



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ружица Лукић

**Хепатитис С и параметри инфламацијског одговора код
пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор др сци. мед. Иван П. Јовановић, ванредни професор

КРАГУЈЕВАЦ, 2017. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Ружица Лукић
Датум и место рођења: 25.02.1976. године, Фоча, Босна и Херцеговина
Садашње запослење: Специјалиста микробиологије са паразитологијом, Универз. болница у Фочи, Асистент на катедри за микробиологију и имунологију, Медицински факултет у Фочи
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Хепатитис С и параметри инфламацијског одговора код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом
Број страница: 125
Број слика: 9
Број библиографских података: 266
Установа и место где је рад израђен: Универзитетска болница у Фочи, Факултет Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: проф. др Иван П. Јовановић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 23.06.2016.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-1044/12 од 02.11.2016.године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник 2. проф. др Маја Ђупић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија, члан 3. проф. др Жељко Мијаиловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан 4. проф. др Дејан Петровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан 5. проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације: 1. проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник 2. проф. др Маја Ђупић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија, члан 3. проф. др Жељко Мијаиловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан 4. проф. др Дејан Петровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан 5. проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
Датум одбране дисертације:

Абстракт:

АБ

Хепатитис С вирусна инфекција (HCV), један од најчешћих узрока болести јетре, честа је компликација код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (енг. end-stage renal disease, ESRD). ESRD се дефинише као смањена гломеруларна филтрација, а такође је праћена и поремећеном функцијом имунског система. Галектин-3 је лектин који повезује β -галактозиде, укључен у различите биолошке процесе, укључујући патогенезу хроничне бубрежне болести. Циљ наше студије је био да се испита тежина болести код ESRD⁺ HCV⁺ пацијената и анализирају серумске концентрације цитокина; Анти- HCV антитела; и галектина-3. Такође, покушали смо да одредимо потенцијалну корелацију између нивоа галектина-3 и параметара тежине болести ALT и AST. Наши резултати показују смањене нивое ALT и AST ($p = 0.00$), што указује на мање оштећење јетре код ESRD⁺ HCV⁺ пацијената у односу на HCV⁺ пацијенате. Повећана концентрација IL-6 ($p = 0.03$) имплицира хепатопротективну улогу IL -6 код ових пацијената. Такође, ниво галектина-3 ($p = 0.00$) у серуму ESRD⁺ HCV⁺ пацијената већи је него код HCV⁺ пацијената. Ову промену „прати“ негативна корелација између галектина-3 и AST-а и ALT-а ($p = 0.029$; $p = 0.033$). Присуство повећаних системских вредности IL-6 и Gal-3 код ESRD⁺ HCV⁺ пацијената може бити компензаторни механизам да се избегну или ограниче текући проинфламацијски процеси и да се супримира хронична инфламација, што указује на нове аспекте HCV инфекције код пацијената са ESRD.

Abstract:

AB

Hepatitis C virus infection (HCV), one of the greatest causes of liver disease, is a frequent complication in patients with end-stage renal disease (ESRD) on dialysis. ESRD is defined as decreased glomerular filtration and also accompanied by impaired function of the immune system. Galectin-3 is a β -galactoside-binding lectin, involved in various biological processes including pathogenesis of chronic renal disease. The aim of our study was to estimate disease severity in ESRD HCV+ patients and analyze the serum concentrations of cytokines; anti-HCV antibodies; and galectin-3. Also, we attempted to determine potential correlation between galectin-3 level and parameters of disease severity ALT and AST. Our results showed decreased levels of ALT and AST ($p = 0.00$), demonstrating less liver destruction in ESRD HCV+ patients in comparison to HCV+ patients. Increased levels of IL-6 ($p = 0.03$) implicate a hepatoprotective role of IL-6 in these patients. Also, level of galectin-3 ($p = 0.00$) in the serum of ESRD HCV+ patients was higher than that of HCV+ patients. This alteration was accompanied with negative correlation between galectin-3 and AST and ALT, respectively ($p = 0.029$; $p = 0.033$). The presence of increased systemic levels of IL-6 and Gal-3 in ESRD HCV+ patients may be an attempt to counteract or limit ongoing proinflammatory processes and to downregulate chronic inflammation, suggesting the new aspects of HCV infection in ESRD patients.

