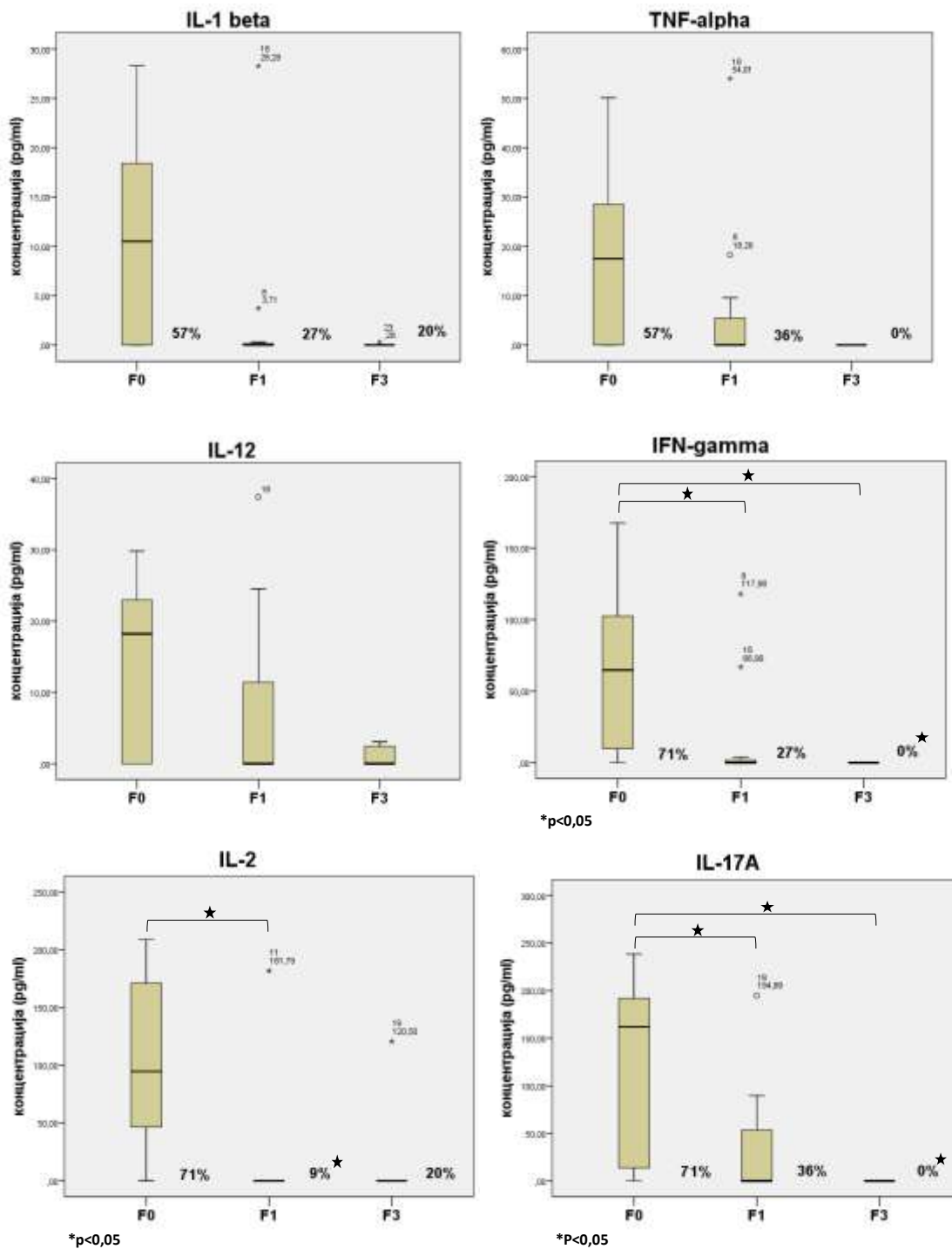


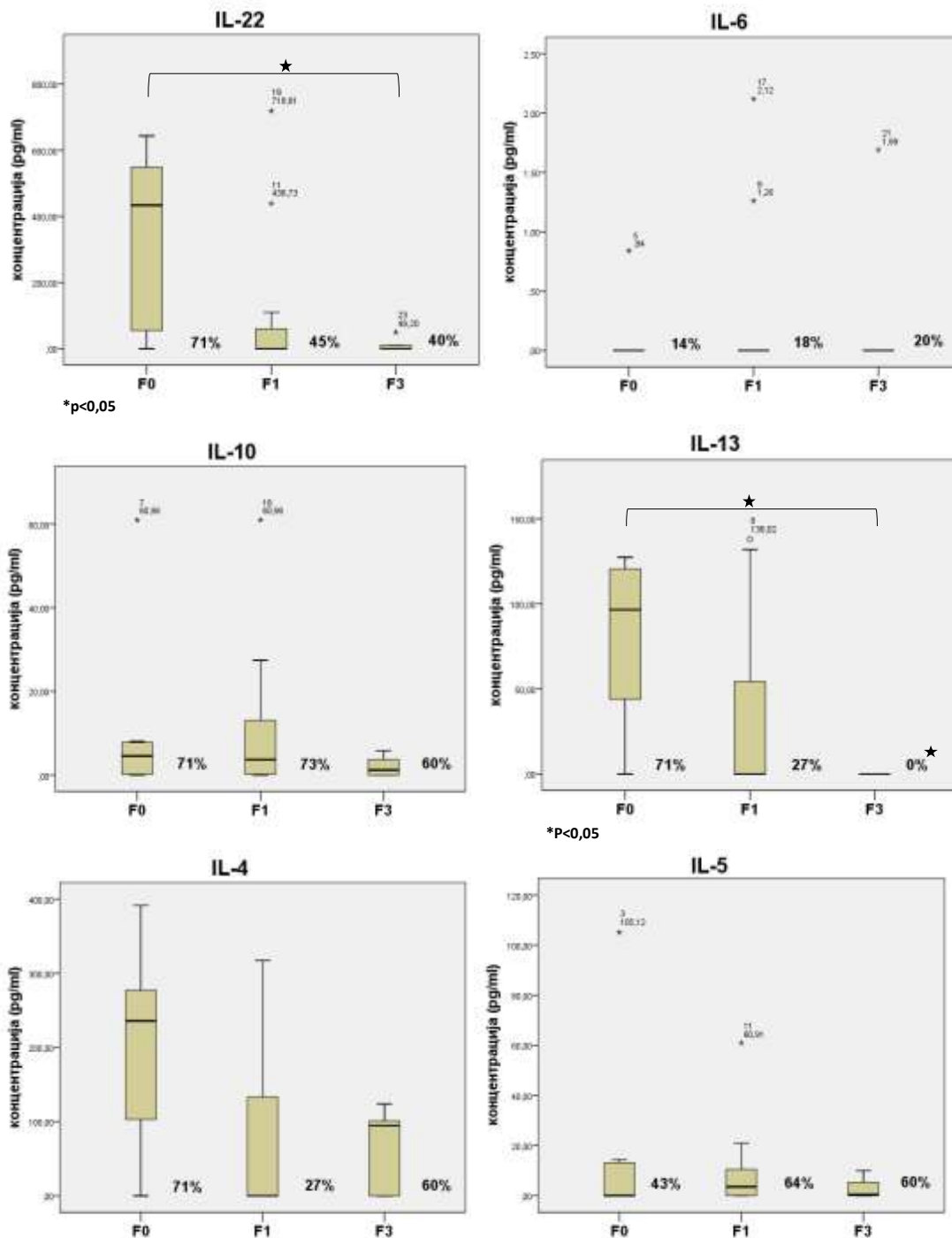




Слика 4.15. Приказ нивоа серумских цитокина код 17 здравих особа (контрола) и 23 пацијента. Бројеви унутар слике представљају проценат субјеката код којих је продукција цитокина била изнад нивоа детекције. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

Анализа нивоа цитокина унутар групе пацијената и груписање података према стадијуму фиброзе, показало је да су код хронично инфицираних пацијената без фиброзе (F0) средње вредности нивоа свих цитокина биле веће него код пацијената са фиброзом. Тенденција смањења нивоа цитокина ка вишим стадијумима фиброзе забележена је за све цитокине, са изузетком IL-6 чија се вредност повећавала са стадијумом фиброзе (Слика 4.16.).

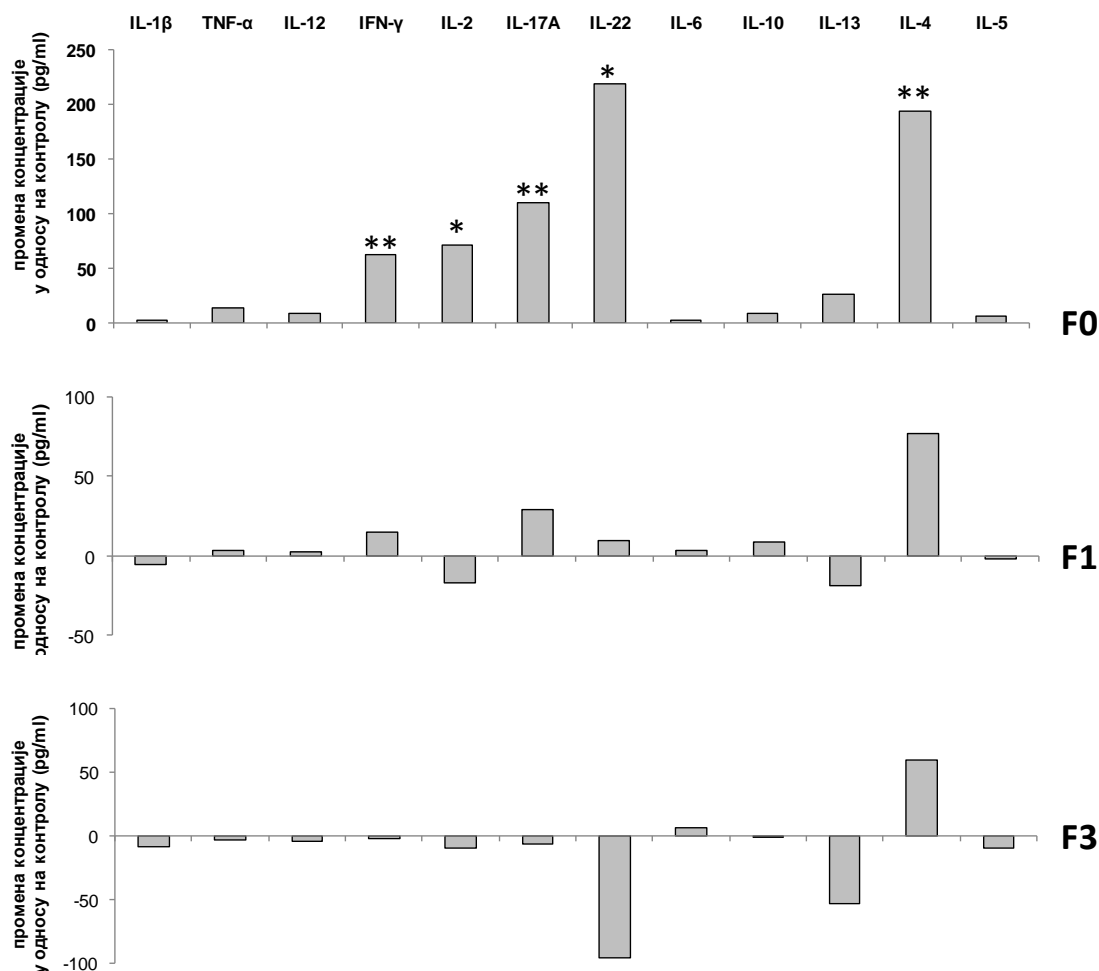




Слика 4.16. Приказ нивоа серумских цитокина код 23 HCV болесника пре терапије, по стадијуму фиброзе. \* $p < 0,05$

Пацијенти са фиброзом су, у поређењу са пацијентима без фиброзе, имали статистички значајно ниже нивое IFN $\gamma$ , IL-2, IL-17, IL-22 и IL-13 ( $p < 0,05$ ). Такође, статистички значајно мањи број пацијената са фиброзом је продуковао мерљиве нивое IFN $\gamma$ , IL-2, IL-17 и IL-13 ( $p < 0,05$ ).

Да би имали бољи увид у промене цитокинског профила током прогресије болести анализирали смо разлику између средњих вредности нивоа цитокина пацијената и контрола (Слика 4.17.).



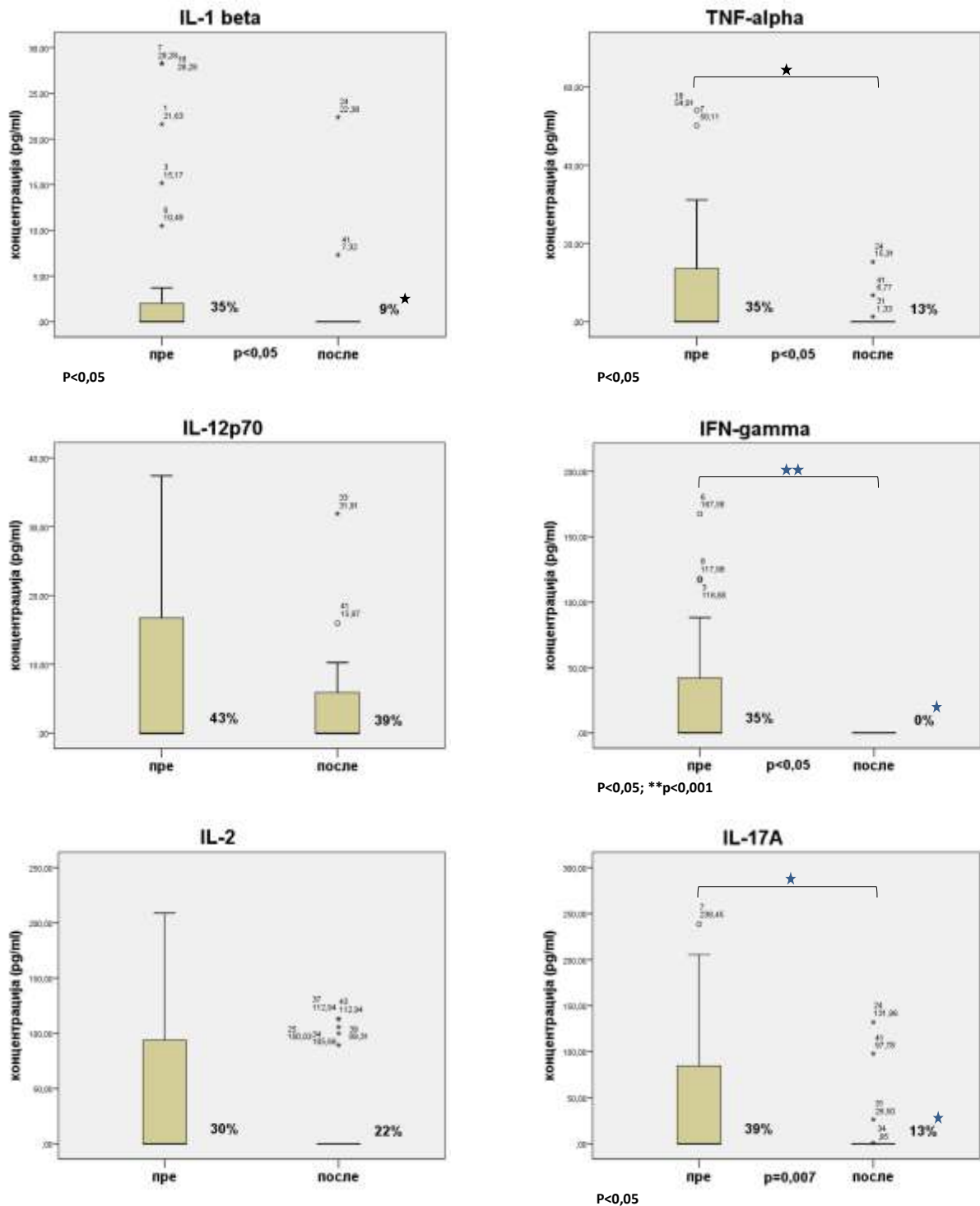
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$

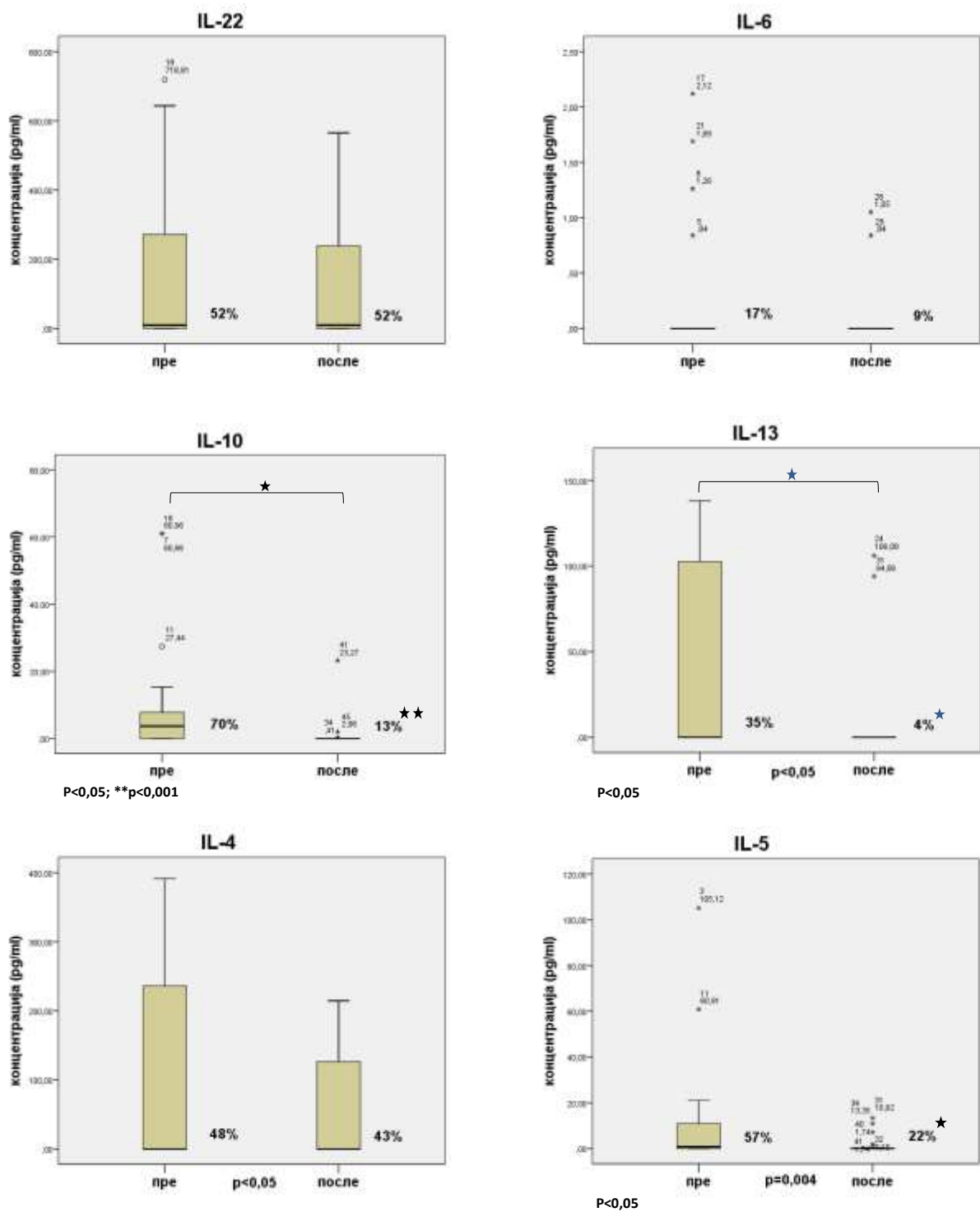
Слика 4.17. Промена цитокинског профила у зависности од стадијума фиброзе (F0, F1, F3). Представљена је разлика између средњих вредности нивоа цитокина пацијената и контрола. X-оса представља непостојање разлике. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

У F0 групи вредности свих цитокина су биле више у односу на контролу. Разлика је била статистички значајна за IFN $\gamma$  ( $p < 0,001$ ), IL-2 ( $p < 0,05$ ), IL-17A ( $p < 0,001$ ), IL-22 ( $p < 0,05$ ) и IL-4 ( $p < 0,001$ ). У F1 групи ниво цитокина IL-6 је био виши, IL-10 је остао повишен, док су нивои свих осталих цитокина били нижи у односу на F0, мада код већине још увек изнад вредности забележених код контрола. У групи пацијената са F3 стадијумом фиброзе, пад нивоа свих цитокина се наставио. Иако нижи у односу на F0 и F1, ниво IL-4 је остао виши од вредности у контролној групи, док су вредности

свих осталих цитокина биле мање у односу на контролу. Супротно осталим цитокинима, вредности нивоа IL-6 су се повећавале ка вишим стадијумима фиброзе.

Код пацијената укључених у студију није било контраиндикација за примену антивирусног лечења, па је оно у целости спроведено. Након завршене терапије поново смо анализирали цитокински профил. По завршетку терапије нивои свих цитокина су били нижи у односу на вредности пре терапије (Слика 4.18.).