**Својим родитељима, брату, кћерци Марији
и неком ко одавно није са нама....**

Овом приликом се захваљујем свом ментору проф. др Ивану Јовановићу на свесрдној и безрезервној помоћи током израде докторске дисертације без чије подршке и разумијевања иста не би била реализована, као и проф. др Небојши Арсенијевићу и проф. др Вељку Марићу на иницијативи, подршци и сугестијама у реализацији тезе.

Захваљујем се проф. др Небојши Арсенијевић, проф. др Маји Ђупић, проф. др Жељку Мијаиловићу, проф. др Дејану Петровићу и проф. др Гордани Радосављевић на подршци и разумијевању.

Хвала истраживачком тиму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и колективу Центра за биохемију и микробиологију у Универзитетској болници Фоча на помоћи у реализацији тезе, као и Центрима за хемодијализу у Фочи, Добоју, Бијелјини и Шамцу.

Захваљујем се проф.др Ивану Јовановићу и др Невени Гајовић на статистичкој обради.

Огромну захвалност дугујем својим родитељима Виду и Милки на безрезервној подршци, као и брату Радану а посебно кћерци Марији.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. ХЕПАТИТИС С ВИРУС.....	2
1.1.1. Опште карактеристике.....	2
1.1.2. Морфологија, структура вириона и класификација.....	2
1.1.3. Генетска варијабилност	6
1.1.4. Патогенеза HCV хепатитиса	8
1.1.5. Повезаност HCV генотипова са клиничким манифестацијама HС инфекције.....	11
1.2. ИМУНСКИ ОДГОВОР НА ВИРУС С ХЕПАТИТИСА	13
1.3. HCV ИНФЕКЦИЈА КОД БОЛЕСНИКА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕСТИ БУБРЕГА	19
1.3.1. Фактори ризика за настанак HCV инфекције код болесника на хемодијализи.....	20
1.4. ИМУНОСТ БОЛЕСНИКА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕСТИ БУБРЕГА	21
1.5. ИМУНСКИ ОДГОВОР НА HCV КОД БОЛЕСНИКА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕШЋУ БУБРЕГА.....	24
1.6. ДИЈАГНОСТИКА ХЕПАТИТИСА С КОД БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНИМ ОБОЉЕЊЕМ БУБРЕГА НА ХЕМОДИЈАЛИЗИ	26
1.7. АЛГОРИТМИ У ДИЈАГНОСТИЦИ HCV ИНФЕКЦИЈЕ	27
1.8. ТЕРАПИЈА HCV ИНФЕКЦИЈЕ И МОНИТОРИНГ ТЕРАПИЈСКОГ УСПЈЕХА.....	28
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	33
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	34
3.1. ИСПИТИВАНИ УЗОРАК	35
3.2. ИСТРАЖИВАЧКИ ПОСТУПАК.....	36
3.2.1. Лабораторијска дијагностика HCV инфекције	37

3.2.2. Одређивање биохемијских параметара.....	38
3.2.3. Одређивање серумских концентрација инфламацијских молекула	40
3.2.4. Детекција анти HCV антитијела	42
3.2.5. Квалитативни RT PCR	44
3.2.6. Квантитативни “Real time” RT-PCR.....	45
3.2.7. Генотипизација HCV.....	46
3.3. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	47
4. РЕЗУЛТАТИ.....	50
4.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА	50
4.2. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ АНТИ-HCV АНТИТИЈЕЛА И HCV RNA.....	51
4.3. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА УРЕЕ, КРЕАТИНИНА И БИЛИРУБИНА ЗНАЧАЈНО СУ ВЕЋЕ У СЕРУМУ ИСПИТАНИКА СА ESRD.....	54
4.4. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ ИСПИТАНИКА.....	58
5. ДИСКУСИЈА.....	73
6. ЗАКЉУЧЦИ	83
7. СКРАЋЕНИЦЕ	84
8. ЛИТЕРАТУРА.....	86
9. ПРИЛОГ	113
9.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА	113
9.2. KEYWORDS DOCUMENTATION	117
9.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА.....	120
9.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА	122
9.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS	123

1. УВОД

Вирус хепатитиса С (енгл. Hepatitis C Virus, HCV) је водећи узрочник хроничних обољења јетре (1) и представља озбиљан глобални здравствени проблем (2).