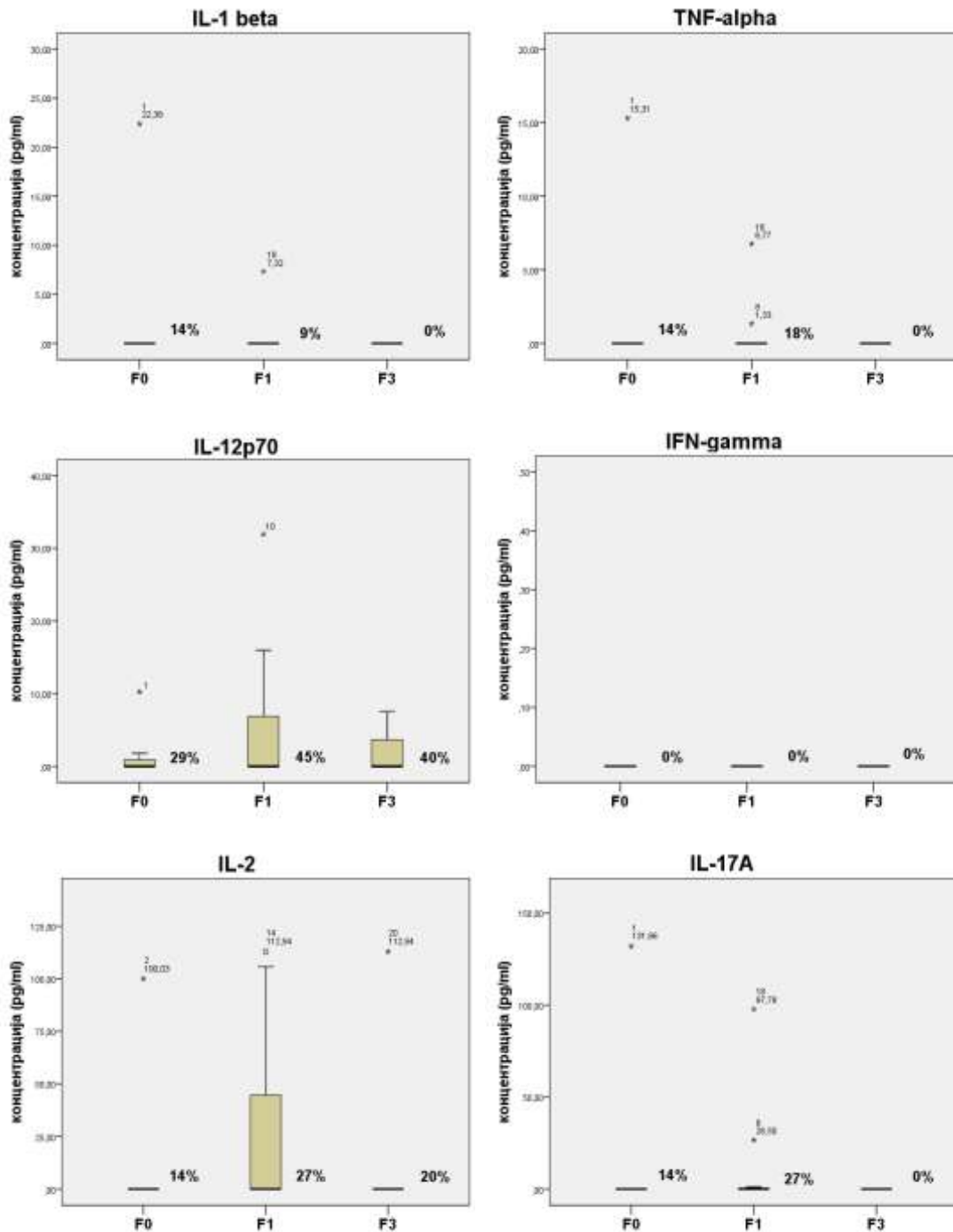


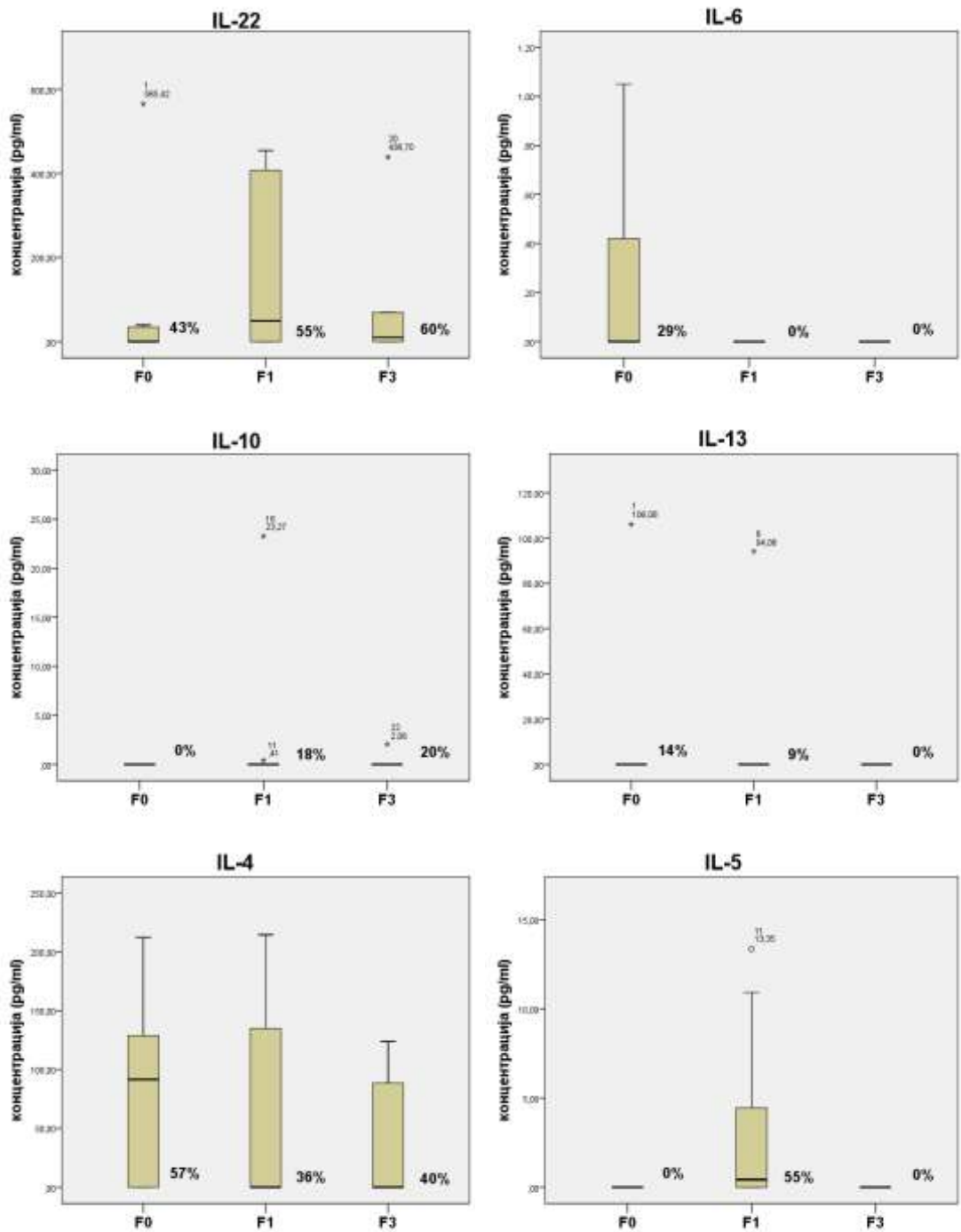
**Слика 4.18.** Приказ серумских нивоа цитокина код 17 здравих особа (контрола) и 23 болесника пре и после терапије. Бројеви унутар слике представљају проценат субјеката код којих је продукција цитокина била изнад нивоа детекције. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

Статистички значајан пад забележен је како код проинфламаторних ( $TNF\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-17A$ ), тако и код антиинфламаторних цитокина ( $IL-10$ ,  $IL-13$ ). Такође, статистички значајно мањи број пацијената је продуковао мерљиве количине  $IL-1\beta$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-17A$ ,

IL-10, IL-13 и IL-5. Ниво IL-22, као и број субјеката који га продукују, није се променио после терапије.

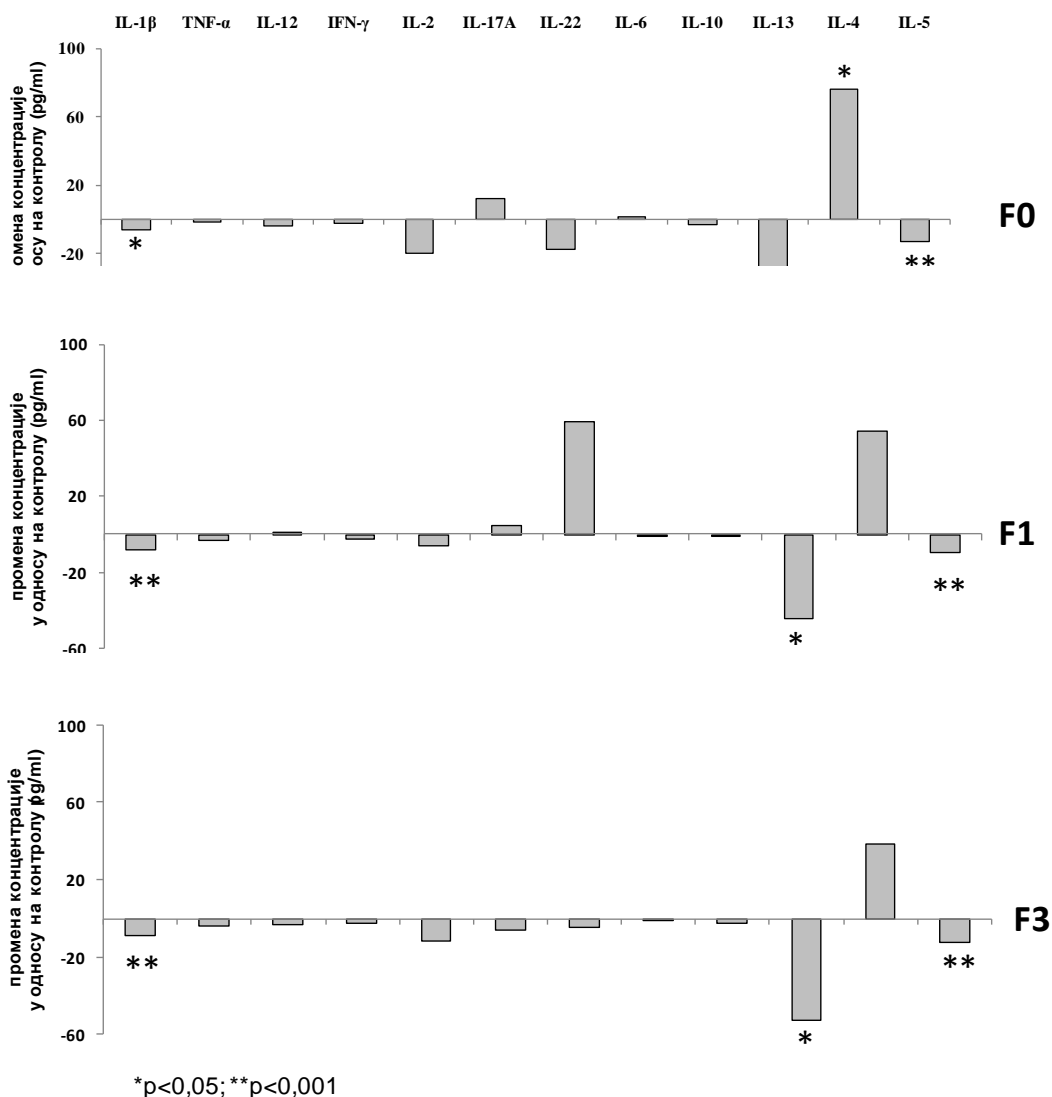
Анализа података груписаних према стадијуму фиброзе показала је да између испитиваних група не постоје статистички значајне разлике ни у вредностима нивоа цитокина, ни у проценту субјеката који су продуковали мерљиве нивое цитокина (Слика 4.19.).





Слика 4.19. Приказ нивоа серумских цитокина код 23 HCV болесника после терапије, по стадијуму фиброзе. Бројеви унутар слике представљају проценат субјеката код којих је продукција цитокина била изнад нивоа детекције. \* $p < 0,05$



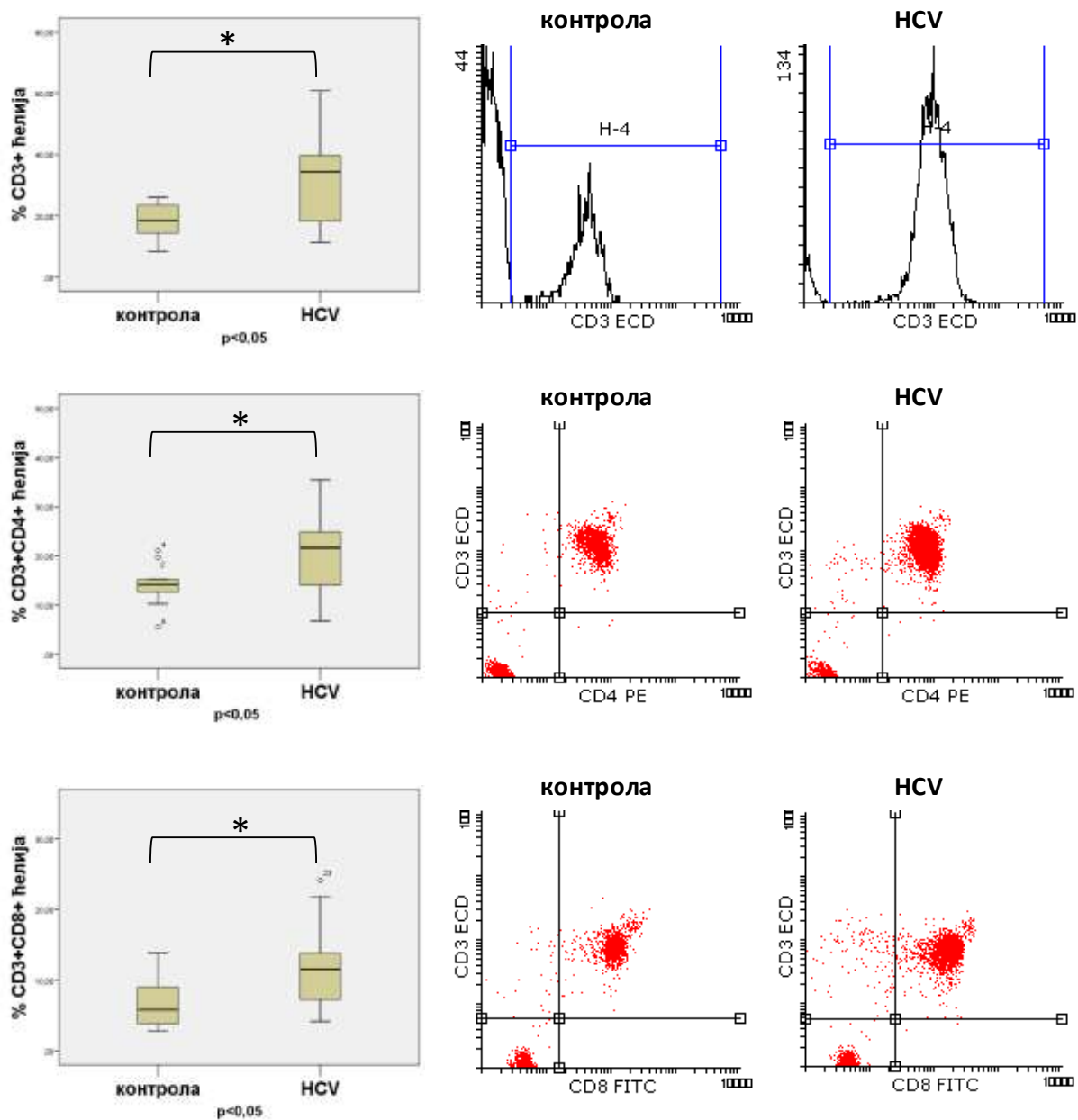


**Слика 4.20.** Промена цитокинског профила код пацијената након завршене терапије у зависности од стадијума фиброзе (F0, F1, F3). Представљена је разлика између средњих вредности нивоа цитокина пацијената и контрола. X-оса представља непостојање разлике. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$

Код пацијената без фиброзе (F0), који су пре терапије имали статистички значајно више вредности IL-4 у односу на контролу, овај цитокин је и после завршене терапије био статистички значајно виши него у контролној групи. У све три групе пацијената (F0, F1, F3) вредности IL-1β, IL-13 и IL-5 биле су статистички значајно ниже у поређењу са контролом (Слика 4.20.). Сви остали цитокини, изузев IL-17 и IL-22 у групи F0 и F1, били су нижи код пацијената, али без статистичке значајности.

## 4.5 Анализа нивоа експресије мембранских молекула методом проточне цитометрије

У нашем истраживању користили смо технике проточне цитометрије да би одредили ниво експресије молекула који се експримирају на површини ћелијске мембране и то: CD1c, CD3, CD4, FoxP3, CD8, CD11c, CD14, CD15, CD19, CD20, CD57, CD123, HLA-DR. Добијене резултате смо посматрали између три групе испитаника, група формираних на основу стадијума фиброзе јетре.

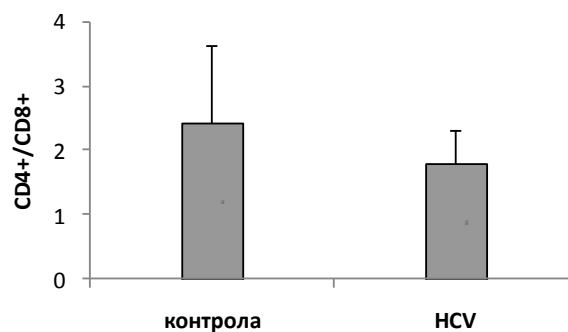


Слика 4.21. Цитометријска анализа процентуалне заступљености Т лимфоцита и Т-лимфоцитних субпопулација у периферној крви 12 пацијената и 11 здравих субјеката (контрола). \* $p < 0,05$ .

У нашем истраживању користили смо технике проточне цитометрије да би одредили ниво експресије молекула који се експримирају на површини ћелијске мембране и то: CD1c, CD3, CD4, FoxP3, CD8, CD11c, CD14, CD15, CD19, CD20, CD57, CD123, HLA-DR. Добијене резултате смо посматрали између три групе испитаника, група формираних на основу стадијума фиброзе јетре.

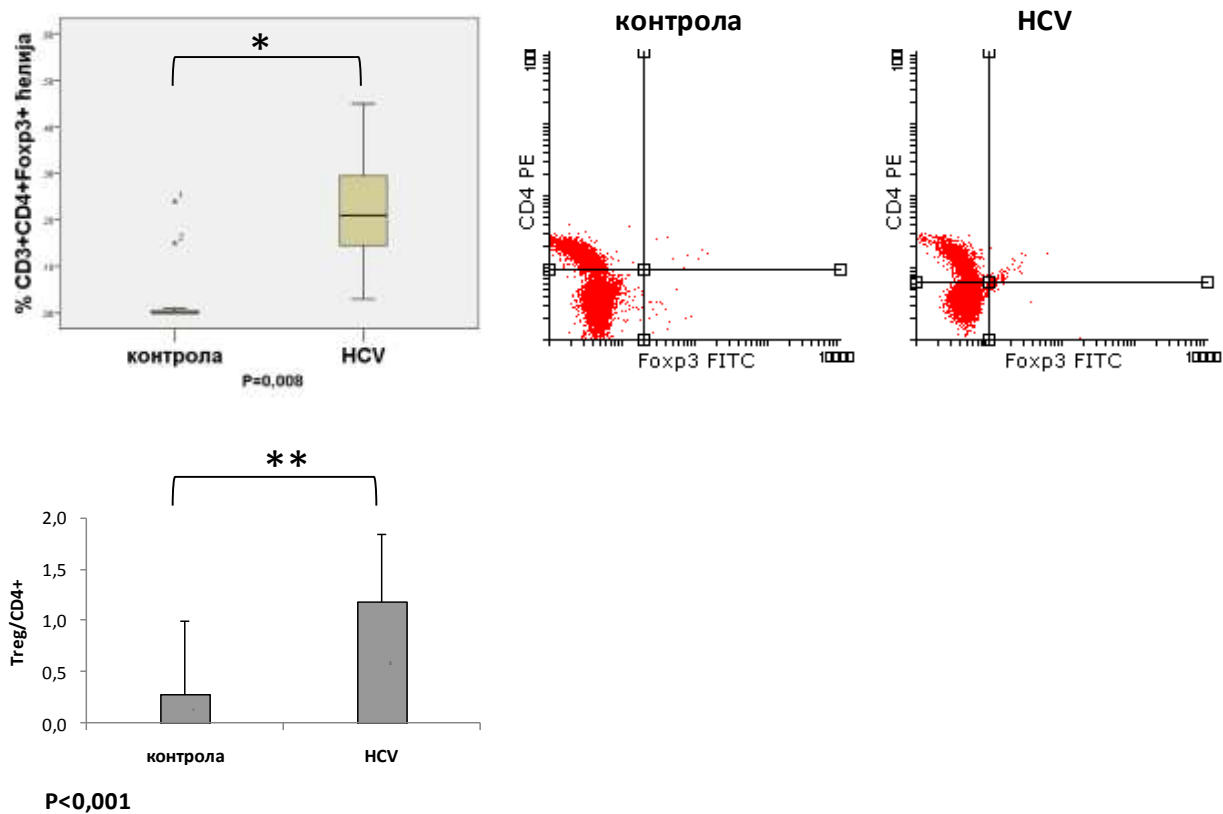
Методом проточне цитометрије одређивали смо процентуалну заступљеност појединих популација ћелија у периферној крви 12 пацијената са хроничном HCV инфекцијом и 11 здравих испитаника (контрола). У групи пацијената процентуална заступљеност свих испитиваних популација моноклеарних ћелија била је већа него код контрола. Број Т лимфоцита (CD3+ ћелије), као и субпопулација помагачких (CD3+CD4+) и цитотоксичних (CD3+CD8+) Т лимфоцита био је статистички значајно већи код пацијената ( $p < 0,05$ ) (Слика 4.21.).

Иако је однос CD3+CD4+ и CD3+CD8+ ћелија био нижи код пацијената, што указује на повећање броја цитотоксичних Т лимфоцита у односу на помагачке, ова разлика није била статистички значајна (Слика 4.22.).