Прва идеја о постојању неког новог хепатитиса потиче још из седамдесетих година двадесетог вијека када је примјећена појава посттрансфузиског хепатитиса са скоро устаљеном инкубацијом од око 50 дана, а да серолошки није припадао ни А ни В хепатитису. Хепатитис изазван вирусом С се може манифестовати и као акутно обољење али у највећој мјери има хроничан ток. Сматра се да око 3% свјетске популације (170-200 милиона људи) има хроничну HCV инфекцију, односно да око 2,7 милиона има активни С хепатитис, који је дефинисан позитивним резултатом теста на HCV-RNA у серуму (3, 4). Сваке године се зарази 3-4 милиона људи, а више од 350.000 умре од обољења повезаних са HCV инфекцијом (5, 6). Болесници са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (енгл. End Stage Renal Disease- ESRD), који су на хемодијализи представљају ризичну групу за HCV инфекцију због инвазивних медицинских процедура којима су изложени. Према литературним подацима, преваленција HCV инфекције код хемодијализираних болесника је виша него у општој популацији и износи 3% у земљама западне Европе, до чак 20% у земљама јужне Европе (7, 8). Имуносупресија је једна од многих последица хроничне бубрежне инсуфицијенције. Дефекти имунског система су вјероватно последица дејства такозваних „уремичних токсина“, који обухватају велики број молекула као што су β 2-микроглобулин и реактивни кисеонични радикали (енгл. Reactive Oxygen Species, ROS).

Предмет овог истраживања је испитивање карактеристика С хепатитиса и антивирусног имунског одговора код болесника са ESRD на хемодијализи.