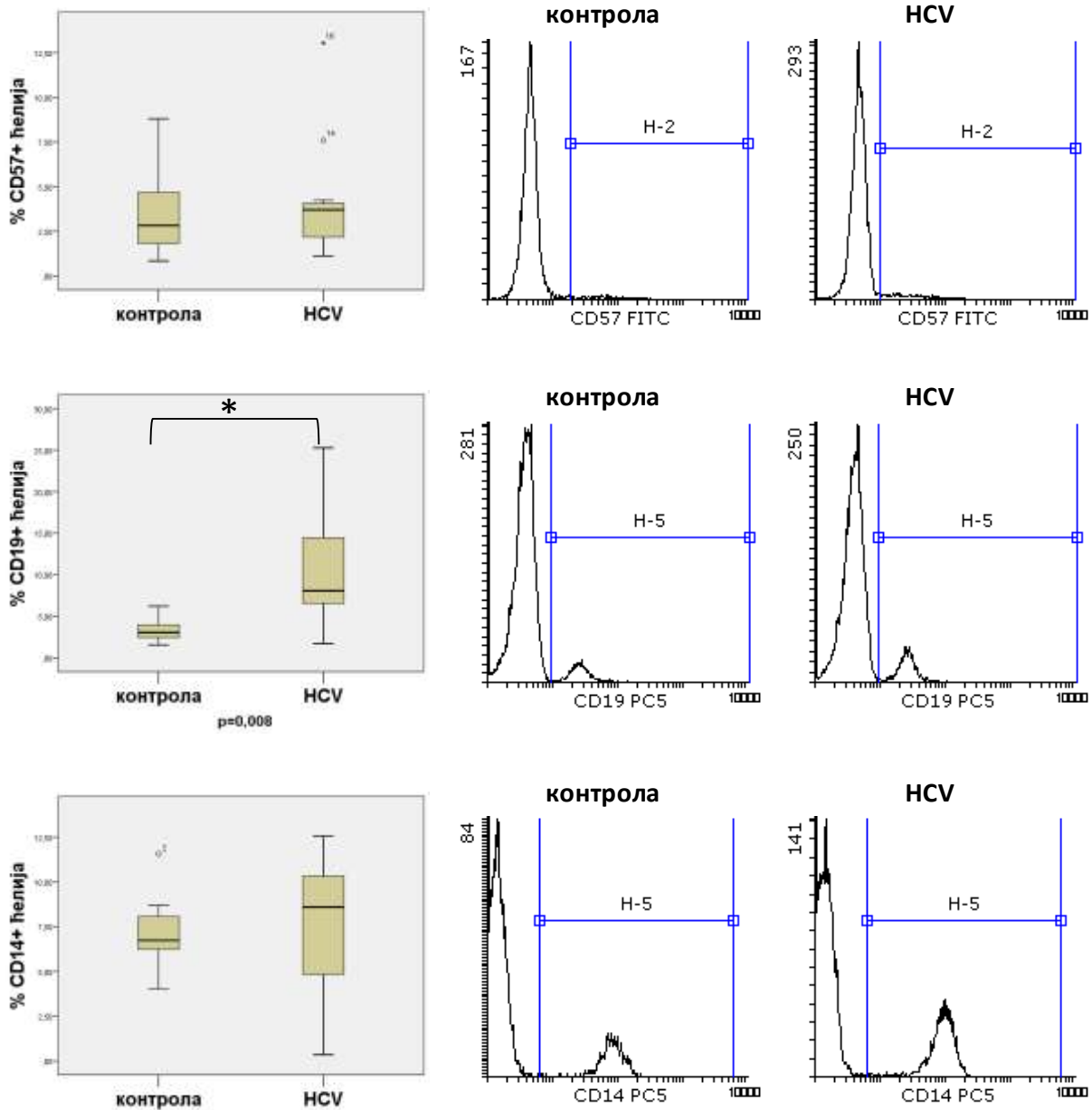
Слика 4.22. Однос помагачких и цитотоксичних Т лимфоцита у периферној крви 12 пацијената и 11 здравих субјеката (контрола).

Пацијенти су имали статистички значајно већи проценат CD3+CD4+Foxp3+ ћелија (регулаторни Т лимфоцити; Treg) у односу на контролу ( $p < 0,05$ ), а такође је и процентуална заступљеност Treg у популацији CD3+CD4+ била већа код пацијената (висока статистичка значајност,  $p < 0,001$ ) (Слика 4.23.).



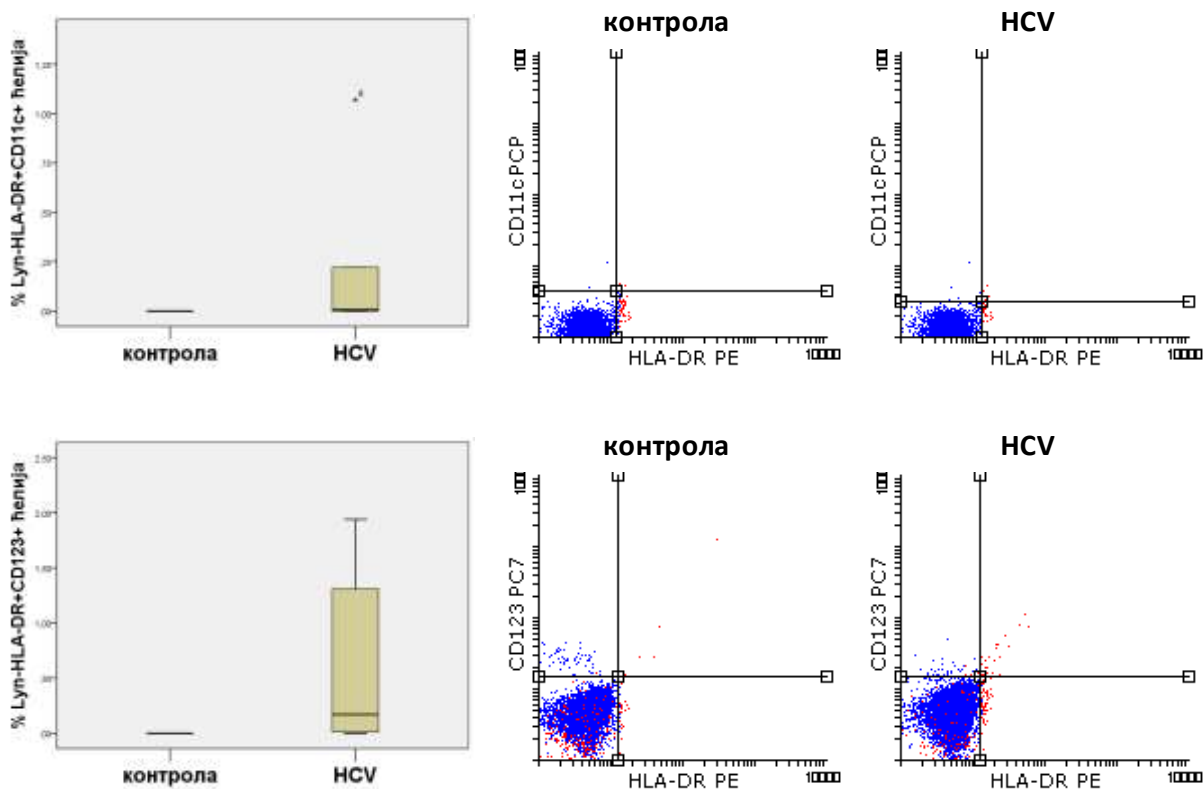
**Слика 4.23.** Цитометријска анализа процентуалне заступљености  $CD3+CD4+Foxp3+$  Т лимфоцита (А) и приказ процентуалне заступљености Трег у популацији  $CD3+CD4+$  (Б) у периферној крви 12 пацијената и 11 здравих субјеката (контрола). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,001$

Процент  $CD57+$  ћелија (NK ћелије), моноцит/макрофага ( $CD14+$ ) и В лимфоцита ( $CD19+$ ) такође је био виши код пацијената, али је разлика била статистички значајна само у случају В лимфоцита ( $p<0,05$ ) (Слика 4.24).



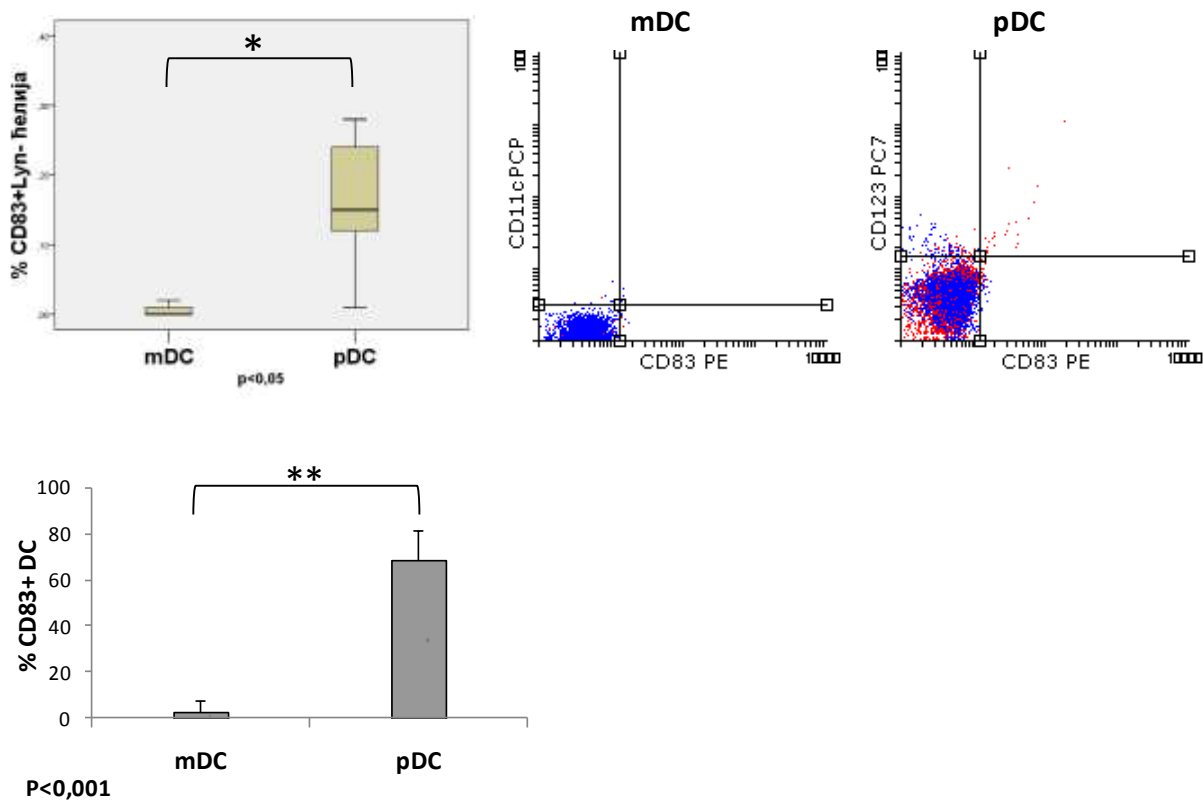
Слика 4.24. Цитометријска анализа процентуалне заступљености NK ћелија, В лимфоцита и моноцит/макрофага у периферној крви 12 пацијената и 11 здравих субјеката (контрола). \* $p < 0,05$

Дендритске ћелије смо детектовали као ћелије негативне за маркере Т лимфоцита (CD3), В лимфоцита (CD19) и моноцит/макрофага (CD14) (Lyn-), а позитивне за HLA/DR антиген. Мијелоидне (Lyn-HLA-DR+CD11c+), као и плазмоцитоидне дендритске ћелије (Lyn-HLA-DR+CD123+) биле су заступљене у већем проценту код пацијената у односу на контролу, али ова разлика није била статистички значајна (Слика 4.25.).



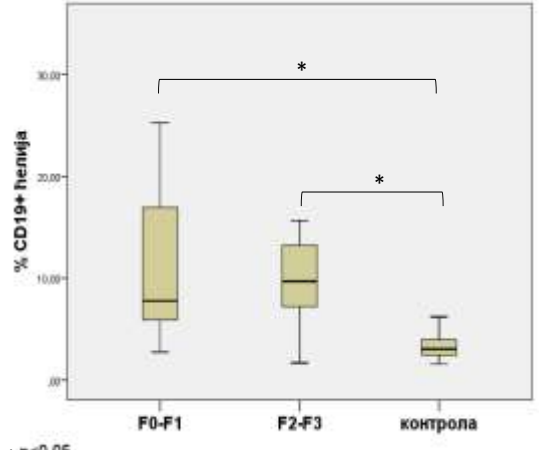
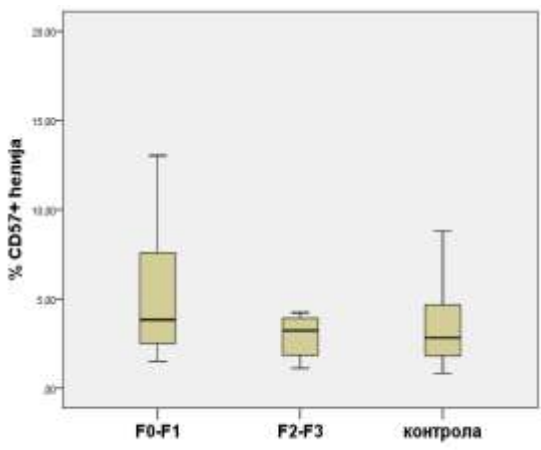
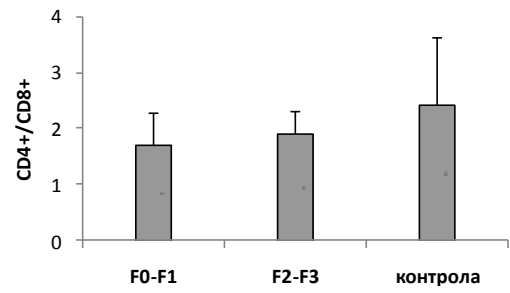
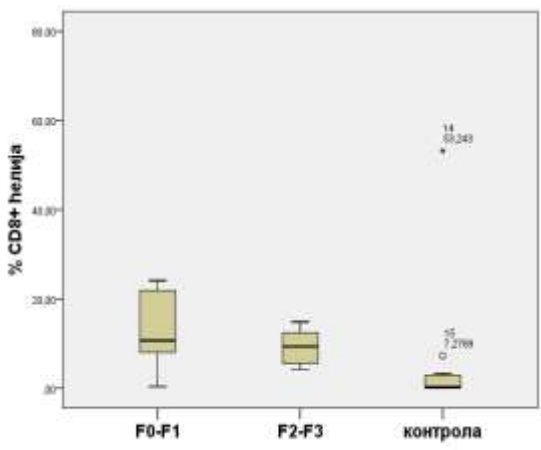
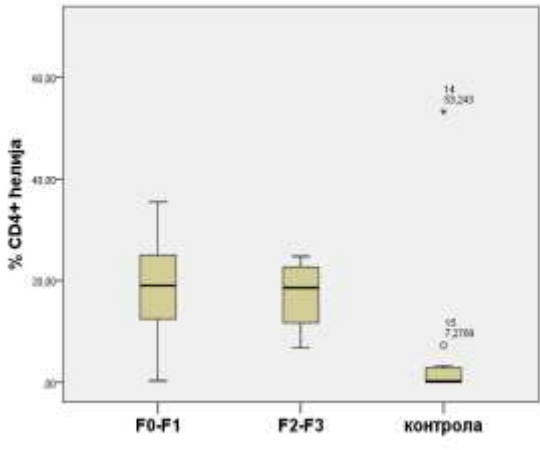
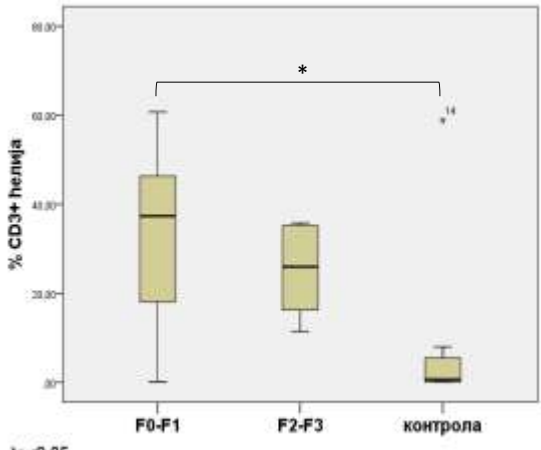
**Слика 4.25.** Цитометријска анализа процентуалне заступљености мијелоидних (*Lyp-HLA-DR+CD11c+*) и плазмоцитоидних (*Lyp-HLA-DR+CD123+*) дендритских ћелија у периферној крви 12 пацијената и 11 здравих субјеката (контрола).

Да бисмо добили податак о активационом статусу ових популација дендритских ћелија код пацијената, пратили смо експресију CD83 молекула, маркера активације, на *Lyp*- мононуклеарним ћелијама. Резултати мерења су показали да је заступљеност активираних плазмоцитоидних у односу на активираних мијелоидне дендритске ћелије у периферној крви пацијената статистички значајно већа ( $p < 0,05$ ), а да је, посматрано у оквиру популације активираних дендритских ћелија, ова разлика високо статистички значајна ( $p < 0,001$ ) (Слика 4.26).

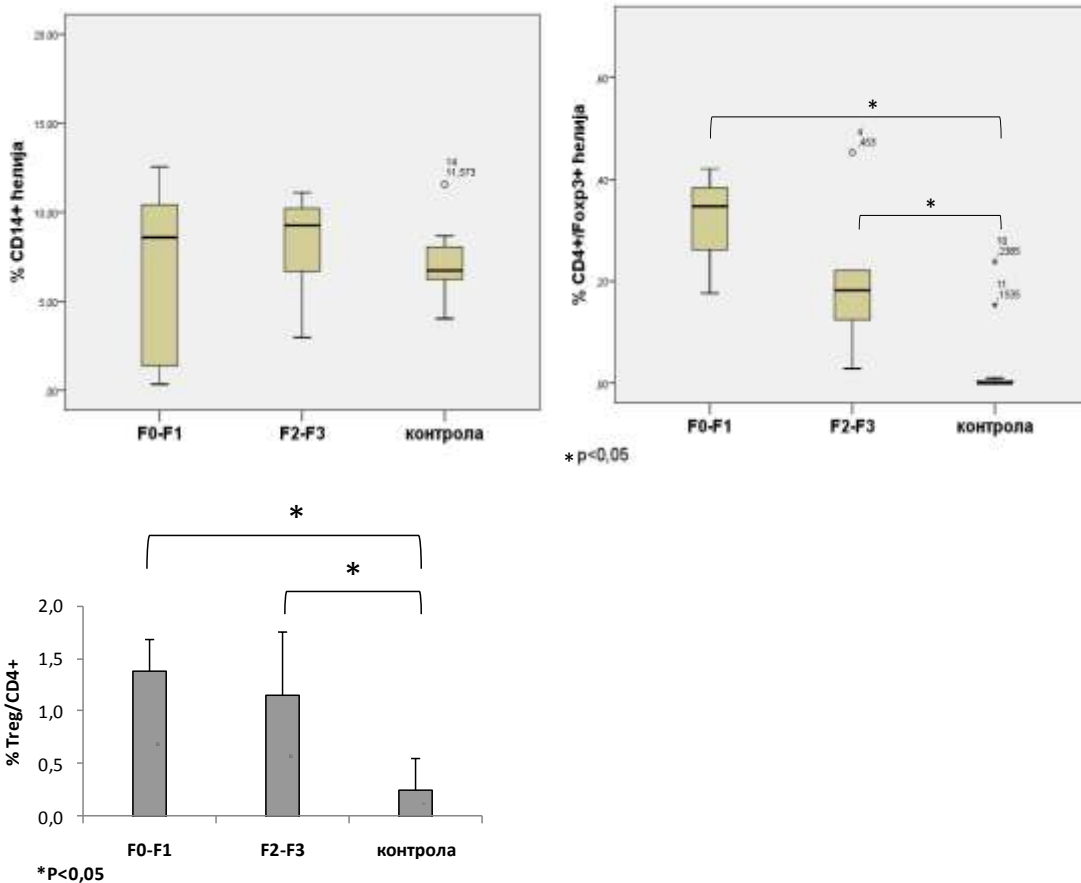


**Слика 4.26.** Цитометријска анализа процентуалне заступљености активираних мијелоидних (Lup-CD83+CD11c+) и плазмоцитоидних (Lup-CD83+CD123+) дендритских ћелија у периферној крви (А) и у оквиру популације активираних дендритских ћелија (Б) код 12 пацијената. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$

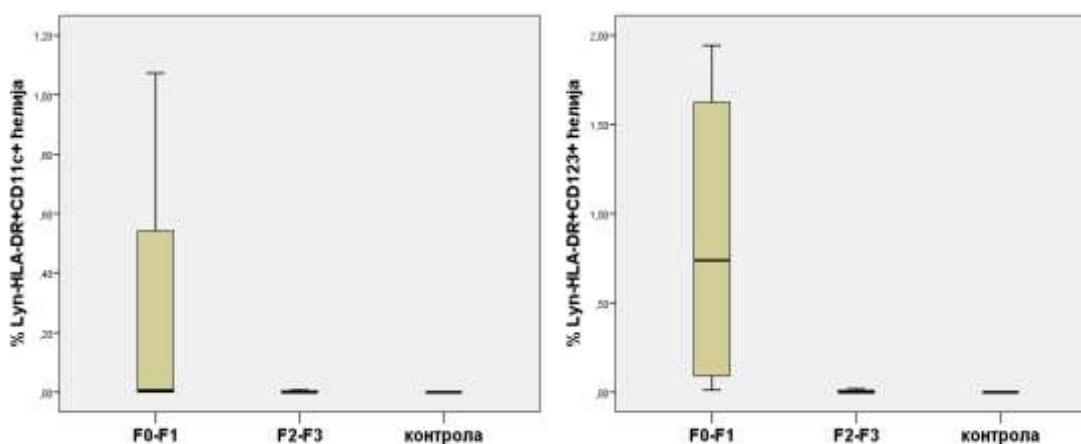
Податке добијених методом проточне цитометрије груписали смо према стадијуму фиброзе у две групе. Прву групу (F0-F1) чинило је 6 пацијената без фиброзе или са почетним стадијумом фиброзе, а другу групу (F2-F3) 6 пацијената са вишим стадијумима фиброзе. Анализа података је показала да је процентуална заступљеност укупне популације Т лимфоцита, као и појединачних субпопулација – помагачких, цитотоксичних и регулаторних Т лимфоцита, затим НК ћелија и дендритских ћелија, највећа код пацијената из F0-F1 групе, и да се са повећањем стадијума фиброзе ове вредности смањују и приближавају контролним вредностима. Статистички значајна разлика је забележена у процентуалној заступљености укупне популације Т лимфоцита (F0-F1 vs. контрола  $p < 0,05$ ) и регулаторних Т лимфоцита (F0-F1 vs. контрола  $p < 0,05$ ; F2-F3 vs. контрола  $p < 0,05$ ). Процентуална заступљеност В лимфоцита и моноцит/макрофага је у F0-F1 групи била нижа него у F2-F3 групи, али без статистичке значајности, а у обе групе проценат В лимфоцита је био статистички значајно виши у односу на контролу ( $p < 0,05$ ) (Слика 4.27.).







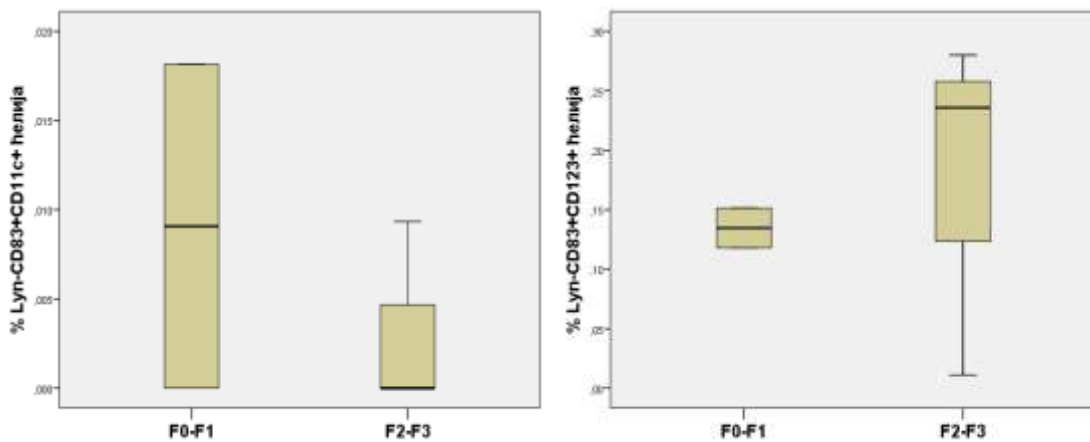
Слика 4.27. Цитометријска анализа процентуалне заступљености Т лимфоцита, NK ћелија, В лимфоцита и моноцит/макрофага у периферној крви 12 пацијената по стадијумима фиброзе и 11 здравих субјеката (контрола) (А) и приказ процентуалне заступљености Treg у популацији CD3+CD4+ ћелија (Б).  $*p < 0,05$



Слика 4.28. Цитометријска анализа процентуалне заступљености мијелоидних (Lyn-HLA-DR+CD11c+) и плазмоцитоидних (Lyn-HLA-DR+CD123+) дендритских ћелија у периферној крви 12 пацијената по стадијумима фиброзе и 11 здравих субјеката (контрола).

Процентуална заступљеност мијелоидних (Lyn-HLA-DR+CD11c+) и плазмоцитоидних (Lyn-HLA-DR+CD123+) дендритских ћелија у периферној крви пацијената из групе F0-F1 била је већа него у другој групи пацијената, код које су ове вредности биле исте као у контролној групи (Слика 4.28.).

У популацији активираних дендритских ћелија заступљеност мијелоидних дендритских ћелија је била већа у F0-F1 групи, док је проценат плазмоцитоидних дендритских ћелија био већи код пацијената са вишим стадијумима фиброзе (Слика 4.29.).



Слика 4.29. Цитометријска анализа процентуалне заступљености активираних мијелоидних (Lyn-CD83+CD11c+) и плазмоцитоидних (Lyn-CD83+CD123+) дендритских ћелија у популацији активираних дендритских ћелија у периферној крви пацијената по стадијумима фиброзе. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

## 5 ДИСКУСИЈА

Претпоставља се да око 180 милиона људи широм света, има хроничну HCV инфекцију (66). Акутна HCV инфекција у већини случајева (>80%) протиче као олигосимптоматска или асимптоматска болест. Физикални налаз је најчешће оскудан или нормалан, сем у случајевима када су присутне компликације болести: декомпензована цироза јетре и хепатоцелуларни карцином. Након акутне фазе која је обично субклиничка, спонтана резолуција HCV инфекције догађа се у само 20 % оболелих (74). Процењује се да су само 30-50% HCV заражених појединаца свесни своје болести и могу искористити могућност лечења а самим тим избећи ризик од даљег преношења вируса (73).

Инфекција хепатитис Ц вирусом у Европи континуирано еволуира током последње две декаде и тај развој доводи и до промена епидемиолошких карактеристика (преваленца, инциденца, начин преношења, ризичне групе, дистрибуција генотипа) ове инфекције. Неки од главних разлога који су одговорни за ове промене су повећана сигурност деривата крви, побољшање услова пружања медицинске неге и континуирана експанзија интравенске наркоманије. Као последица тога водећи фактор ризика за оболевање од HCV инфекције до 1990. године била је трансфузија крви и деривата крви, а данас је то свакако интравенска употреба психоактивних супстанци (75, 82, 299, 300). Управо је интравенска употреба психоактивних супстанци, код више од трећине испитаника, била најчешћи фактор ризика и у нашој испитиваној групи. Високим процентом били су представљени и испитаници код којих је фактор ризика трансфузија крви и дијализа, док мањи проценат долази на сексуални контакт, перинаталну трансмисију и професионално оболевање (медицинско особље) као фактор ризика. За нешто мање од трећине испитаника фактор ризика био је непознат. Неке светске студије (82, 300) показују да је раширеност хепатитис Ц инфекције већа код мушкараца него жена, што је присутно и у нашем истраживању. Анализирајући податаке о заступљености HCV инфекције међу половима у испитиваној групи, показали смо да између особа различитог пола постоји статистички значајна разлика у учесталости инфекције. Наиме, готово две трећине испитаника су представљали мушкарци а једну трећину жене. Мушкарци су вероватно изложенији факторима ризика за настанак хепатитиса Ц, (интравенска употреба психоактивних супстанци), јер је сама осетљивост на вирус HCV-а иста међу половима. Промене епидемиолошких карактеристика, на првом месту начина преноса инфекције, односно доминација

ИВУПАС у односу на раније доминантне путеве трансмисије (трансфузија, дијализа...) условиле су и промене старосне структуре оболелих од хроничне HCV инфекције. Просечна старост у нашој испитиваној групи, износила је 41 годину, мада се у анализи старосне структуре у односу на факторе ризика уочава да су ИВУПАС пацијенти млађе старосне доби у односу на пацијенте који су инфекцију добили преко заражене крви или хемодијализом. Овај тренд је забележен и у осталим регијама Европе и прати већ поменуте епидемиолошке промене HCV инфекције. У северној Европи, где је ИВУПАС доминантан пут преноса инфекције најугроженије су особе млађе старосне доби (до 30 година) (301-303).

У централној и јужној Европи, као и у нашем истраживању, уочавају се две старосне групације, млађа коју чине особе ИВУПАС ризичне групе и старија (преко 50 година) коју чине особе које су пре 1990 год. инфициране контаминираним медицинским помагалима и дериватима (302, 304, 305).

Исте промене одговорне су и за промену дистрибуције и фреквенције HCV генотипова јер је добро познато да је дистрибуција генотипова повезана са начином трансмисије тако да су субтипови 1a, 3a и 4 доминантно удружени са ИВУПАС, док су генотипови 1b и 2 повезани са трансфузијом крви и другим инвазивним медицинским процедурама (306, 307-310).

Отуда су неки HCV генотипови широко распрострањени свуда у свету (1a, 1b, 2a и 2b) док се други (5a и 6a) појављују на ограниченим географским подручјима. На пример, у Северној Америци генотип 1a је доминантан, а прате га 1b, 2a, 2b и 3a (59). У Европи доминира генотип 1b, а прате га 2a, 2b, 2c и 3a (57, 302, 304, 311) Генотипови 4 и 5 налазе се искључиво само у Африци (56), мада најновији подаци говоре да се и он шири изван својих упоришта у Африци, све чешће се детектује у свим Европским земљама са великим процентом у Француској (312, 307-309). Генотип 6 је углавном заступљен у Југоисточној Азији (69). У нашој групи испитаника такође постоји значајна разлика када је у питању заступљеност појединих генотипова. Наиме добијени резултати показују да је најзаступљенији генотип 1, на који долази нешто мање од две трећине испитаника, генотип 3 је заступљен са једном трећином, док су генотипови 4 и 2 заступљени са пар процената испитаника.

Савремени стандард у терапији хроничне HCV инфекције је терапија пегилованим интерфероном и рибавирином. Основни циљ у терапији хроничне HCV инфекције је постизање трајног вирусолошког одговора (SVR) који дефинише одсуство

детектабилне HCV RNK (<50IU/ml) након 24 недеље антивирусне терапије. Исход HCV инфекције и одговор на примењену терапију зависе од бројних фактора, како домаћина, тако и вируса. Описани су бројни фактори везани за вирус, домаћина као и фактори ризика који могу утицати на исход ове терапије. Систематским прегледом литературе, Кау и сар. су показали да су најзначајнији независни предиктори повољног терапијског одговора на стандардну терапију пегилованим интерфероном и рибавирином HCV генотипови 2 и 3, виремија нижа од 400.000-800.000IU/ml, млађи узраст, низак ново GGT, одсуство узнапредовале фиброзе и одсуство стеатозе (313). Сличне налазе наводе и друге студије у којима се поред наведених предиктора помињу и пол, низак ниво ALT и број тромбоцита (265, 313-315). Ипак, као најбољи предиктор терапијског успеха издваја се рапидни вирусолошки одговор, тј. недетектабилна вирусна RNK након 4 недеље терапије (287, 289).

Анализирајући факторе ризика, утврдили смо да је код болесника са SVR одговором то најчешће интравенска употреба психоактивних супстанци, док су трансфузија крви и дијализа водећи фактор ризика за болеснике са NR и RR одговором, што је у потпуној сагласности са ранијим резултатима других аутора (75, 82, 304). Насупрот литературним подацима који указују да је женски пол позитиван демографски предиктор SVR (317-319) заступљеност полова између NR/RR и SVR испитаника у нашој студији се није разликовала. Са друге стране показана је висока позитивна корелација између млађе животне доби и повољног исхода терапије. Резултати униваријантне логистичке регресије су показали да терапијски одговор зависи од година старости, тако да се шанса за добар терапијски одговор смањује за 3.5 % са сваком годином живота. Слично нашим налазима, неколико ранијих студија је показало да је млађе животно доба позитиван предиктор повољног одговора на терапију (317-319). Насупрот хроничној HBV инфекцији у литератури није описана јасна асоцијација серумског нивоа ALT и повољног одговора на терапију, али су зато бројне студије указале на високу позитивну повезаност исхода терапије и серумског нивоа GGT (320-322).

Резултати нашег истраживања такође указују да серумски ниво ALT није добар показатељ исхода терапије. Бројне студије су показале да су најзначајнији хистолошки предиктори SVR одсуство узнапредовале фиброзе и стеатозе јетре (319, 323, 324).

Анализом односа између стадијума фиброзе и одговора на терапију, дошли смо до истоветних резултата. Највећи проценат болесника са одсуством фиброзе налази се у

групи болесника са повољним одговором на терапију (SVR), а најмањи међу болесницима са неповољним одговором на терапију (RR и NR). Овај налаз потврђен је и униваријантним моделом којим је показано да одговор на терапију зависи од стадијума фиброзе тако да виши стадијуми фиброзе (F3-F4) смањују шансу могућег доброг одговора око 4 пута. Као што је добро познато, изузев генотипа 1, други HCV генотипови и ниска базална виремија су најзначајнији предиктори повољног одговора на терапију (317-319, 323). Слично литературним подацима наша студија указује да је базални ниво HCV RNK један од фактора блиско повезаних са исходом терапије. Наиме најмањи базални ниво HCV RNK регистрован је у групи болесника са повољнијим одговором на терапију док је тај број био значајно виши у групи болесника са неповољнијим одговором. Такође, анализом учесталости појединих генотипова утврдили смо да је генотип 1 преодминантан у групи болесника са NR одговором код којих је овај генотип присутан у веома високом проценту. У осталим групама, генотип 1 је такође доминантно присутан али је његов проценат у групи пацијената са повољним одговором знатно мањи. Генотип 3 је високим процентом присутан код болесника са повољним одговором на терапију (SVR), али је присутан и код болесника са (RR/NR) одговором. Генотип 4, као и генотип 2, регистрован је код малог броја болесника. Применом пегилованог интерферона и рибавирина у терапији хроничног хепатитиса Ц, трајна ерадикација вируса (SVR) постиже се у 50-60% случајева (317, 318). У нашој студији одговор на терапију код испитаника показао је јасну поларизацију. На једном, процентуално доминантнијем полу, нашли су се болесници код којих је забележен повољан одговор на терапију (SVR), готово  $\frac{3}{4}$  испитаника, док је други пол представљен болесницима са неповољним одговором (NR и RR) који су чинили преосталу четвртину испитанику. Нешто виши проценат пацијената са повољним одговором у нашој студији може се објаснити високим процентом ИВУПАС пацијената са генотипом 3 који је осетљивији на терапију интерфероном и рибавирином. Са друге стране, у групи испитаника код којих је најзначајнији пут трансмисије била трансфузија, доминантна присутност генотипа 1 је условила већи проценат болесника са неповољним одговором на терапију.

Сумарно, од демографских, хистолошких, биохемијских, и вирусних параметара анализираних у униваријантном моделу логистичке регресије, као значајни предиктивни фактори одговора на терапију, у нашем истраживању, издвојили су се старост испитаника, фактори ризика и стадијум фиброзе. Са друге стране, резултати

мултиваријантног модела пак, показују да се као најзначајнији предиктивни фактор издвајају фактори ризика и то трансфузија која смањује шансу доброг одговора око 6 пута.

Патогенеза HCV инфекције је резултат мултиплих интеракција између имунског система домаћина и вирусних фактора (63, 66, 68). HCV инфекција резултира појавом HCV RNK у крви 1 до 2 недеље након инокулације вируса (92) али истовремено и појавом ефекторских механизма урођене и стечене имуности (178). Снажан HCV специфичан CD4+ и CD8+ Т ћелијски одговор усмерен на мултипле HCV епитопе у неким случајевима омогућава спонтану елиминацију вируса у акутној фази инфекције (109, 110). Међутим, HCV вирус поседује различите механизме којима, током ране фазе акутне инфекције, може да избегне одбрамбене снаге домаћина, што омогућава даљу прогресију болести у хроничну фазу (132).

Као последица хроничне упале и сталног присуства процеса инфламације, регенерације и фиброзе, у многим случајевима коначно долази до развоја цирозе и хепатоцелуларног карцинома као најтежег облика имунопатолошког оштећења јетре.

Успешна елиминација вируса у акутној HCV инфекцији описана је у болесника с високом фреквенцијом Т-лимфоцита специфичних за широки репертоар HCV антигена, Th1 типом цитокинског профила (доминантна синтеза IFN- $\gamma$ ) и карактеристичним фенотипским и функционалним обележјима антиген-специфичних лимфоцита (122).

Кључну улогу у излечењу и спречавању развоја хроничне HCV инфекције имају HCV специфични Т лимфоцити. Велики значај ових ћелија у акутној фази инфекције, огледа се у томе што су они главни контролори репликације вируса и његове елиминације из организма болесника. Запаљенски инфилтрат у хроничној HCV инфекцији састоје се од великог броја Т ћелија и њихова активација може у великој мери бити критична за исход запаљенске реакције (147, 148).

Активирани помагачки CD4+ и цитотоксични CD8+ Т лимфоцити специфични за HCV појављују се у јетри болесника у раним фазама акутног хепатитиса (121). Сматра се да имунски одговор посредован CD4+Т ћелијама, има протективни учинак, те да би могао бити значајан за елиминацију вируса (94, 125). Показано је да је проинфламаторни имунски одговор са преминацијом CD4+Т лимфоцита у порталном простору удружен са блажим облицима болести и елиминацијом вируса (83). Степен HCV специфичног CD4+ Т ћелијског одговора одређује ниво прогресије болести и

обрнуто је пропорционалан са нивоом јетриног оштећења (146). Са друге стране, улога HCV-специфичних CD8+ Т-лимфоцита у патогенези HCV инфекције је контроверзна. Наиме, нека истраживања су показала негативну корелацију између броја HCV-специфичних CD8+ Т-лимфоцита и виремије што указује на важност ових ћелија у контроли вирусне репликације (110,125). Насупрот томе, показано је и да цитотоксичне Т ћелије могу бити кључни медијатори оштећења јетриног паренхима (147). HCV специфичан CD8+ Т ћелијски одговор игра важну улогу у спречавању и отклањању HCV инфекције (118, 121). Током акутне HCV инфекције која је удружена са елиминацијом вируса, већ након 4-8 недеља од инфекције, развија се снажан мултиспецифични CD8+ Т ћелијски одговор (120). Процент HCV специфичних CD8+ Т-лимфоцита у акутној фази инфекције креће се између 2-8% укупних лимфоцита периферне крви, док су те вредности знатно ниже у хроничној фази и то просечно 0,05% (између 0,0-1,2%) од укупних лимфоцита (91). Међутим, код пацијената са хроничним HCV инфекцијом фреквенца интрахепатичних HCV специфичних CD8+ Т ћелија може бити и до двеста пута већа у односу на периферију (119). И поред присуства великог броја интрахепатичних лимфоцита, велика брзина репликације HCV вируса, уз висок степен мутација (131) омогућава вирусу да избегне имунско препознавање (132). Уз то, софистицираним механизмима инхибиције сигналних путева (92, 146) вирус је у стању да заустави не само активацију, већ и сазревање имунских ћелија. Ови налази су потврђени у бројним студијама које су показале да су код болесника који нису успели да елиминишу HCV вирус забележене ниже вредности Т лимфоцита у раној фази инфекције, док су у хроничној инфекцији ове ћелије функционално ослабљене у смислу смањене продукције интерферона и других цитокина значајних за адекватан имунски одговор (126, 127).

Слично томе, пацијенти са хроничном HCV инфекцијом, генерално показују слаб периферни Т ћелијски одговор против HCV (95).

Посматрано са друге стране, продужена активација имунских ћелија у хроничном хепатитису може допринети хепатоцелуларном оштећењу. Многа имуноцитохемијска испитивања у случају HCV инфекције показала су преминацију Т лимфоцита у проширеним портним просторима и инфламаторним лобулусним инфилтратима, што сугерише да ове ћелије имају значајну улогу у оштећењу јетре. Док су CD4+ Т лимфоцити више сконцентрисани у портним и перипортним просторима, CD8+ Т лимфоцити су заступљени и у лобулусним инфилтратима (325).



Мишљење да CD4+ Т лимфоцити могу директно или индиректно да посредују у ткивној деструкцији има своју потврду у студијама које су показале да већа концентрација активних CD4+ Т лимфоцита у јетри одговара тежој форми хепатитиса (326, 327).

Међутим, постоје и другачији налази који указују да је пролиферација CD4+ ћелија удружена са мањим степеном инфламације у јетри, те да су CD4+ Т лимфоцити више укључени у процес заштите домаћина, односно јетре, него у оштећење (328).

Са друге стране, недвосмислено је показано да CD8+ лимфоцити препознају ћелије са HCV пептидима на површини, те да на њих делују цитотоксично и тако их елиминишу, чиме директно доприносе оштећењу јетриног паренхима, поготово у случајевима пролонгиране активације, тј. хроничне инфекције (329).

Наши резултати су показали да између пацијената са повољним одговором на терапију и пацијената са неповољним одговором на терапију постоје значајне разлике у броју и локализацији различитих популација мононуклеарних леукоцита у ткиву јетре. Слично литературним подацима показали смо да су у ткиву јетре пацијената са хроничном HCV инфекцијом CD4+ Т лимфоцити примарно локализовани у портним и перипортним просторима, при чему је већа учесталост забележена код пацијената са повољним одговором на терапију. Са друге стране, CD8+ Т лимфоцити су поред портних простора били заступљени и у лобулусним инфилтратима и некротичним огњиштима, при чему је фреквенција ових ћелија била значајно већа у групи пацијената са неповољним одговором на терапију. Интересантан је налаз да је код пацијената код којих је забележен већи степен оштећења јетриног паренхима, тј. већи стадијум фиброзе, показана већа учесталост како CD4+, тако и CD8+ Т ћелија. При томе, битно је напоменути да се са напредовањем фиброзе број CD8+ Т ћелија повећава у већој мери у односу на CD4+ ћелије, тако да се релативни однос CD4+ и CD8+ Т ћелија помера у правцу CD8+ Т ћелија. Овакав налаз иде у прилог ставова да интрахепатични CD4+ Т лимфоцити имају хепатопротективну улогу, док CD8+ Т ћелије посредују у ткивној деструкцији током хроничне HCV инфекције.

Резолуција примарне HCV инфекције зависи од снажног CD4+ и CD8+ Т ћелијског одговора на мултипле вирусне антигене. Иако је такав снажан одговор често уочљив у раним фазама инфекције, он се не одржава код особа које развијају хроничну болест. Јасно је да на ослабљени Т ћелијски одговор који се виђа код хронично

инфицираних пацијената утичу бројни фактори, на првом месту индукција CD4+Foxp3+ регулаторних Т ћелија и ослабљена функција дендритских ћелија (135).

Бројни налази указују да комплексне интеракције између дендритских ћелија и регулаторних Т лимфоцита имају кључну улогу у патогенези хроничног хепатитиса Ц.

Treg лимфоцити имају значајну улогу у патогенези хроничне HCV инфекције. Студије у којима је показана висока фреквенција Treg ћелија у јетри и периферној крви пацијената са хроничном HCV инфекцијом су указале на велики значај ових ћелија у патогенези хроничне инфекције (138, 139, 146).

Специфична улога Treg лимфоцита у патогенези хроничне HCV инфекције не може бити директно доказана обзиром да у хуманим студијама није могуће одредити тачан моменат успостављања инфекције. Прихваћени консензус указује да одржавање високог нивоа Treg ћелијске популације супримира Т ефекторски одговор и промовише настанак хроничитета. Наиме, показано је да неки HCV епитопи, који настају као последица имунског притиска током почетних фаза инфекције могу да индукују епитоп специфичне Treg ћелије које супримирају конвенционалне CD4+ Т лимфоците неопходне за елиминацију вируса (330).

Такође је показано да Treg ћелије изоловане из крви пацијената са HCV инфекцијом имају способност супресије вирус специфичног CD8+ Т ћелијског одговора (137, 141). Сходно томе, сматра се да у случајевима хроничне инфекције Treg лимфоцити супримирају CD4+ и CD8+ ћелијску активацију, слабе Т ефекторске функције и онемогућавају елиминацију вируса, док са друге стране промовишући перзистенцију вируса и олакшавају успостављање хроничне инфекције.

Са друге стране, управо је способност Treg лимфоцита да супримирају Т ефекторски одговор и промовишу толеранцију антигена и настанак хроничитета одговорна за способност Treg ћелија да лимитирају потенцијално имунопатолошко оштећење јетриног паренхима (143, 145, 149).