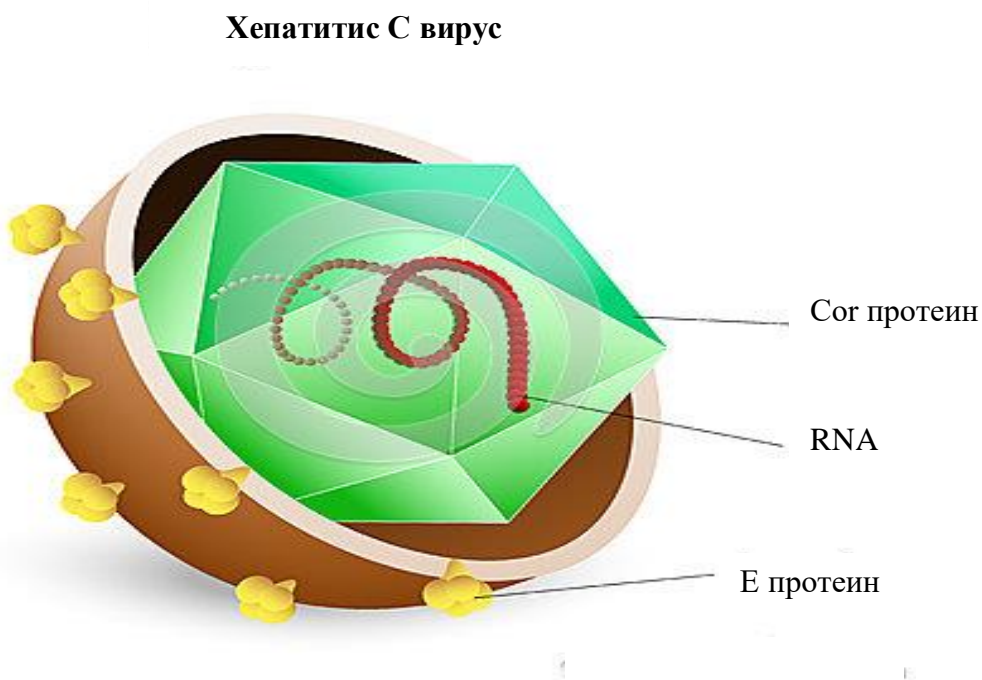
1.1. Хепатитис С вирус

1.1.1. Опште карактеристике

Вирус С хепатитиса припада фамилији *Flaviviridae*, али је због својих специфичности у односу на остале флавивирусе издвојен у посебан род *Hepacivirus* (9, 10). На основу разлика у нуклеотидним секвенцама вирусног генома, HCV изолати класификовани су у 7 генотипова који обухватају велики број субтипова а који имају различиту географску дистрибуцију (11, 12, 13).

1.1.2. Морфологија, структура вириона и класификација

Честица HCV је сферична партикула пречника 45-65nm са нуклеокапсидом икозаедарне симетрије обавијеним липидним омотачем (слика 1).



Слика 1. Структура вириона С хепатитиса

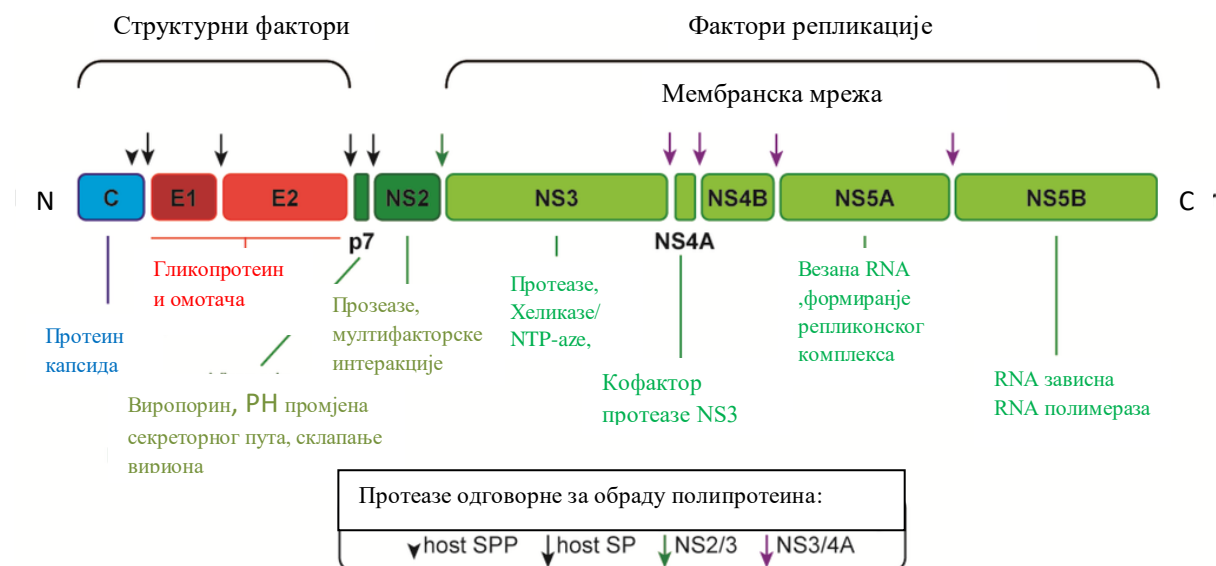
(Преузето од Royalty Free Stock Photography: Hepatitis virus ID 14417137 © Renjith Krishnan.r | Dreamstime.com)

Вирусни геном чини једноланчана позитивна RNA (9.5 kb) која кодира полипротеин са 30 000 аминокиселина и која на 5' крају има ковалентно везан VPg.