Овакви налази упућују на сценарио у коме се активација Treg лимфоцита дешава касније током перзистенције вируса, при чему ове ћелије имају првенствено улогу у ублажавању имунопатолошког оштећења изазваног пролонгираном Т ћелијском стимулацијом. Наиме показано је да је у односу на здраве особе, код пацијената са HCV инфекцијом запажена обимнија инфилтрација јетре CD4+Foxp3+ Treg ћелијама, при чему је највећа фреквенција CD4+Foxp3+ Treg ћелија забележена код пацијената

хронично заражених HCV-ом (149). Значајан је и податак да су ове ћелије локализоване првенствено у области порталног крвотока (331). Интрахепатичне CD4+Foxp3+ Treg ћелије код пацијената у различитим стадијумима болести показују потпуно диферентовани и високо активирани фенотип, и бројнији су у случајевима HCV инфекције са благом фиброзом, сугеришући важну улогу интрахепатичних Treg ћелија на ток и исход хроничне HCV инфекције. Пораст у броју ових ћелија повезан је са мањим оштећењем, док је смањење њиховог броја у корелацији са повећаном продукцијом инфламаторних цитокина у првом реду IFN- $\gamma$  и пролиферацијом HCV специфичних CD8+T лимфоцита (137-139), а самим тим и већом некрозом хепатоцита. Treg ћелије своју протективну функцију у односу на хепатоците испољавају инхибицијом ефекторских T ћелија, било директним контактом са овим ћелијама (144), било индиректно секрецијом TGF- $\beta$  и IL-10. (144, 145). Стога се сматра се да управо интрахепатичне Treg ћелије играју кључну улогу у одржавању равнотеже између спречавања имунопатолошког оштећења и омогућавања имунског одговора са отклањањем инфекције (135).

Резултати нашег истраживања су донекле у сагласности са литературним подацима. Наиме, слично наведеним студијама, резултати нашег испитивања указују на присуство великог броја Foxp3 ћелија у ткиву јетре код пацијената са хроничном HCV инфекцијом. Такође, показали смо да су интрахепатичне Foxp3 ћелије примарно локализоване у портним просторима. У складу са сугерисаном улогом ових ћелија у патогенези хроничне инфекције, показали смо да пацијенти са повољним одговором на терапију имају значајно већу фреквенцију интрахепатичних Foxp3 ћелија у односу на пацијенте са неповољним одговором. Податак да смо у нашем истраживању утврдили високу учесталост Foxp3 ћелија код пацијената код којих је забележен већи стадијум оштећења јетриног паренхима, је делом контрадикторан у односу на неке публиковане студије. Ипак, обзиром да је у хуманим студијама, као што је наша, немогуће тачно одредити тренутак у прошлости у коме се десила инфекција, специфична улога Foxp3 ћелија у настанку имунопатолошког оштећења јетре не може бити прецизно утврђена. Једна од могућности која се уклапа у предпостављено хепатопротективно деловање ових ћелија је та да се активација и интрахепатична акумулација Treg лимфоцита дешава као последица пролонгираног инфламаторног одговора у случајевима у којима HCV користећи софистициране механизме успешно избегава неспецифичну и специфичну имуност.

Значајну улогу у регулисању функционисања Treg ћелија игра протеин програмиране ћелијске смрти 1. Релативно нижа експанзија интрахепатичних Treg, повезана је са негативном регулацијом од стране PD-1 (157).

Резултати до којих смо ми дошли показују да између испитаника са повољним и неповољним одговором на терапију, како и између пацијената са различитим стадијумом фиброзе не постоје значајне разлике у заступљености PD-1 молекула

И поред бројних истраживања, до данас није успостављен консензус у вези начина деловања и ефеката HCV вируса на функцију DC (332).

Опште је прихваћено да је број, како pDC, тако и mDC, у периферној крви, значајно нижи код особа које имају хроничну HCV инфекцију (333-335).

Шта више, број циркулишућих DC негативно корелира са нивоом серумског ALT и тежином болести (336).

Интересантно је напоменути да, док број pDC и mDC у периферној крви опада, број обе субпопулације DC расте у јетри хронично инфицираних пацијената (93, 337, 358).

Поред тога однос mDC/pDC ћелија у јетри је виши у односу на периферну крв, што указује на то да су mDC доминантне DC које мигрирају у огњишта инфламације у јетри (336, 337).

Нормално би након сазревања у здравој јетри, а услед промене експресије хемокинских рецептора (смањена експресија CCR5, повећана експресија CCR7) DC мигрирале у T ћелијске регије лимфних чворова (339, 340).

Насупрот томе, код хронично инфицираних особа показано је да и pDC и mDC имају високу експресију CCR5, али не и CCR7 (338, 340).

Овакви налази навели су многе ауторе да спекулишу како је ослабљени анти-вирусни одговор који карактерише хроничну HCV инфекцију делом последица неспособности DC да напусте јетру и мигрирају у регионални лимфни чвор у коме би те ћелије активирале вирус специфичне T лимфоците (337, 338).

Невезано за дистрибуцију DC у јетри и периферној крви, контрадикторни подаци указују да функција ових ћелија код пацијената са хроничном инфекцијом може бити очувана (341-343) или ослабљена (333, 341).

Функционални поремећаји обухватају снижену продукцију IFN- $\alpha$  и IL-12, појачану секрецију IL-10, снижену експресију HLA-DR и костимулаторних молекула као што је CD86, снижену алостимулаторну активност и повећану способност активације Treg ћелија (333, 337, 341).

Поред тога, показано је да DC хронично инфицираних пацијената могу бити фенотипски незреле (344, 345).

Насупрот хронично инфицираним пацијентима, DC здравих особа и особа које су елиминисале HCV су фенотипски и функционално веома сличне (341,344).

Са друге стране, неке студије указују да DC хронично инфицираних пацијената ни фенотипски ни функционално нису измењене у односу на здраве особе (341,342).

Сагласно великом броју студија, резултати нашег испитивања су показали да се у јетри пацијената са хроничном HCV инфекцијом детектује велики број дендритских ћелија, локализованих првенствено у подручју порталног крвотока. Интересантно је напоменути да је велики број ендотелних ћелија синусоида јетре показивао високу експресију DC специфичног маркера DC-SIGN. Високу учесталост интрахепатичних DC утврдили смо и код пацијената са повољним и код пацијената са неповољним одговором на терапију, тако да између ове две групе испитаника не постоји статистички значајна разлика у заступљености DC-SIGN+ ћелија. Анализирајући податке о фреквенцији интрахепатичних DC-SIGN+ ћелија у односу на стадијум оштећења јетриног паренхима, дошли смо до очекиваног податка да је број DC-SIGN+ ћелија код испитаника без фиброзе готово дупло већи него код испитаника са тежим оштећењем јетриног паренхима.

Хепатитис Ц вирус није сам по себи цитопатоген за инфицирану ћелију. Оштећење јетре је углавном поседица имунског одговора на инфекцију. Код акутне инфекције оштећење јетре корелира са имунским одговором, а не са репликацијом вируса. Код асимптоматских носилаца оштећење не мора да се развије иако се вирус репликује. Улазак вируса у организам индукује и урођени и адаптивни имунски одговор, али је у већини случајева овај одговор недовољан да елиминира вирус, па се развија хронични хепатитис. Важност специфичног имунског одговора у елиминацији вируса потврђена је у *in vivo* експериментима на шимпанзама, које се најчешће користе као модел за изучавање хепатитиса. Снажан, дуготрајан, мултиспецифичан CD8+ Т

ћелијски одговор детектован је код животиња које су елиминисале вирус, али не и код животиња код којих се развила хронична инфекција (346).

Деплеција CD4+ и CD8+ Т лимфоцита помоћу антитела доказала је есенцијалну улогу обе субпопулације Т лимфоцита у елиминацији инфекције. (347). Хуморална имуност такође има важну улогу у елиминацији вируса. Антитела специфична за антигене вирусног омотача могу да спрече инфекцију хепатитис Ц вирусом код шимпанзи. (348).

Све компоненте специфичне имуности су повезане, па смањена функција једне компоненте утиче на ефикасност осталих. Недостатак помоћи CD4+ Т лимфоцита утиче на активност CD8+ Т ћелија и на продукцију антивирусних антитела. Смањење CD8+ Т ћелијског одговора резултира у повећању броја вирусних копија који превазилази могућност хуморалног имунског одговора да елиминише вирус. Само потпун и координисан неспецифични и специфични имунски одговор може да се избори са инфекцијом. Међутим, у 80% случајева инфекција HCV вирусом постаје хронична.

Исход инфекције зависи од многих фактора као што су генотип (349) и генетичка варијабилност вируса (350) снага имунског одговора (351) и продукција цитокина (352).

Током акутне инфекције снажан целуларни одговор, Th1 цитокински профил и хуморални имунски одговор могу да доведу до резолуције инфекције. Међутим, вирус хепатитиса Ц је развио механизме који му омогућавају да избегне и неспецифични и специфични имунски одговор, што објашњава високу стопу хроничитета.

Велика генетичка варијабилност вируса омогућава стварање мутаната са измењеним секвенцама у имунодоминантним епитопима који могу избећи неутрализацију антителима и препознавање од стране цитотоксичних Т лимфоцита. Измењени антигени могу да имају промењени афинитет везивања за МНС или TCR, или могу да делују као антагонисти Т-ћелијског рецептора, смањујући имунски одговор (353-355).

До данас је идентификовано неколико вирусних протеина који могу да модулишу имунски одговор. Ови протеини утичу на трансдукцију сигнала у ћелијама имунског система, ћелијску пролиферацију, ефекторске функције и производњу цитокина, чиме доводе до слабљења имунског одговора (356-358).

Многе студије су показале утицај хепатитис Ц вируса на неспецифични имунски одговор. HCV утиче на кључни фактор неспецифичног имунског одговора на вирусну инфекцију, интерфероне типа I, на неколико нивоа, и тиме превазилази њихово антивирусно дејство (359-362).

Вирусни протеин E2 се везује за CD81 на површини NK ћелија и тако инхибира њихову цитотоксичност и продукцију IFN $\gamma$  (101).

Такође, NK ћелије имају смањену способност да активирају дендритске ћелије као последицу прекомерне експресије рецептора CD94-NK2A и продукције IL-10 и TGF $\beta$  (363).

Вирусни протеини утичу и на диференцијацију и сазревање дендритских ћелија, смањујући њихову антиген-презентујућу функцију и продукцију IL-12, што је један од механизма којим HCV утиче на Т-ћелијски одговор (364).

Бројне студије су показале да се код пацијената са хроничном HCV инфекцијом развија слаб, олиго- или моно-специфичан или неспецифичан CD4+ и CD8+ Т ћелијски одговор и у акутној и у хроничној фази инфекције (125, 365).

Перзистенција вируса доводи до смањења броја и ефекторске функције CD4+ и CD8+ Т лимфоцита на више нивоа. Смањена антиген-презентујућа функција дендритских ћелија и макрофага и смањена продукција IL-12 и TNF $\alpha$  корелира са slabим специфичним Т ћелијским одговором (366).

Континуирано присуство великог броја антигена може да доведе до апоптотске смрти Т ћелија путем активацијом-индуковане ћелијске смрти (367). Код перзистентне HCV инфекције вирус-специфични CD4+ одговор је слаб и дисфункционалан, што за последицу има дефектан CD8+ Т лимфоцитни одговор (368). Слабљењу ефекторске функције Т лимфоцита доприносе и различите субпопулације регулаторних ћелија (369).

Перзистентно присуство вируса утиче не само на ефекторске функције ћелија имунског одговора, већ и на продукцију цитокина, мењајући цитокински профил. Цитокини су неопходни за нормално одвијање свих фаза имунског одговора и значајан су фактор регулације типа, јачине и дужине имунске реакције. Цитокине продукују различите ћелије као што су лимфоцити, моноцити, макрофази, фибробласти. Цитокине стварају и на цитокине реагују и друге ћелије организма, ван имунског система. Током хроничне HCV инфекције цитокински профил пацијената варира у зависности од

различитих фактора као што су генетске и етничке карактеристике пацијента, као и од фазе болести. Вероватно је то разлог што су подаци о серумским нивоима цитокина контрадикторни и крећу се од доминације Th1 или Th2 цитокина до повећане експресије оба типа цитокина (108, 189, 370).

Зато је један од циљева нашег рада био да утврдимо цитокински профил пацијената и корелирамо га са хистопатолошким променама јетре. Анализирали смо нивое Th1 (IL-12p70, IFN $\gamma$  и IL-2), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13) и Th17 (IL-17A, IL-22 и IL-6) цитокина, као и проинфламаторних цитокина IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL-9.

Резултати нашег истраживања показали су да су нивои проинфламаторних цитокина, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , и Th2 цитокина, IL-13 и IL-5, били значајно нижи код пацијената у односу на контроле. Иако су и нивои осталих цитокина били нижи код пацијената, ова разлика није била статистички значајна. Значајно је да су серумски нивои свих испитиваних цитокина били испод границе детекције код одређеног броја пацијената и здравих испитаника. Тако је у групи пацијената статистички значајно мањи број субјеката продуковао мерљиве количине IL-12p70, IL-2, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-13 и IL-5. Серумски ниво IL-9 је био изнад границе детекције код само једног пацијента, па овај цитокин није даље дискутован. Ови резултати указују на слаб имунски одговор и у сагласности су са досадашњим сазнањима о дисрегулацији имунског одговора као последице перзистенције HCV вируса. Међутим, треба узети у обзир да је испитивана група пацијената била хетерогена у погледу дужине трајања инфекције и величине хистопатолошких промена у јетри. Стално оштећење јетре и хронична инфламација покрећу механизам зарастања рана. Деструкција хепатоцита и проинфламаторни и профибротички цитокини (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6) активирају стелатне ћелије јетре, фибробласте и миофибробласте, што резултира у депозицији екстрацелуларног матрикса у паренхиму јетре у виду ожиљног ткива (371).

Прогресија болести и масивна фиброза воде ка цирози. Примећено је да код неких пацијената фиброза споро напредује, док се код других развија веома брзо. Развој фиброзе је повезан са многим факторима, између осталог са цитокинима. Зато смо наше резултате груписали према стадијуму фиброзе.

Анализа података груписаних према стадијуму фиброзе, показало је да су код хронично инфицираних пацијената без фиброзе (F0) средње вредности нивоа свих цитокина биле веће него код пацијената са фиброзом. Тенденција смањења нивоа цитокина ка вишим стадијумима фиброзе забележена је за све цитокине, са изузетком



IL-6 чија се вредност повећавала са стадијумом фиброзе. Пацијенти са фиброзом су, у поређењу са пацијентима без фиброзе, имали статистички значајно ниже нивое IFN $\gamma$ , IL-2, IL-17, IL-22 и IL-13. Такође, статистички значајно мањи број пацијената са фиброзом је продуковао мерљиве нивое IFN $\gamma$ , IL-2, IL-17 и IL-13.

Да би имали бољи увид у промене цитокинског профила током прогресије болести приказали смо наше резултате као разлику између средњих вредности нивоа цитокина у одређеним стадијумима фиброзе и у контролној групи. У поређењу са контролом, вредности свих цитокина су биле повећане код пацијената без фиброзе, са статистички значајном разликом у нивоима IFN $\gamma$ , IL-2 (Th1 цитокини), IL-17, IL-22 (Th17 цитокини) и IL-4 (Th2 цитокин). Ово повећање одсликава настојање имунског одговора да савлада инфекцију. Са повећањем стадијума фиброзе смањивале су се вредности свих цитокина, што је у сагласности са сазнањима о имуносупресији коју изазива перзистентно присуство вируса. Код пацијената са F1 стадијумом фиброзе вредности Th1 (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-12), Th17 (IL-17A, IL-22) и Th2 (IL-10, IL-4) цитокина биле су ниже него код пацијената без фиброзе, али још увек више него код контрола. У групи пацијената са F3 стадијумом фиброзе, пад нивоа свих цитокина се наставио. У односу на контролу, вредности свих цитокина биле су ниже, док је ниво IL-4, иако нижи него у F0 и F1, остао виши од вредности у контролној групи, што указује на преовлађивање Th2 одговора у вишим стадијумима фиброзе. IL-6 је био једини цитокин чија је вредност расла са стадијумом фиброзе. Бројна истраживања су показала да је ниво овог мултифункционалног цитокина повишен код оштећења јетре различите етиологије и сматра се индикатором дисфункције јетре (158, 372, 373).

Резултати нашег истраживања по први пут показују повезаност цитокинског профила код пацијената са хроничном HCV инфекцијом и стадијума оштећења јетре. У првим фазама болести, код пацијената без фиброзе, преовлађују проинфламаторни цитокини, односно Th1 и Th17 одговор. IL-4, који је такође значајно повишен код ове групе пацијената, првобитно назван фактор раста Б лимфоцита, подстиче хуморални тип имунског одговора. Овакав цитокински миље је последица настојања имунског одговора да елиминише вирус. Како болест напредује, развија се фиброза, а перзистентно присуство вируса модулише имунски одговор. Са прогресијом фиброзе смањују се нивои свих цитокина, и проинфламаторних и антиинфламаторних, што указује на имуносупресију и „гашење“ имунског одговора.

Резултати добијени методом проточне цитометрије су у сагласности са овим закључцима. Анализа резултата мерења показала је да су у групи пацијената вредности свих испитиваних ћелијских популација биле веће у односу на контролу. Статистички значајно већа процентуална заступљеност утврђена је за Т лимфоците, као и субпопулације помагачких (CD3+CD4+) и цитотоксичних (CD3+CD8+) Т лимфоцита, и за Б лимфоците. Даље, процентуална заступљеност регулаторних Т лимфоцита у периферној крви, као и процентуална заступљеност ових ћелија у популацији CD3+CD4+ лимфоцита, била је статистички значајно виша код пацијената. И мијелоидне и плазматоидне дендритске ћелије биле су заступљене у већем проценту код пацијената, код којих је статистички значајно већи проценат активираних ћелија припадао популацији рDC. Ови резултати, заједно са резултатима добијеним мерењем цитокина указују на постојан, али функционално ослабљен имунски одговор код пацијената са хроничном HCV инфекцијом.

Пошто смо утврдили да се цитокински профил мења са прогресијом болести и развојем фиброзе, податке добијене методом проточне цитометрије груписали смо према стадијуму фиброзе у две групе. Анализа података је показала да са повећањем стадијума оштећења јетре постоји тенденција смањења процентуалне заступљености укупне популације Т лимфоцита ( $p < 0,05$ ), као и субпопулација помагачких и цитотоксичних Т лимфоцита, NK ћелија и обе популације дендритских ћелија, mDC и рDC. Штавише, код виших стадијума фиброзе проценат активираних мијелоидних ћелија је био нижи, а плазматоидних виши. Процентуална заступљеност регулаторних Т лимфоцита, који супримирају вирус специфични CD4+ и CD8+ Т ћелијски одговор, била је нижа у F2-F3 групи пацијената, али та разлика није била статистички значајна. У обе групе су ове вредности биле статистички значајно више него у контролној групи. Ови подаци су у сагласности са нашим налазима о смањењу продукције цитокина и закључком да са прогресијом болести долази до „стишавања“ имунског одговора.

Терапија пегилованим интерфероном  $\alpha$  и рибавирином има осим антивирусног и имуномодулаторно дејство, активирајући имунски одговор и поларизујући Т ћелијски одговор у Th1 правцу (374).

Показано је да рибавирин смањује ниво IFN- $\gamma$  (395) и инхибира продукцију проинфламаторних цитокина у макрофазама (376) дендритским ћелијама (377) и NK ћелијама (378).

Код пацијената укључених у нашу студију није било контраиндикација за примену антивирусног лечења, па је оно у целости спроведено. По завршетку терапије забележен је статистички значајан пад, како проинфламаторних (TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A), тако и антиинфламаторних цитокина (IL-10, IL-13). Такође, статистички значајно мањи број пацијената је продуковао мерљиве количине IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-13 и IL-5. Ниво IL-22, као и број субјеката који га продукују, није се променио после терапије. Анализа разлике између средњих вредности нивоа цитокина у одређеним стадијумима фиброзе и у контролној групи показала је да је код пацијената без фиброзе (F0) ниво IL-4 и после завршене терапије био статистички значајно виши него у контролној групи. У све три групе пацијената (F0, F1, F3) вредности IL-1 $\beta$ , IL-13 и IL-5 биле су статистички значајно ниже у поређењу са контролом.

Терапија хепатитиса Ц треба да активира имунски одговор и да обезбеди поларизацију Т ћелијског одговора у правцу Th1 одговора, али уз смањење инфламације и ограничен CD8+/IFN- $\gamma$  одговор који би могао да изазове даља оштећења јетре. Наши резултати су у складу са оваквом поставком, обзиром да смо показали да се код испитиване групе пацијената после спроведене терапије значајно смањује продукција Th2 цитокина (поларизација у правцу Th1 одговора), затим IFN- $\gamma$  и проинфламаторних цитокина (ограничавање инфламације и даљег оштећења јетре), док продукција Th1 цитокина, на првом месту IL-2 и IL-12 остаје непромењена.

## 6 ЗАКЉУЧЦИ

### Општи подаци

Општи подаци који описују профил репрезентативног испитаника са хроничном HCV инфекцијом, у нашој студији су следећи.

- Готово две трећине испитаника укључених у нашу студију било је **мушког пола**, најчешћи пут инфекције је била је **ИВУПАС**, највећу заступљеност показао је **генотип 1**, а највећи број испитаника је имао **лаку фиброзу**. **Повољан одговор** на терапију је забележен код три четвртине испитаника, док је неповољан одговор имало свега једна четвртина испитаника.

### Пут инфекције као предиктивни фактор

У односу на трансфузију и дијализу, профил испитаника ИВУПАС групе се битно разликује од профила испитаника код којих је пут преноса инфекције трансфузија или дијализа.

- Испитаници **ИВУПАС** групе су у 80% случајева мушкарци, млађе животне доби, са нижом базалном виремијом, доминантним присуством генотипа 3, нижим стадијумом фиброзе јетре и бољим терапијским одговором.
- Насупрот томе, испитаници који су заражени **трансфузијом или дијализом** показују равномерну полну дистрибуције, старије су животне доби, са вишом виремијом, доминантним присуством генотипа 1, вишим стадијумима фиброзе и лошијим одговором на терапију.

### Предиктивни фактори за настанак фиброзе у току хроничне HCV инфекције

Униваријантном логистичком регресијом, као значајни предиктивни фактори за настанак фиброзе издвојили су се **старост** испитаника и **генотип**.

- Резултати показују да развој виших стадијума фиброзе зависи од старости испитаника, тако да **свака година живота повећава шансу за настанак тешке фиброзе за 9,5%**.
- Униваријантна логистичка регресија је такође показала да **генотип 2 носи око 7 пута мањи ризик за настанак теже фиброзе од генотипа 1**.