Геном садржи један отворени оквир читања (енгл. *Open Reading Frame*, ORF), који је

окожуен некодирајућим регионима, који су потребни за транслацију и репликацију RNA вируса. Један полипротеин је кодиран од ORF, који је прије и посттранслаторно процесуиран ћелијским и вирусним протеазама како би синтетисали 10 зрелих протеина: С (Core), Е1, Е2, P7, NS2, NS3, NS4А, NS4В и NS5А и NS5В (14, 15, 16), тако да полипротеин чине структурни и неструктурни протеини.

Структурни дио генома (С, Е1, Е2 и евентуално P7 гени) кодира протеине нуклеокапсида или core“протеин и два гликопротеина омотача. Неструктурни дио вирусног генома, који обухвата NS2, NS3, NS4 и NS5 гене (17, 18, 19), одговоран је за синтезу RNK полимеразе, хеликазе, протеазе и осталих протеина укључених у процес репликације вируса (слика 2).



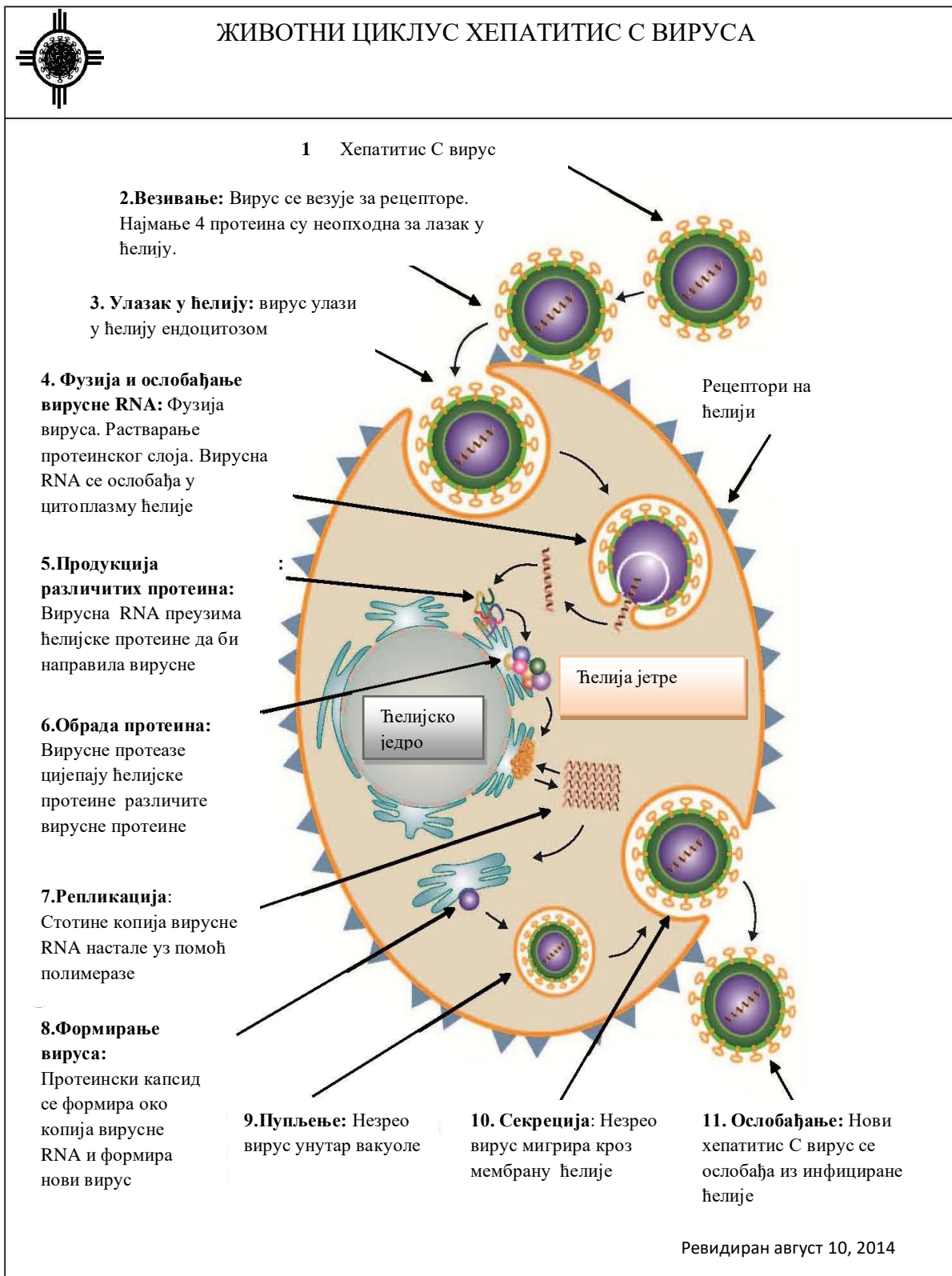
Слика 2. Морфологија и геномска структура вируса