У мултиваријантном моделу као најзначајнији предиктивни фактор издвојила се **старост** испитаника.

### **Предиктивни фактори терапијског одговора код пацијената са хроничном HCV инфекцијом**

Од параметара анализираних у униваријантном моделу, као значајни предиктивни фактори издвојили су се **старост** испитаника, **пут инфекције** и **стадијум фиброзе**.

- Резултати су показали да терапијски одговор зависи од година старости, тако да се **шанса за добар терапијски одговор смањује за 3.5 % са сваком годином живота**.
- Поред тога одговор на терапију зависи од пута инфекције. **Трансфузија, у односу на ИВУПАС, смањује шансу доброг одговора око 5 пута, док хемодијализа, у односу на ИВУПАС, смањује шансу доброг одговора око 4 пута.**
- Овим моделом је такође показано да одговор на терапију зависи и од стадијума фиброзе. **Виши стадијуми фиброзе (F3-F4) смањују шансу доброг одговора око 4 пута.**

Резултати мултиваријантног модела пак, показују да се као најзначајнији предиктивни фактор издваја **пут инфекције** и то на првом месту трансфузија.

### **Учесталост популација мононуклеарних леукоцита у јетри пацијената са различитим одговором на терапију**

Имунохистохемијски резултати експресије CD4, CD8, CD14, CD20, Foxp3, DC-SIGN и PD1 су показали значајне разлике у броју и локализацији различитих популација мононуклеарних леукоцита у ткиву јетре пацијената са различитим одговором на терапију.

- Пацијенти са **повољним одговором** на терапију имају значајно већи број **CD4+** и **Foxp3+** ћелија у односу на пацијенте са неповољним одговором.
- Са друге стране у групи пацијената са **неповољним одговором** на терапију забележен је већи број **CD8+** ћелија.

- **CD4/CD8** индекс пацијената са повољним одговором на терапију је веома сличан индексу ових ћелија у периферној крви здравих особа, док је са друге стране, овај индекс код пацијената са **неповољним одговором** на терапију готово **три пута нижи** у односу на пацијенте са повољним одговором на терапију.

### **Учесталост популација моноклеарних леукоцита код пацијената са различитим одговором на терапију**

Фенотипизација интрахепатичних моноклеарних леукоцита је показала постојање значајне разлике како у броју, тако и у локализацији ових ћелија у ткиву јетре пацијената са различитим стадијумом

- Пацијенти са **вишим стадијумима фиброзе (F3)** имају значајно већи број **CD4+**, **Foxp3+**, **CD8+** и **CD20+** ћелија у односу на пацијенте без фиброзе.
- Насупрот томе, број **DC-SIGN+** ћелија је значајно виши у групи пацијената **без фиброзе**.
- **CD4/CD8** индекс пацијената без или са ниским стадијумом фиброзе је сличан индексу ових ћелија у периферној крви здравих особа, док је у групи пацијената са **узнапредовалом фиброзом** индекс CD4/CD8 ћелија више од **два пута нижи**.
- Спирмановом анализом утврдили смо статистички високо значајну позитивну корелација између броја CD4+ Т лимфоцита и серумског нивоа AST, **тако да са порастом броја CD4+ Т лимфоцита расту и серумске концентрације AST**.
- Статистички значајна корелација забележена и између броја Foxp3+ ћелија и серумског нивоа AST и ALT, али је насупрот CD4+ Т лимфоцитима, ова корелација **негативног** предзнака, **тако да са повећањем броја Т регулаторних лимфоцита опада концентрација серумског AST и ALT**.

### **Серумске вредности цитокина код пацијената са различитим стадијумом фиброзе и повољним одговором на терапију**

Током хроничне HCV инфекције цитокински профил пацијената се мења у зависности од стадијума фиброзе.

- Код пацијената без фиброзе (**F0**) серумски нивои свих цитокина су **виши** у односу на контролне здраве субјекте, при чему доминирају **проинфламаторни** цитокини.

- Уочена је тенденција смањења нивоа свих цитокина ка вишим стадијумима фиброзе. Смањење нивоа свих цитокина, и проинфламаторних и антиинфламаторних, са напредовањем болести и прогресијом фиброзе указује да перзистентно присуство вируса модулише имунски одговор изазивајући имуносупресију и „гашење“ имунског одговора.
- Код пацијената са **F3** стадијумом фиброзе вредности свих цитокина, осим **IL-4**, ниже су од вредности у контролној групи, што указује на преовлађивање **Th2** одговора у вишим стадијумима фиброзе.
- По **завршетку терапије** нивои свих цитокина, и проинфламаторних и антиинфламаторних, су **нижи** у односу на вредности пре терапије.
- У поређењу са контролом продукција проинфламаторних и Th2 цитокина у све три групе пацијената (**F0, F1, F3**) је после терапије значајно **смањена**

#### **Учесталост популација моноклеарних леукоцита у периферној крви пацијената са различитим стадијумом фиброзе**

Резултати проточне цитометрије су показали да постоје значајне разлике у броју различитих популација моноклеарних леукоцита у периферној крви пацијената у односу на контролне здраве субјекте.

- У односу на контролу **пацијенти** имају значајно већи број **CD3+** ћелија, као и субпопулација **CD4+** и **CD8+** Т лимфоцита, али не постоји статистички значајна разлика у индексу CD4/CD8.
- Број **Foxp3+** ћелија, као и процентуална заступљеност у популацији CD4+ ћелија, су виши у односу на контролу и код пацијената са нижим стадијумима фиброзе (F0-F1) и код пацијената са вишим стадијумима фиброзе (F2-F3).
- Број **CD19+** ћелија је виши код обе групе пацијената у односу на контролу.
- У периферној крви пацијената број **активираних плазмоцитоидних дендритских ћелија** значајно је већи од броја активираних мијелоидних дендритских ћелија
- Уочено је да је, иако разлика није статистички значајна, број активираних мијелоидних DC већи у нижим стадијумима фиброзе, а број активираних плазмоцитоидних DC у вишим стадијумима фиброзе.

## 7 ЛІТЕРАТУРА

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ et al. Isolation of a c DNA clone derived from a blood born non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
2. Bradley D. Virology, molecular biology and serology of hepatitis C virus. *Transfus Med Rev* 1992; 5: 93–102.
3. Cuthbert JA. Hepatitis C: progress and problems. *Clin Microbiol. Rev* 1994; 7: 505–532.
4. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M et al. Hepatitis C Virus: Detection of intracellular virus particiles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23: 205-209.
5. Francki RI, Fauquet DL, Knudson DL and Brown F. Classification and nomenclature of viruses. *Archives of Virology* 1991; 2: 223-233.
6. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39: 5-19.
7. Takamizawa A, Mouri C, Fuke I et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991; 65: 1105-1113.
8. Lindenbach BD and Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; 436: 933-938.
9. Fields BN and Knippe DM. *Fields Virology* 3th Raven Press 1996; New York.
10. Nizar N. Zein Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2000; 223–235.
11. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequencediversity and variation. *Microb Comp Genomics* 2005; 5(3): 129–151.
12. Kolykhalov AA, Feinstone SM and Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996; 70: 3363-3371.



13. Tanaka TN, Kato MJ, Sugiyama CK and Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 1996; 70: 3307-3312.
14. Rapicetta M, Argentini C, Dettori S, Spada E, Pellizzer G and Gandin C. Molecular heterogeneity and new subtypes of HCV genotype 4. *Res Virol* 1998; 149: 293-297.
15. Tsai YH, Kuang WF, Lu TY et al. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus exhibits genotypic differences in interferon antagonism. *J Hepatol* 2008; 49(6): 899-907.
16. Boulant S, Montserret R, Hope G et al: Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 2006; 281: 2236-2247.
17. 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): 815-825.
18. Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006; 348(1): 1-12.
19. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: Potential role in chronic HCV infection. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 1992; 89: 3468-3472.
20. Lloyd AR, Jagger E, Post JJ et al. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 24-32.
21. Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move, innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antivir Res* 2006; 69: 129-141.
22. Simmonds P, Bukh J, Combet C et al. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-973.
23. Rosa D, Saletti G, De Gregorio E et al. Activation of naïve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C associated B lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2005; 102: 18544-18549.

24. Charles ED, Geen RM, Markuian S et al. Clonal expansion of IgM+CD27+B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia, *Blood* (2007).
25. Dubuisson J: Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 2007; 13(17): 2406-2415.
26. Grakoui A, Wychowski C, Lin C et al. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993; 67: 1385-1395.
27. Pavlovic D, Neville DC, Argaud O 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 USA* 2003; 100: 6104-6108.
28. Saint N, Montserret R, Chipot C, Penin F. Structural and functional analysis of the HCV p7 protein. *Methods Mol Biol* 2009; 510: 125-143.
29. Griffin S. Inhibition of HCV p7 as a therapeutic target. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2010; 11 (2): 175-181.
30. Sakai A, Claire MS, Faulk K et al: The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(20): 11646-11651.
31. Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)* 2009; 117(2): 49-65.
32. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *F Virol Philadelphia*: Lippincott-Raven, 2007; pp 1101-1152.
33. Vince A. Hepatitis B i C: Prirodni tijek bolesti. *Acta Med Croatica* 2005; 59: 389-392.
34. Flint M, Dubuisson J, Maidens C et al. Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 2000; 74: 702-709.
35. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R 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.

36. Catanese MT, Ansuini H, Graziani R 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.
37. Lozach PY, Amara A, Bartosch B 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.
38. Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F et al: Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003; 77: 4070–4080.
39. Owsianka AM, Timms JM, Tarr AW 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.
40. Barth H, Schäfer C, Adah MI et al: Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003; 278: 41003–41012.
41. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell* 2006; 124: 729–740.
42. 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.
43. Randall G, Panis M, Cooper JD et al: Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(31): 12884-12889.
44. Moradpour D, Brass V, Gosert R, Wolk B and Blum H. Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets. *Trends in molecular medicine* 2002; 8: 476-482.
45. Popescu CJ, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C Virus Assembly Imaging. *Viruses* 2011; 3: 2238-2254.
46. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81: 1631-1648.

47. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J et al. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavavirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991; 180: 842-848.
48. Gianini C, Theirs V, Nousbaum JB et al. Comparative analysis of two assays for genotyping hepatitis C virus based on genotype-specific primers of probes. *Journal of hepatology* 1995; 23: 246-253.
49. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324.
50. Simmonds P, Smith DB, McOmish F et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol*. 1994; 75: 1053–1061.
51. Dusheiko GM. Hepatitis C infection. From virology to management. In: Decker R and Trooten H. *Hepatitis C 1997, Essays and expert options*, Abbott Diagnostics Educational Services. 1997; 5-25.
52. Simmonds P, Mellor J, Sakuldamrong T et al. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *J Gen Virol* 1996; 77: 3013-3024.
53. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21: 570-583.
54. Mellor J, Walsh EA, Prescott LE et al. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 417–423.
55. Tokita H, Okamoto H, Iizuka H et al. Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. *J Gen Virol* 1996; 77: 293–301.
56. Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3(Suppl 2): 97-101.
57. Smith DB and Simmonds P. Review: Molecular epidemiology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997; 12: 522-527.

58. Ndong-Atome GR, Makuwa M. High Prevalence of Hepatitis C Virus Infection and Predominance of Genotype 4. *Gabon Journal Medic Virol* 2008; 80: 1581–1587.
59. Zein NN, Rakela J, Krawitt EL, Reddy KR, Tominaga T and Persing DH. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 1996; 125: 634-639.
60. Attaullah S, Khan S and Ali I. Hepatitis C virus genotypes in Pakistan: a systemic review. *J Virol* 2011; 8: 433.
61. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-2399.
62. Okamoto H, Sakamoto TH, et al. Characterization of the genetic sequence of type-V (or a3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *Journal of General Virol* 1993; 74: 2385-2390.
63. Silini EF, Bono A, Cividini S et al. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with or without liver function abnormalities. *Hepatology* 1995; 21: 285–290.
64. Brechot C, Kremsdorf D. Genetic variation of the hepatitis C virus (HCV) genome: random events or a clinical relevant issues. *J Hepatol* 1993; 17: 265-268.
65. Chu CW, Hwang SJ, Luo JC et al. Clinical, virologic and pathologic significance of elevated serum alfa-fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinic Gastroenterol* 2001; 32: 240-244.
66. Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 521-526.
67. Shepard CW, Finelli L, Alter Mj. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5(9): 558-567.
68. Deuffic-Burban S, Poynard T, Sulkowski MS and Wong JB. Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiencyvirus infections in the United States. *J Viral Hepatol* 2007; 14: 107-115.

69. Hepatitis C: global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72: 341-344.
70. Mühlberger N, Schwarzer R, Lettmeier B, Sroczynski G, Zeuzem S and Siebert U. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC Public Health* 2009; 9: 34.
71. Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999; 285: 26–30.
72. Alter MJ, Seeff LB, Bacon BR, Thomas DL, Rigsby MO and Di Bisceglie AM. Testing for hepatitis C virus infection should be routine for persons at increased risk for infection. *Ann Intern Med* 2004; 141: 715-717.
73. Deuffic-Burban S, Deltenre P, Buti M, Stroffolini T. HCV burden in Europe: impact of national treatment practices on future HCV-related morbidity and mortality through a modeling approach. *Hepatology* 2010; 52: 678.
74. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3(2): 47-52.
75. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 47: 607-608.
76. Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30: 595–601.
77. Hoofnagle LB. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: *Hepatology* 2002; 36: 1-2.
78. McHutchison JG. Understanding hepatitis C. *Am J Manag Care* 2004; 10: 21-29.
79. Goh J, Coughlan B, Quinn J, O'Keane JC, Crowe J. Fatigue does not correlate with the degree of hepatitis or the presence of autoimmune disorders in chronic hepatitis C infection. *Eur J Gastroenterol* 1999; 11: 833- 838.
80. Castillo I, Pardo M, Bartolome J et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liverfunction tests is unknown. *J Infect Dis* 2004; 189: 7-14.

81. Carreno V. Occult hepatitis C virus infection: a new form of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6922-6925.
82. Bialek SR, Terrault NA. The changing epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 10697-10715.
83. R-Viso AT, Duarte MIS, Pagliari C et al. Tissue and serum immune response in chronic hepatitis C with mild histological lesions *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, February 2010; Vol. 105(1): 25-32.
84. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA and Hutin YJ. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 5298-5338.
85. Gonzalez-Peralta RP, Lau JYN. Pathogenetic mechanism for hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *Semin Gastroenterol* 1995; 6: 28-34.
86. Gupta S, Bent S, Kohlwes J. Test Characteristics of-Fetoprotein for Detecting Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis C. *Ann Intern Med* 2003; 139(1): 46-50.
87. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C, NIH Consensus statements 2002; 19: 1-46.
88. Shiffman M. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C virus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. *Liver Transplantation*, 2003; 9: 14-20.
89. James Koziel M. Cellular Immune Responses against Hepatitis C Virus *Oxford Journals Medicine Clinical Infectious Diseases* 2005; 41 (1).
90. Gonzalez SA, Keeffe EB. Chronic viral hepatitis: epidemiology, molecular biology, and antiviral therapy. *Front Biosci* 2011; 16: 225-250.
91. Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clinical immunology* 2008; 128: 133-147.

92. Mondelli MU, Barnaba V. Viral and host immune regulatory mechanisms in hepatitis C virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 18(4): 327-331.
93. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: Pathogenesis, prognosis and therapeutics, *Cytokine* 2007; 39: 50-62.
94. Irshad M, Khushboo I, Singh S, Singh S. Hepatitis C Virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol* 2008; 27(6): 497-517.
95. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology.* 2003; 38: 1437-1448.
96. Thimme R, Oldach D, Chang KM et al. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1395-1340.
97. Dong Z, Wei H, Sun R, Tian Z. The roles of innate cells in liver injury and regeneration. *Cell Mol Immunol.* 2007; 4: 241-252.
98. Lanier LL. NK cell recognition. *Annual Review of Immunology* 2004; 23: 225-274.
99. Morishima C, Paschal DM, Wang CC et al. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 2006; 3: 573-580.
100. Corado J, Toro F, Rivera H I et al. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 451-457.
101. Crotta S, Stilla A, Wack A et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J. Exp. Med.* 2002; 195:35-41.
102. Liu YJ, Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity *Cell* 2001; 106: 259-262.
103. Liu YJ, Kadowaki, Risoan MC. T cell activation and polarization by DC1 and DC2, *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251: 149-159.
104. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wonjg DC et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis c virus, *Science* 1992; 258: 135-140.



105. Abas KA, Andrew H.Lichtman, Shiv P, Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup> ed. 2007; 137-148.
106. Nake S, Iwakura Y, Suto H et al, Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL/17. *Leukoc Biol* 2007;
107. Iezzi G, Boni A, Degl E, et al, Type 2 cytotoxic T lymphocytes modulate the activity of dendritic cells toward type 2 immune responses. *J Immunol* 2006; 177: 2131-2137.
108. Fan XG, CA WE, Liu CZ et al. Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. *Mediators of Inflammation*, 1998; 7: 295–297.
109. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol* 2009; 47(1): 3-7.
110. Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123(5): 1004-1111.
111. Vojdani A, Lambert J. The Role of Th17 in Neuroimmune Disorders: Target for CAM Therapy. Part I. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009; [Epub ahead of print] Jul 21.
112. Kenji N, Tomohiro Y, Hiroko T et al, Interleukin 18 regulates both Th1 and Th2 responses, Institute for Advanced Medical Sciences, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Hyogo 663-850.
113. Napoli J, Bishop GA, Mc Guinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection corre- 414 M.A. Rico et al. / *Journal of Hepatology* 36 (2002) 408–416 lates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24: 759–765.
114. Quiroga JA, Martí'n J, Navas S, Carren~o V. Induction of interleukin- 12 production in chronic hepatitis C virus infection correlates with the hepatocellular damage. *J Infect Dis* 1998; 178: 247–251.
115. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 532-562.
116. Fishman MA, Perelson AS. Th1/Th2 cross regulation. *J. Theor Biol* 1994; 170: 25-56.

117. Abayli B, Canatarogl A, Akkiz H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection Turk J Gastroenterol 2003; 14 (1): 7-11.
118. Norbert H. Gruner Tilman, J. Gerlach et al, Association of Hepatitis C Virus–Specific CD8+ T Cells with Viral Clearance in Acute Hepatitis C, The Journal of Infectious Diseases 2000; 181: 1528–1536.
119. He X-S, Rehermann B, Lopez-Labrador FX et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus–specific CD81 T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 5692–5697.
120. Cox AL, Mosbrugger T, Lauer GM, Pardoll D, Thomas DL and Ray SC. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. Hepatology 2005; 42: 104-112.
121. Lancaster T, Sanders E, Christie JM, Brooks C, Green S, Rosenberg WM. Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat 2002; 9: 18-28.
122. Day CL, Lauer GM, Robbins GK et al. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. J Virol 2002; 76: 12584-12595.
123. Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, Valiga ME et al. Discordant role of CD4 T-cell responses in acute hepatitis C. Gastroenterology 2007; 132: 654-666.
124. Shin EC, Protzer U, Untergasser A et al. Liver directed gamma interferon gene delivery in chronic hepatitis C. J Virol 2005; 79: 13412-13420.
125. Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ et al. Differential CD4+ and CD8+ T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. Hepatology 2001; 33: 267–276.
126. HC, Vazov S, Kersting N et al. Intrahepatic CD8+T cell failure during chronic hepatitis C virus infection. Hepatology 2005; 42: 828-837.
127. Appay V, Dunbar PR, Callan M et al. Memory CD8+ Tcells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections Nat Med 2002; 8: 379-385.

128. Leuer GM, Ouchi K, Chung RT et al. Comprehensive analysis of CD8+ T cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 2002; 76: 6104-6113.
129. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML et al. Liver infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high viral levels of PD-1 and low levels of CD137 expression. *J Virol* 2007; 81: 2545-2553.
130. Penna A, Pilli M, Zerbini A et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2007; 45: 588-601.
131. Neumann AU, Lam NP, Gretch DR et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon alpha therapy. *Science* 1998; 28: 2103-2107.
132. Tester I, Smyk-Pearson S, Wang XH et al. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from shared source. *J Exp Med* 2005; 201: 1725-1731.
133. Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis* 2007; 66 Suppl 3: (3) 87-90.
134. Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 804-813.
135. Robertson SJ and Hasenkrug KJ. The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Semin Immunopathol.* 2006; 28: 51-62.
136. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL and Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunological Rev.* 2006; 212: 60-73.
137. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 7860-7867.
138. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell

- response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 188–196.
139. Cabrera R, Tu Z, Xu Y et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 1062–1071.
  140. Manigold T, Shin EC, Mizukoshi E et al. Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood* 2006; 107: 4424–4432.
  141. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 7852–7859.
  142. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. *Ex vivo* isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1303–1310.
  143. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity *in vitro*. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1247–1254.
  144. Von boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 2005; 6: 338-344.
  145. Wei HX, Chuang Y, Li B et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in TGF- $\beta$ -dependent J. *Immunol.* 2008; 181: 7221-7229.
  146. Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A et al. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol.* 2003; 77(20): 10862-10871.
  147. Wakita T, Katsume A, Kato J et al. Possible role of cytotoxic T cells in acute liver injury in hepatitis C virus cDNA transgenic mice. *J Med Virol* 2000; 62: 308-317.
  148. Abrignani S. Antigen-independent activation of resting T-cells in the liver of patients with chronic hepatitis. *Dev Biol Stand* 1998; 92: 191-194.

149. Yoshizawa K, Abe H, Kubo Y et al. Expansion of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2010; 40: 179-187.
150. Lan RY, Cheng C, Lian ZX et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: 729–737.
151. O’Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 10: 801–805.
152. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253–257.
153. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawauchi M, Honjo T. "Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1)". *Genomics* 1995; 23(3): 704–706.
154. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y et al. "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation". *J. Exp. Med.* 2000; 192 (7): 1027–1034.
155. Latchman Y, Wood CR, Chernova T et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation". *Nat. Immunol.* 2001; 2 (3): 261–268.
156. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H et al. "Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC". *J. Immunol.* 2002; 169 (10): 5538–5545.
157. Debora Franceschini, Marino Paroli, Vittorio Francavilla et al.. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest.* 2009; 2; 119(3): 551–564.
158. Falasca K, Paola Mancinoi, Claudio Ucciferri et al. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36: 144-150.
159. Vecchiet J, Falasca K, Claudio Ucciferri et al. Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Clin Lab Sci* 2005; 35: 415-422.