(Преузето од Vieyresi Dubuisson. *Viruses*. 2014; 6:1149-1187 doi:10.3390/v6031149)

Улога неких од наведених протеина није у потпуности разрјешена (20). HCV „core“ је познат као индуктор оксидативног стреса и један од фактора генезе хепатоцелуларног карцинома (HCC), регулише апоптозу хепатоцита, интерферира с интрацелуларним метаболизмом липида и липопротеина те утиче на настанак стеатозе (21). Е1 и Е2 се сматрају првим вирусним протеинима који долазе у контакт са ћелијама домаћина (22). Након вирусне инфекције, нуклеокапсид протеин се локализује у цитосолу, ендоплазматском ретикулуму/Голџијевом апарату, митохондријама и једру, и тако утиче на различите ћелијске функције (3). Гликопротеини омотача (Е1 и Е2) су укључени у интеракцију са ћелијама домаћина и посредују уласку вируса у ћелију, и

потенцијалне су мете за развој вакцине (23, 24). P7 је протеин виропорин, позициониран на „раскрсници“ између структурних и неструктурних вирусних протеина, који учествује у формирању јонских канала у липидној мембрани (17, 25), са могућом улогом у сазријевању и ослобађању вируса (26). P7 и NS2 нису неопходни за репликацију генома, али су неопходни за склапање вирусне честице (27, 28). Неструктурни протеини играју улогу у умножавању вируса. За протеолизу неструктурних протеина служе NS2/NS3 цинк-зависна протеиназа као и NS3 која има серин протеазну и хеликазну активност, и цијепа низводно NS протеине заједно са NS4A као кофактором. NS4B је компонента цитоплазматске мембране повезане са комплексом за репликацију HCV. Он представља интегрални протеин ендоплазматског ретикулума са којим ствара мрежу и служи као подручје интеракције вирусне RNA и протеина хелије домаћина током умножавања вируса (29). NS5A је незаобилазан фактор у репликацијском комплексу HCV и склапању вириона (3). Он је вишефункционални серински полифосфорилисани протеин. Тзв. адаптацијске мутације овог протеина значајно убрзавају умножавање вируса кроз интеракцију са различитим хелијским протеинима (17). NS5B је RNA-зависна RNA полимераза, и синтетише вирусне RNA (3). Сви наведени протеини потенцијалне су мете за развој лијекова (NS5B за инхибиторе полимеразе, NS3 за инхибиторе протеаза), док су због своје варијабилности, гликопротеини овојнице (E1 и E2) најмање поуздани као циљно мјесто за дјеловање лијекова (30).

Вирус који циркулише крвљу, се везује за рецепторе на хепатоцитима. Сматра се да се везује за рецепторе CD81 и SR-B1. Како су те молекуле нађене и другдје у тијелу још увијек је непознато по чему је HCV специфичан за јетру (31). Због немогућности да се стабилно интергрише у геном домаћина, за разлику од HBV, HCV-у је за перзистенцију неопходна континуирана репликација (слика 3). Више клиничких студија указује на улогу вирусних фактора HCV у прогресији болести, као што су чешћа стеатоза код генотипа 3 и чешћи развој хепатоцелуларног карцинома (HCC) код генотипа 1b, иако постоје и супротне тврдње (32-35).