160. Hassoba H, Leheta O, Sayed A et al. IL-10 and IL-12p40 in Egyptian patients with HCV-related chronic liver disease. *Egypt J Immunol* 2003; 10: 1-8.
161. Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S et al. Expression of inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997; 158: 5536-5544.
162. O, Pappo O, Safadi R et al. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1164-1174.
163. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 18: 217-242.
164. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621.
165. Salazar-Mather TP and Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 313: 29-46.
166. Kaliński P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML (1997). "IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells". *J. Immunol.* 159 (1): 28–35.
167. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993; 260(5107): 547-549.
168. Kathy S. Wang, David A. Frank, and Jerome Ritz. Blood, "Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. Vol 95 No. 10 pp. 3183-3190.
169. Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, Cale EM, Hahn CS, Hahn YS. 1.9.2. (IFN- $\gamma$ ) Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem.* 2004 Oct 15; 279(42): 43479-43486.

170. Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; 298 (5877): 859–863.
171. Voet D, Voet GJ. *Biochemistry* (3 ed.). Wiley 2005; 1343-1344.
172. Naylor SL, Sakaguchi AY, Shows TB, Law ML, Goeddel DV, Gray PW. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* March 1983; 157 (3): 1020–1027.
173. Billiau A. Interferon-gama: biology and role in the pathogenesis. *Adv Immunol.* 1996; 32: 61-130.
174. Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S et al „Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma“. *Science (journal)* 1991; 252 (5006): 698–702.
175. Thiel DJ, le Du MH, Walter RL et al. „Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex“. 2001; (9): 927–936.
176. Tang H, Mignon-Godefroy K, Meroni PL, Garotta G, Charreire J, Nicoletti F. The effects of a monoclnal antibody to interferon-y on Experimental Autoimmune Thyroiditis (EAT): prevention of disease and decrease of EAT –specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 275-279.
177. Schoenborn JR, Wilson CB „Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses“. *Adv. Immunol.* 2007; 96: 41–101.
178. Sadir R, Forest E, Lortat-Jacob H. „The heparan sulfate binding sequence of interferon-gamma increased the on rate of the interferon-gamma-interferon-gamma receptor complex formation“. *J. Biol. Chem.* May 1998; 273 (18): 10919–10925.
179. Korn T, Oukk M, Kuchro VK, Bettelli E. Th17 cells: effector cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007; 19: 362–371.
180. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene“. *J. Immunol.* 1993; 150 (12): 5445–5456.

181. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 2008; 10:R95.
182. Kolls JK, Lindén A Interleukin-17 family members and inflammation“. *Immunity* 2004; 21 (4): 467–476.
183. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* 1995; 3: 811-821.
184. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P et al. T cell interleukin -17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996; 183: 2593-2603.
185. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 71 (1): 1–8.
186. Lafdil F, Wang H, Park O et al. STAT 3 inhibits T cell-mediated hepatitis by regulating T helper 1 cytokine and interleukin-17 production, *Gastroenterology.* 2009; 137: 2125-2135.
187. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al. The orphan nuclear receptor ROR- $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-1133.
188. Mire-Sluis A, Thorpe R. *Cytokines (Handbook of Immunopharmacology)*. Boston: Academic Press. 1998. ISBN 0-12-498340-5.
189. Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology.* 1996; 24(1): 6-9.
190. Kasprzak A, Seidel J, Adamek A et al. Interleukin-2 (IL-2) expression in livers of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44(2): 103-110.
191. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G „Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence“. *Immunogenetics* 1997; 46 (2): 120–128.



192. Louis H, Le Moine O, Peny MO et al. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 1997; 25: 1382-1389.
193. Kato M, Ikeda M, Lohse A, et al. Involvement of IL-10, an antiinflammatory cytokine in murine liver injury induced by Concanavalin A. *Hepatology Res.* 2001; 20: 232-243.
194. Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 2003; 38(4): 859-868.
195. Renauld JC, Houssiau F, Louahed J, et al. (1993). „Interleukin-9.“. *Adv. Immunol.* 54: 79–97.
196. Knoops L, Renauld JC (2005). „IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis“. *Growth Factors* 22 (4): 207–215.
197. Modi WS, Pollock DD, Mock BA, et al. (1991). „Regional localization of the human glutaminase (GLS) and interleukin-9 (IL9) genes by in situ hybridization“. *Cytogenet. Cell Genet.* 57 (2-3): 114–116.
198. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J. Biol. Chem.* 275 (40): 31335–31339.
199. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6 type cytokine signalling through the gp130 (Jak/STAT pathway). *Biochem. J.* 1998; 334: 297–314.
200. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 425-456.
201. Falon PG, Jollin HE, Smith P et al. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9 and IL-13. *Immunity* 2002; 17: 7-17.
202. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002; 14: 477-492

203. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003; 10: 45-65.
204. Grivennikov SI, Tumanov AV, Liepinsh DJ et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity.* 2005; 22: 93-104.
205. Zhu H, Liu Ch. Interleukin-1 Inhibits Hepatitis C Virus Subgenomic RNA Replication by Activation of Extracellular Regulated Kinase Pathway. *J. Virol.* May 2003; vol. 77 no. 9: 5493-5498.
206. Alter MJ, Seeff LB, Bacon BR, Thomas DL, Rigsby MO, Di Bisceglie AM. Testing for hepatitis C virus infection should be routine for persons at increased risk for infection. *Ann Intern Med* 2004; 141: 715-717.
207. Lee SD, Hwang SJ, Lu RH, et al. Antibodies to hepatitis C virus in prospectively followed patients with post-transfusion hepatitis. *The Journal of Infectious Diseases* 1991; 163: 1354-1357.
208. Ana Maria Rivas Estela, Paula Cordero Perez, Karina del Karmen Trujillo, Genotyping of HCV in infected patients from Northeast Mexico, *Annals of Hepatology* 2008; 7(2): April-June: 144-147.
209. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3: 41-46.
210. Dusheiko GM. Hepatitis C infection: From virology to management. In Decker R and Troonen H, editors *Hepatitis C 1997, Essays and expert opinions*, Abbott Diagnostics Educational Services, page 5-25.
211. Gerard C and Delwaide J. Answers to frequently asked questions on hepatitis C Decker R and Troonen H editors. In *hepatitis C1997, Essays and expert opinions*, Abbott Diagnostics Educational Services, page 131-141.
212. Deuffic-Burban S, Deltenre P, Buti M, Stroffolini T, J. P. HCV burden in Europe: impact of national treatment practices on future HCV-related morbidity and mortality through a modeling approach. *Hepatology* 2010; 52: 678.

213. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 2006; 144: 705-714.
214. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 93-98.
215. Wasley A, Miller JT, Finelli L. Surveillance for acute viral hepatitis — United States, 2005. *MMWR Surveill Summ* 2007; 56: 1-24.
216. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996; 334: 1685-1690.
217. Goedert JJ, Chen BE, Preiss L, Aledort LM, Rosenberg PS. Reconstruction of the hepatitis C virus epidemic in the US hemophilia population, 1940-1990. *Am J Epidemiol* 2007;165:1443-1453.
218. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV related chronic disease. *MMWR Recomm Rep* 1998; 47: 1-39.
219. Jonas MM. Children with hepatitis C. *HEPATOLOGY* 2002; 36(Suppl): 173-178.
220. Lin HH, Kao JH, Hsu HY et al. Possible role of high titer maternal viremia in perinatal transmission of hepatitis C virus. *The Journal of Infectious Diseases* 1994; 169: 638-641.
221. Russi JC, Serra M, Vinales J, et al. Sexual transmission of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1 infections among male transvestite commercial sex workers in Montevideo, Uruguay. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68(6): 716-720.
222. Hammer GP, Kellogg TA, McFarland WC, et al. Low incidence and prevalence of hepatitis C virus infection among sexually active nonintravenous drug-using adults, San Francisco, 1997-2000. *Sex Transm Dis* 2003; 30(12): 919-924.
223. Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR Recomm Rep* 2006; 55: 1-94.

224. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 1691-1696.
225. Decker R, Troonen H. Diagnosing hepatitis C: an overview. In *Hepatitis C 1997, Essays and expert opinions*, Abbott Diagnostics Educational Services, page 69-76.
226. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007; 598–607.
227. Bacon BR, Mc Hutchison JG. Into the light: Strategies for battling hepatitis C. *Am J Manag Care*, 2007; 13: 319-326.
228. Buckton AJ, Ngui SL, Arnold C et al. Multitypic Hepatitis C virus infection identified by real-time nucleotide sequencing of minority genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006; 44 (8): 2779-2783.
229. Bedossa P. Liver biopsy. *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 4–7.
230. Kleiner DE. The liver biopsy in chronic hepatitis C: a view from the other side of the microscope. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 52-64.
231. Mihaljevic I. Serologic diagnosis of viral hepatitis A-E. *Biochemia Med* 2000; 10: 161-173.
232. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci* 2006; 3: 35-40.
233. Carey W. Tests and screening strategies for the diagnosis of hepatitis C. *Clev Clin J Med* 2003; 70: 7-13.
234. Burek V. Laboratorijska dijagnostika virusnih hepatitisisa B i C. *Acta Med Croatica* 2005; 59(5): 405-412.
235. Pawlotsky JM. Diagnostic testing in hepatitis C virus infection: viral kinetics and genomics. *Semin Liver Dis* 2003; 23 Suppl 1: 3-11.
236. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 2001; 8: 87-95.

237. Thio CL, Nolt KR, Astemborski J, Vlahov D, Nelson KE, Thomas DL. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 575-577.
238. Kalantar-Zadeh K, Miller LG, Daar ES. Diagnostic discordance for hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 290-300.
239. Chamot E, Hirschel B, Wintch J, Robert CF, Gabriel V, Deglon JJ et al. Loss of antibodies against hepatitis C virus in HIV-seropositive intravenous drug users. *Aids* 1990; 4: 1275-1277.
240. Scott DJ, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection. A systematic review. *JAMA* 2007; 297: 724-732.
241. Vince A. Virusni hepatitis kao spolno prenosiva bolest. *Medicus* 2003; 12(2): 231-236.
242. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1554-1568.
243. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang* 1999; 76: 149-158.
244. Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000; 32: 654-659.
245. Nainan OV, Alter MJ, Kruszon-Moran D, Gao FX, Xia G, McQuillan G et al. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology* 2006; 131: 478-484.
246. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The Metavir Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24: 289-293.
247. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699.

248. Reiss G, Keeffe EB. Role of liver biopsy in the management of chronic liver disease: selective rather than routine. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5: 195-205.
249. Crockett SD, Kaltenbach T, Keeffe EB. Do we still need a liver biopsy? Are the serum fibrosis tests ready for prime time? *Clin Liver Dis* 2006; 10: 513-534.
250. Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl): 152-160.
251. Cadranet JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL). *Hepatology* 2000; 32: 477-481.
252. Regev A, Berho M, Jeffers LJ et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2614-2618.
253. Rockey DC, Bissell DM. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology* 2006; 43(Suppl): 113-120.
254. Thomas DL, Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 383-398.
255. Strader DB, Seeff LB. The natural history of chronic hepatitis C infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 324-328.
256. Levine RA, Sanderson SO, Ploutz-Snyder R et al. Assessment of fibrosis progression in untreated Irish women with chronic hepatitis C contracted from immunoglobulin anti-D. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1271-1277.
257. Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 1228-1233.
258. 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: 91-96.

259. Vogt M, Lang T, Frosner G et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999; 341: 866-870.
260. Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 1999; 30: 1054-1058.
261. Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology* 2005; 42: 5-13.
262. Fattovich G, Giustina G, Degos F et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112: 463-472.
263. Sobia Kanwal, Tariq Mahmood. Hepatitis C Viral Heterogeneity Based on Core Gene and an Attempt to Design Small Interfering RNA Against Strains Resistant to Interferon in Rawalpindi, Pakistan, *Hepat Mon.* 2012; 12(6): 398-407.
264. Davis G, Lau JY. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26(3) (suppl 1): 122-127.
265. EASL. International consensus conference on hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement. *J Hepatol* 1999; 3 (suppl 1): 3-8.
266. Dhumeaux D, Marscellin P, Lerebours E. Treatment of hepatitis C. The French consensus. *Gut* 2003; 52(12):1784-1787.
267. Shvirthli N. US National Institute of Health: Consensus conference statement on hepatitis C. *Arch Gastroenterohepatol* 2002; (3-4): 63-65.
268. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seef LB. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. AASLD Practice Guidelines. *Hepatology* 2004; 39(4):1147-1171.
269. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC 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.

270. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-982.
271. Hadziyannis SJ, Sette HJ, Morgan TR et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-355.
272. Weigand K, Stremmel W, Encke J. Treatment of hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2007; 12: 1897-1905.
273. Zeuzem S, Welsch C, Herrmann E. Pharmacokinetics of peginterferons. *Semin Liver Dis* 2003; 23(Suppl 1): 23-28.
274. Jacobson IM, Brown RS Jr, Freilich B et al. Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology* 2007; 46: 971-981.
275. Khuroo MS, Dahab ST. Meta-analysis: a randomized trial of peginterferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C genotype 4. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 931-938.
276. Nguyen MH, Trinh HN, Garcia R, Nguyen G, Lam KD, Keeffe EB. Higher rate of sustained virologic response in chronic hepatitis C genotype 6 treated with 48 weeks versus 24 weeks of peginterferon plus ribavirin. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1131-1135.
277. Zeuzem S, Andreone P, Pol S et al. Realize trial final results: telaprevir-based regimen for genotype 1 hepatitis C virus infection in patients with prior null response, partial response or relapse to peginterferon/ribavirin. Abstracts of the International Liver Congress™ 2011
278. Svirtlih N, Drezgić M. Prevalence of thyroid autoantibodies in chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12(suppl 12): 215.
279. Svirtlih N, Drezgić M, Božić M et al. Autoimunost uzrokovana terapijom alfa Interferonom u hroničnoj C virusnoj infekciji [Knjiga sažetaka]. Beograd: Stremljenja i novine u medicini; 1997. p.79.



280. Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P et al. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kD)/ribavirin therapy. *Hepatology* 2006; 43: 954–960.
281. Ferenci P, Laferl H, Scherzer TM et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 24 weeks in hepatitis C type 1 and 4 patients with rapid virological response. *Gastroenterology* 2008; 135: 451–458.
282. Zeuzem S, Buti M, Ferenci P 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: 97–103.
283. Moreno C, Deltenre P, Pawlotsky JM, Henrion J, Adler M, Mathurin P. Shortened treatment duration in treatment-naive genotype 1 HCV patients with rapid virological response: a meta-analysis. *J Hepatol* 2010; 52: 25–31.
284. Davis GL, Wong JB, McHutchison JG et al. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 645-652.
285. Pawlotsky JM. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication *Hepatology* 2006; 43: 397-408.
286. Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML et al. Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 2005; 43: 425-433.
287. Kobayashi S, Takeda T, Enomoto M et al. Development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who had a sustained virological response to interferon therapy: a multicenter, retrospective cohort study of 1124 patients. *Liver Int* 2007; 27: 186-191.
288. Yu JW, Wang GQ, Sun LJ, Li XG, Li SC. Predictive value of rapid virological response and early virological response on sustained virological response in HCV patients treated with pegylated interferon alpha-2a and ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 832-836.
289. Kamal SM, Jutta FK, Roesler B, Peters T, Jens W. Rasenac Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 123: 1070-1083.

290. Kamal SM, Jutta FK, Roesler B et al. Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T-cell response kinetics. *Hepatology* 2004; 39: 1721-1731.
291. Murata K, Yamamoto N, Kawakita T, Saito et al. Up-regulation of IL-18 by interferon alpha-2b/ribavirin combination therapy induces an anti-viral effect in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 547-551.
292. Rahman F, Heller T, Sobao Y et al. Effects of antiviral therapy on cellular immune response in acute hepatitis C. *Hepatology* 2004; 40: 87-97.
293. Boni C, Penna A, Graham S et al. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspective for immune therapy. *Hepatology* 2001; 33: 963-971.
294. Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C I. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol* 1999; 30: 376-382.
295. Menghol JA, Golden-Manson L, Castelblanco N et al. Impaired plasmacytoid dendritic cell maturation and differential chemotaxis in chronic hepatitis C, associations with antiviral treatment. *Gut* 2009; 58: 964-973.
296. Neumann-Haefelin C, Bluma HE, Chisari R et al. Review of T cell response in hepatitis C infection. *J Clin Virology* 2005; 75-85.
297. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med* 2006; 45(4): 183-191.
298. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3: 41-46.
299. Esteban J, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008; 48: 148-162.
300. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol*. 2011; 55: 192-206.

301. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2010; 138: 447–462.
302. Lauck M, Alvarado-Mora MV, Becker EA, et al. Analysis of hepatitis C virus intrahost diversity across the coding region by ultradeep pyrosequencing. *J Virol*. 2012; 86: 3952–3960.
303. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. 2006; 3: 41–46.
304. HCV Phenotype Working Group. HCV Drug Development Advisory Group Clinically relevant HCV drug resistance mutations Figure and tables. *Ann Forum Collab HIV Res*. 2012; 14: 1–10.
305. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995; 171: 1607–1610.
306. Roffi L, Ricci A, Ogliari C, Scalori A, Minola E, Colloredo G, et al. HCV genotypes in Northern Italy: a survey of 1368 histologically proven chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 1998; 29: 701–706.
307. Leon P, Lopez JA, Amela C, Elola C, Echevarria JM. Prevalence of types of hepatitis C virus in Spanish blood donors: results of a state-based multicenter study. Spanish group for the study of blood donors with risk of HCV transmission. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 448–453.
308. Rubio M, Rubio C, Nogues A, Manonelles A. Hepatitis C virus genotypes. Study of 302 patients coinfecting by the human immunodeficiency virus. *Med Clin (Barc)* 2001; 116: 650–651.
309. Sanchez-Quijano A, Abad MA, Torronteras R, Rey C, Pineda JA, Leal M, et al. Unexpected high prevalence of hepatitis C virus genotype 4 in Southern Spain. *J Hepatol* 1997; 27: 25–29.
310. Mc Omish F, Yap PL, Dow BC, Follett EA, Seed C, Keller AJ, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884–892.

311. Nicot F, Legrand-Abravanel F, Sandres-Saune K et al. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in south-western France. *J Gen Virol.* 2005; 86: 107–114.
312. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* 49 2008; 49: 634–651.
313. Innes HA, Hutchinson SJ, Allen S et al. Ranking predictors of a sustained viral response for patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon and ribavirin in Scotland *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24(6): 646-655.
314. Cescon M, Grazi GL, Cucchetti A et al. Predictors of sustained virological response after antiviral treatment for hepatitis C recurrence following liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15(7): 782-789.
315. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* 49 2008; 49: 634–651.
316. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, 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.
317. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales Jr FL, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975–982.
318. Poynard T, McHutchison J, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Is an “a la carte” combination interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C? The ALGOVIRC Project Group. *Hepatology* 2000; 31: 211–218.
319. 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.
320. Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003; 37: 600–609.

321. von Wagner M, Huber M, Berg T, Hinrichsen H, Rasenack J, Heintges T, et al. Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 129: 522–527.
322. Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, Sola R, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2007; 357: 124–134.
323. Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 2004; 40: 993–999.
324. Fiore G, Angarano L, Caceetta L, et al. In/situ immunophenotyping study of hepatic/infiltrating cytotoxic cells in chronic active hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9(5): 491-496.
325. Khakoo SI, Soni PN, Savage K, et al. Lymphocyte and macrophage phenotypes in chronic hepatitis C infection. Correlalation with disease activity. *Am J Pathol* 1997; 150(3): 963-970.
326. Tran A, Yang G, Doglio A, et al. Phenotyping of intrahepatic and peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1997; 42(12): 2495-2500.
327. Lechmann M, Ihlenfeldt HG, Braunschweiger I et al. T-and B-cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus-positive blood donors without viremia. *Hepatology* 1996; 24(4): 790-795.
328. Pham BN, Martinot-Peignoux M, Mosnier JF et al. CD4+/CD8+ ratio of liver-derived lymphocytes is related to viremia and not to hepatitis C virus genotypes in chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol* 1995; 102(2): 320-327.
329. Cusick MF, Schiller JJ, Gill JC, Eckels DD. Hepatitis C virus induces regulatory T cells by naturally occurring viral variants to suppress T cell responses. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011:806061; PMID:21197453; <http://dx.doi.org/10.1155/2011/806061>
330. Sakaki M, Hiroishi K, Baba T et al. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. *Hepatol Res* 2008; 38: 354–361.

331. Ryan EJ, O'Farrelly C. The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence. *J Viral Hepat* 2011; 18: 601-607.
332. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Jung MC, Gruener N, Wächtler M, Backmund M et al. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 643-651.
333. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1219-1226.
334. Takahashi K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P, Isogawa M, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 7431-7436.
335. Kunitani H, Shimizu Y, Murata H, Higuchi K, Watanabe A. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol* 2002; 36:734-741.
336. Cicinnati VR, Kang J, Sotiropoulos GC, Hilgard P, Frilling A, Broelsch CE, et al. Altered chemotactic response of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from patients with chronic hepatitis C: role of alpha interferon. *J Gen Virol* 2008; 89: 1243-1253.
337. Nattermann J, Zimmermann H, Iwan A, von Lilienfeld-ToalM, Leifeld L, NischalkeHD, et al. Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006; 44: 945-954.
338. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. Chemokines and dendritic cell traffic. *J Clin Immunol* 2000; 20: 151-160.
339. Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med* 1999; 189: 611-614.
340. Mengshol JA, Golden-Mason L, Castelblanco N, Im KA, Dillon SM, Wilson CC, et al. Virahep-C Study Group. Impaired plasmacytoid dendritic cell maturation and differential chemotaxis in chronic hepatitis C virus: associations with antiviral treatment outcomes. *Gut* 2009; 58: 964-973.

341. Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 2004; 103: 1026-1029.
342. Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Albert ML. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 2005; 192: 497-503.
343. Barnes E, Salio M, Cerundolo V, Francesco L, Pardoll D, Klenerman P, et al. Monocyte derived dendritic cells retain their functional capacity in patients following infection with hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2008; 15: 219-228.
344. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001; 97: 3171-3176.
345. Gelderblom HC, Nijhuis LE, de Jong EC, te Velde AA, Pajkrt D, Reesink HW, et al. Monocyte-derived dendritic cells from chronic HCV patients are not infected but show an immature phenotype and aberrant cytokine profile. *Liver Int* 2007; 27: 944-953.
346. Cooper S, Erickson A, Adams E et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 2: 439-449.
347. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2003;197:1645-55. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghrayeb J, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory cell help. *Science* 2003; 302: 659-662.
348. Farci P, Shimoda A, Wong D et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15394-15399.
349. Hwang SJ, Lee SD, Lu RH et al. Hepatitis C viral genotype influences the clinical outcome of patients with acute posttransfusion hepatitis C. *J Med Virol* 2001; 65(3): 505-509.
350. Farci P, Shimoda A, Coiana A et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288(5464): 339-344.

351. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-714.
352. Fierro N, Castro-Garcia F, and Panduro A. Rethinking cytokine function during hepatitis A and hepatitis C infections. *Adv Biosci Biotechnol* 2013; 4: 13-18.
353. YK Shimizu. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses, *J. Virol* 1994; 68: 1494–1500.
354. L. Frasca. Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells, *J. Immunol* 1999; 163: 650-658.
355. K.M. Chang. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus, *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2376–2385.
356. Accapezzato D, Francavilla V, Rawson P et al. Subversion of effector CD8+ T cell differentiation in acute hepatitis C virus infection: the role of the virus. *Eur J Immunol* 2004; 34: 438–446.
357. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000; 106: 1239–1249.
358. Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001; 167: 5264–5272.
359. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003; 300 (5622): 1145–1148.
360. Melen K, Fagerlund R, Nyqvist M, Keskinen P, Julkunen I. Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs. *J Med Virol* 2004; 73 (4): 536–547.



361. Podevin P, Sabile A, Gajardo R, Delhem N, Abadie A, Lozach PY, et al. Expression of hepatitis C virus NS5A natural mutants in a hepatocytic cell line inhibits the antiviral effect of interferon in a PKR-independent manner. *Hepatology* 2001; 33(6): 1503–1511.
362. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001; 75(13): 6095–6106.
363. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T et al. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004; 173(10): 6072–6081.
364. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001; 120: 512–521.
365. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191: 1499–1512.
366. Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, Asaad R, Heinzl FP, Lederman MM, et al. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol* 2004; 172: 4907–4916.
367. Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of Fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line: possible implications for HCV pathogenesis, *Virology* 2000; 276: 127–137.
368. Semmo N, Day CL, Ward SM, et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 2005; 41 (5): 1019–1028.
369. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004; 113: 963–972.
370. Huang YS, Hwang SJ, Chan CY et al. Serum levels of cytokines in hepatitis C-related liver disease: a longitudinal study. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1999; 62(6): 327–333.

371. Friedman SL Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250.
372. Abd EL-Ghaffar N, Rasheed W, Ramzy T and El Batae H. Prognostic Significance of Interleukins Determination in Liver Diseases. *Res J Med Sci* 2008; 3(2): 124-131.
373. Hsia CY, Huo TI, Chiang SY et al. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2006; 63: 275-280.
374. Hultgren C, Milich DR, Weiland O, Sa'llberg M. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998; 79: 2381–2391.
375. Bergamini A, Bolacchi F, Cepparulo M et al. Treatment with ribavirin and interferon-alpha reduces interferon-gamma expression in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 459–464.
376. Ning Q, Brown D, Parodo J et al. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998; 160: 3487–3493.
377. Barnes E, Salio M, Cerundolo V et al. Impact of alpha interferon and ribavirin on the function of maturing dendritic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3382–3389.
378. Chen QY, Yang JQ, Mi CM. Effect of ribavirin on NK activities of murine spleen cells in vitro. *Yao Xue Xue Bao* 1995; 30: 417–421.

## 8 ПРИЛОГ

### 8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Редни број:  
РБ

Идентификациони број:  
ИБР

Тип документације:  
ТД

Монографска публикација

Тип записа:  
ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:  
ВР

Докторска дисертација

Аутор:  
АУ

Вук Р. Вуковић

Ментор/коментор

Проф. др Дејан Баскић

Наслов рада:  
НР

Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора са степеном вирусне репликације током хроничне ХЦВ инфекције

Језик публикације:  
ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода:  
ЈИ

Српски/енглески

Земља публикавања:  
ЗП

Србија

Уже географско подручје:  
УГП

Србија

<b>Година:</b> <b>ГО</b>	2014.
<b>Издавач:</b> <b>ИЗ</b>	Ауторски репринт
<b>Место и адреса</b> <b>МС</b>	34000 Крагујевац, Србија Светозара Марковића 69
<b>Физички опис рада:</b> <b>ФО</b>	Дисертација има 161 страну, садржи 7 поглавља, 39 слика, 7 графикаона, 14 табела и 378 референци.
<b>Научна област:</b>	Медицина
<b>Научна дисциплина:</b> <b>ДИ</b>	Имунологија
<b>Предметна одредница/кључне речи:</b> <b>ПО</b>	HCV, Treg, HCV-RНК, хепатитис С.
<b>УДК</b>	
<b>Чува се:</b> <b>ЧУ</b>	У Библиотеци Факултета Медицинских наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија Светозара Марковића 69
<b>Важна напомена:</b> <b>МН</b>	
<b>12</b> <b>Извод:</b> <b>ИД</b>	

Акутна HCV инфекција у већини случајева (>80%) протиче као олигосимптоматска или асимптоматска болест. Након акутне фазе, спонтана резолуција HCV инфекције догађа се у само 20 % оболелих, док код највећег броја инфицираних вирус перзистира и болест прелази у хроничну фазу. Претпоставља се да око 180 милиона људи широм света, има хроничну HCV инфекцију. Патогенеза HCV инфекције је резултат мултиплих интеракција између имунског система домаћина и вирусних фактора. Снажан HCV специфичан CD4+ и CD8+ Т ћелијски одговор усмерен на мултипле HCV епитопе у неким случајевима омогућава спонтану елиминацију вируса у акутној фази. Међутим, HCV вирус поседује различите механизме којима, током ране фазе акутне инфекције, може да избегне одбрамбене снаге домаћина, што омогућава даљу прогресију болести у хроничну фазу. Супресија коју изазивају Трег индуковане HCV вирусом може да снизи имунски одговор Т ћелија у раним фазама инфекције и тако онемогући отклањање вируса, али се тиме може смањити и запаљенски инфилтрат у јетри и спречити масивно оштећење ткива. Циљ ове студије је да се утврди присуство и одреди апсолутни и релативни број CD4+, CD4+/Foxp3+ (Treg), CD8+ и CD20+ лимфоцита у јетри и периферној крви пацијената са хроничном HCV инфекцијом, испита цитокински профил имунског одговора у хроничној HCV инфекцији као и

постојање евентуалне повезаности ових параметара, вирусне репликације и нивоа оштећења јетриног паренхима. Резултати наше студије указују да су пацијенти са хроничном HCV инфекцијом чешће мушког пола, да је најчешћи пут инфекције ИВУПАС, а најчешћи генотип вируса генотип 1. Повољан одговор на терапију је забележен код три четвртине испитаника. Методе логистичке регресије су показале да су старост испитаника и генотип значајни предиктивни фактори за настанак фиброзе, док се као најзначајнији предиктивни фактори повољног одговора на терапију издвајају старост испитаника, пут инфекције и стадијум фиброзе. Испитивање цитокинског профила имунског одговора у хроничној HCV инфекцији је показало да су ови пацијенти хетерогена група, тако да код пацијената без фиброзе доминирају проинфламаторни цитокини, при чему је уочена тенденција смањења нивоа свих цитокина ка вишим стадијумима фиброзе. тако да су код пацијената са F3 стадијумом фиброзе вредности свих цитокина, осим IL-4, ниже су од вредности у контролној групи, што указује на преовлађивање Th2 одговора у вишим стадијумима фиброзе. По завршетку терапије нивои свих цитокина, и проинфламаторних и антиинфламаторних, су нижи у односу на вредности пре терапије. Резултати проточне цитометрије су показали да у односу на контролу пацијенти имају значајно већи број CD3+, као и субпопулација CD4+, CD8+ и Foxp3+ Т лимфоцита у периферној крви, али статистички значајна разлика у индексу CD4/CD8 није показана. У периферној крви пацијената број активираних плазмоцитонидних дендритских ћелија значајно је већи од броја активираних мијелоидних дендритских ћелија, а иако статистичку разлику нисмо утврдили, уочено је да је број активираних мијелоидних DC већи у нижим стадијумима фиброзе, а број активираних плазмоцитонидних DC у вишим стадијумима фиброзе. Фенотипизацијом моноклеарних леукоцита у јетри показано је да пацијенти са неповољним одговором на терапију имају значајно нижи број CD4+ и Foxp3+ ћелија, али виши број CD8+ ћелија у односу на пацијенте са повољним одговором. Као резултат тога, CD4/CD8 индекс пацијената са неповољним одговором је готово три пута нижи у односу на пацијенте са повољним одговором на терапију. Са друге стране, пацијенти са вишим стадијумима фиброзе имају значајно већи број CD4+, Foxp3+, CD8+ и CD20+ ћелија, али нижи број DC-SIGN+ ћелија у односу на пацијенте без фиброзе. Иако је фреквенција и CD4+ и CD8+ ћелија већа код пацијената са узнапредовалом фиброзом, индекс CD4/CD8 позитивних ћелија код ових пацијената је више од два пута нижи у односу на пацијенте без фиброзе. Уочене разлике у фреквенцији појединих субпопулација лимфоцита у ткиву јетре пацијената у различитим стадијумима болести, указују да анализа имунофенотипских параметара у јетри, у односу на периферну крв, боље одсликава fine механизме имунског одговора на HCV вирус. Методама корелације утврђено је да постоји статистички високо значајна корелација између броја Т лимфоцита у инфилтратима јетре и серумског нивоа AST и ALT. Интересантно је да је корелација серумских концентрација AST у позитивној корелацији са бројем CD4+ лимфоцита, док је та корелација негативног предзнака у случају Foxp3+ Treg.

Сумарно, резултати ове опсежне студије су показали да су пацијенти са хроничном HCV инфекцијом хетерогена група, те да се прави увид у имунопатогенетска дешавања током хроничне HCV инфекције може добити једино упоредном анализом пацијената у различитим стадијумима болести. Сходно томе, показано је да је имунски одговор код ових пацијената поларизован у односу на стадијум болести. Код пацијената у нижим стадијумима болести доминира Th1 имунски одговор који, иако праћен умереном интрахепатичном ифилтрацијом ефекторских Т лимфоцита, не доводи до оштећења јетриног паренхима. Насупрот томе, код пацијената са високим стадијумом фиброзе доминира неадекватан Th2 одговор, који праћен изразито снажном интрахепатичком

инфилтрацијом ефекторских лимфоцита уз изразиту доминацију CD8+ лимфоцита, доводи до масивног оштећења јетриног паренхима. Наши резултати указују да регулаторни механизми укључени у ову поларизацију могу бити двојаки. Са једне стране, пацијенти у нижим стадијумима болести имају већи број активираних mDC, како у периферној крви, тако и у инфламираном ткиву јетре, док пацијенти са израженом фиброзом показују доминацију pDC. Поред тога, пацијенти са израженом фиброзом имају знатно већи број интрахепатичних Treg, при чему негативна корелација између броја Treg у јетри и серумског нивоа AST и ALT, као и позитивна корелација између броја CD4 и серумског нивоа AST могу бити одраз покушаја имунског система да ограничи интензиван, али не и ефикасан Т ћелијски имунски одговор.

**Датум прихватања теме од стране ННВ**  
**ДП**

**Датум одбране:**  
**ДО**

**Чланови комисије**  
**КО**

**Председник**

**Проф. др Миодраг Лукић**, председник, професор емеритус Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија.

**Члан**

**Проф. др Предраг Чановић** члан, редовни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Инфективне болести.

**Члан**

**Проф. др Миодраг Чолић** члан, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије, Универзитета Одбране у Београду, за ужу научну област Имунологија.

**Ментор**

**Проф. др Дејан Баскић**, ментор, ванредни професор Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија.

## 8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Documentation type:**

**DT**

Monographic publication

**Type record:**

**TR**

Textual printed material

**Contents code:**

**CC**

PhD thesis

**Author:**

Vuk R. Vukovic

**Menthor/co-menthor:**

**MN**

Prof. dr Dejan Baskic

**Title:**

**TI**

Correlation between the number of regulatory T lymphocytes and immune response with the degree of viral replication during chronic HCV infection.

**Language of text:**

**LT**

Serbian (Cyrillic)

**Language of abstract:**

Serbian/English

**Country of publication:**

**CP**

Serbia

**Locality of publication:**

**LP**

Serbia

**Publication year:**

**PY**

2014.

**Publisher:** Author reprint  
**PU**

**Publication place:** 34000 Kragujevac, Serbia  
**PP** 69 Svetozara Markovica

**Physical description:** These contains 161 pages, 7 chapters,  
**PD** 39 pictures, 7 graphs, 14 tables  
and 378 citations.

**Scientific field:** Medicine  
**SF**

**Scientific discipline:** Immunology  
**SD**

**Subject/key words** HCV, Treg, HCV-RNA, hepatitis C.  
**SKW**

**UDC**

**Holding data** Library of Medical faculty Kragujevac  
34000 Kragujevac, Serbia  
Svetozara Markovica 69

**Note:**  
**N**

**Abstract:**  
**AB**

In up to 80% of patients acute form of hepatitis C is asymptomatic. After the acute phase, the spontaneous resolution of HCV infection occurs in only 20% of cases, while most of infected patients develop a chronic disease. It is assumed that about 180 million people worldwide, have chronic HCV infection. The pathogenesis of HCV infection is the result of multiple interactions between the host's immune system and viral factors. Strong HCV-specific CD4+ and CD8+ T cell response directed to multiple epitopes of HCV in some cases eliminate the virus spontaneously in the acute phase. However, HCV has mechanisms to escape humoral and cellular response, which allows progression of the disease to the chronic phase. A subset of regulatory T cells contributes to failure of T cell-mediate immunity in the early stages of infection and thus prevent the removal of the virus, but also can reduce the inflammatory infiltrate in the liver and help prevent massive tissue damage. The aim of this study was to determine the presence and absolute and relative number of CD4+, CD4+/Foxp3+ (Treg), CD8+ and CD20+ cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection, to assess sera cytokine profile and to find possible correlations of these parameters, viral replication and liver histopathology.

The results of our study showed that chronically infected patients were mostly males, IVUPAS was most frequent route of infection and genotype 1 was dominant. About 77% of patients achieved sustained virologic response. The logistic regression showed that an age of the patients and genotype are significant predictive factors for the development of fibrosis,



while the most important predictors of a favorable response to therapy are age of the patient, route of infection and the stage of fibrosis. Cytokine profiling has shown predominance of inflammatory cytokines in patients without fibrosis and tendency of decrease in cytokine levels with progression of liver injury. In F3 stage patients values of all cytokines except IL-4 were lower than in control group, indicating predominance of Th2 response in the higher stages of fibrosis. After the treatment, levels of both proinflammatory and antiinflammatory cytokines decreased. Results of flow cytometry showed that, in comparison to control, patients had significantly higher number of peripheral blood CD3+, as well as CD4+, CD8+ and Foxp3+ T cell subpopulations, but the difference in CD4/CD8 index was not statistically significant. Furthermore, the number of activated pDCs was significantly higher than the number of activated mDCs. In addition, we have found higher number of activated mDCs in the lower stages of fibrosis, and activated pDCs in the higher stages of fibrosis, although these differences were not statistically significant. In the liver of patients with poor response to therapy we have noted significantly lower number of CD4+ and Foxp3+, but higher number of CD8+ cells, as compared to responders. As a result, the CD4/CD8 index was almost three times lower in patients with poor response to therapy. On the other hand, patients with higher stages of fibrosis, have a significantly higher number of CD4+, Foxp3+, CD8+ and CD20+ cells, but a lower number of DC-SIGN+ cells as compared to patients without fibrosis. Although the frequency of CD4+ and CD8+ cells increased in patients with advanced fibrosis, CD4/CD8 index was more than two times lower than in patients without liver fibrosis. These facts indicate that immunophenotypic analysis of liver reflects more certain the mechanisms of immune response to HCV virus. Statistically significant correlation between the number of T cell in liver infiltrates and serum levels of AST and ALT was found. Interestingly, serum concentrations of AST were positively correlated with the number of CD4+ lymphocytes, whereas negatively correlated with number of Foxp3+ Treg.

In summary, the results of these extensive studies have shown that patients with chronic HCV infection represent a heterogeneous group, and that the real insight into immunopathogenetic events during chronic HCV infection may be provided only by comparative analysis of patients in different stages of the disease. Accordingly, it has been shown that the immune response is polarized in relation to the stage of fibrosis. In patients with lower stages of fibrosis Th1 response is dominant and, although accompanied by moderate intrahepatic effector T lymphocytes infiltration, does not lead to damage of liver parenchyma. In contrast, in patients with high-stage fibrosis inappropriate Th2 response dominates, in concomitance with strong intrahepatic infiltration of effector cells and distinct dominance of CD8+ lymphocytes, resulting in massive damage of liver parenchyma. Our results indicate dual regulatory mechanisms involved in this polarization. On the one hand, the patients with lower stages of fibrosis have a higher number of activated mDC, both in the peripheral blood and in inflamed liver tissue, while patients with marked fibrosis showed dominance of pDC. In addition, patients with marked fibrosis have a significantly larger number of intrahepatic Treg, wherein a negative correlation between the number of Treg in the liver and serum levels of AST and ALT, and the positive correlation between the number of CD4 and serum levels of AST may be a reflection of the immune system attempts to limit intense, but inefficient T cell immune response.

**Accepted by Scientific Board on:**  
**ASB**

**Defended on:**  
**DE**

**Thesis defended board**  
**(Degree/name/surname/title/faculty)**  
**DB**

<b>President</b>	<b>Prof. dr</b> Miodrag Lukic, Proffesor emeritus of Microbioogy and Immunology Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac.
<b>Member</b>	<b>Prof. dr</b> Predrag Canovic, Proffesor of Infectious diseases, Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac.
<b>Member</b>	<b>Prof. dr</b> Miodrag Colic, Proffesor of Immunology, Faculty of Medicine Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade
<b>Menthor</b>	<b>Prof. dr Dejan Baskic</b> , Proffesor of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac

### **8.3 БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА**

Вук Вуковић је рођен 01. августа 1970. Године у Пећи, где је са одличним успехом завршио основну и средњу школу. Медицински факултет у Крагујевцу завршио је 1996. године.

По обављању лекарског стажа и полагања стручног испита, ради као лекар опште праксе у Гарнизонској амбуланти у Крагујевцу. У току 2003. године, бива упућен на последипломске студије облика специјализације група Интерне Клинике – општа медицина на ВМА, коју завршава 2007 године. Од 2007. године налази се на месту Управника ГА Крагујевац, у чину мајора. Докторске академске студије смер Имунологија, инфекција и инфламација на Медицинском факултету у Крагујевцу уписује 2007. године. Усмени докторантски испит положио је 31.10.2009. године, оценом 10 (десет).

## 8.4 СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

**Vuković V**, Baskić D, Mijailović Ž et al. Association between risk factors, basal viral load, virus genotype and the degree of liver fibrosis with the response to therapy in patients with chronic HCV infection. *Vojnosanitetski pregled IOS Press*.

**Vuković V**, Baskić D, Mijailović Ž et al. Terapija hronične HCV infekcije- povezanost prediktivnih faktora i virusološkog odgovora. *Medicinski časopis*.Vol.48,br3(2014) doi:10.5937/mckg48-5925.

**Vuković V**, Mijailović Ž, Borovčanin N. Epstein-Barr virusni hepatitis sa pojavom ikterusa. *Medicinski časopis*. 2010; 1: 14-18.

Baskić D, Popović S, Banković D, Arsović A, **Vuković V**, Zelen I, Đurđević P. Evaluation of inflammatory biomarkers as helping diagnostic tool in patients with breast cancer. *Cancer Biomarkers 00 (2014) 1–8 1 DOI 10.3233/CBM-140426 IOS Press*.

## 8.5 THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

**Vuković V**, Baskić D, Mijailović Ž et al. Association between risk factors, basal viral load, virus genotype and the degree of liver fibrosis with the response to therapy in patients with chronic HCV infection. Vojnosanitetski pregled IOS Press.

**Vuković V**, Baskić D, Mijailović Ž et al. Therapy chronic HCV infection- association between risk factors and virus response. Medicinski časopis.Vol.48,br3(2014) doi:10.5937/mckg48-5925.

**Vuković V**, Mijailović Ž, Borovčanin N. Epstein-Barr virus hepatitis associated with icterus. Medicinski časopis. 2010; 1: 14-18.

Baskić D, Popović S, Banković D, Arsović A, **Vuković V**, Zelen I, Đurđević P. Evaluation of inflammatory biomarkers as helping diagnostic tool in patients with breast cancer. Cancer Biomarkers 00 (2014) 1–8 1 DOI 10.3233/CBM-140426 IOS Press.

## 8.6 ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I. Аутор</i></b>	
Име и презиме:	Вук Вуковић
Датум и место рођења:	01.08.1970. Пећ
Садашње запослење:	Војска Србије
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>	
Наслов: ПОВЕЗАНОСТ БРОЈА РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА И ИМУНСКОГ ОДГОВОРА СА СТЕПЕНОМ ВИРУСНЕ РЕПЛИКАЦИЈЕ ТОКОМ ХРОНИЧНЕ ХЦВ ИНФЕКЦИЈЕ	
Број страница: 161	
Број слика: 39	
Број библиографских података: 378	
Установа и место где је рад израђен: Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Имуношкој лабораторији Института за јавно здравље у Крагујевцу, Клиници за инфективне болести, Клиничког центра Крагујевац, Центру за патолошко-анатомску дијагностику, Клиничког центра Крагујевац и Клиници за хематологију, Клиничког центра Крагујевац.	
Научна област (УДК):	ИМУНОЛОГИЈА
Ментор:	Проф. др Дејан Баскић
<b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>	
Датум пријаве теме: 01- 6270/3-11 од 21.09.2011.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 01-1289313-1, 26.11.2014.	
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник.</li> <li>2. Проф. др Предраг Чановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу област Инфективне болести, члан.</li> <li>3. Проф. др Миодраг Чолић, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан.</li> </ol>	
Комисија за оцену докторске дисертације:	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник.</li> <li>2. Проф. др Предраг Чановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу област Инфективне болести, члан.</li> <li>3. Проф. др Миодраг Чолић, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан.</li> </ol>	

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник.
2. Проф. др Предраг Чановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу област Инфективне болести, члан.
3. Проф. др Миодраг Чолић, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан.

Датум одбране дисертације: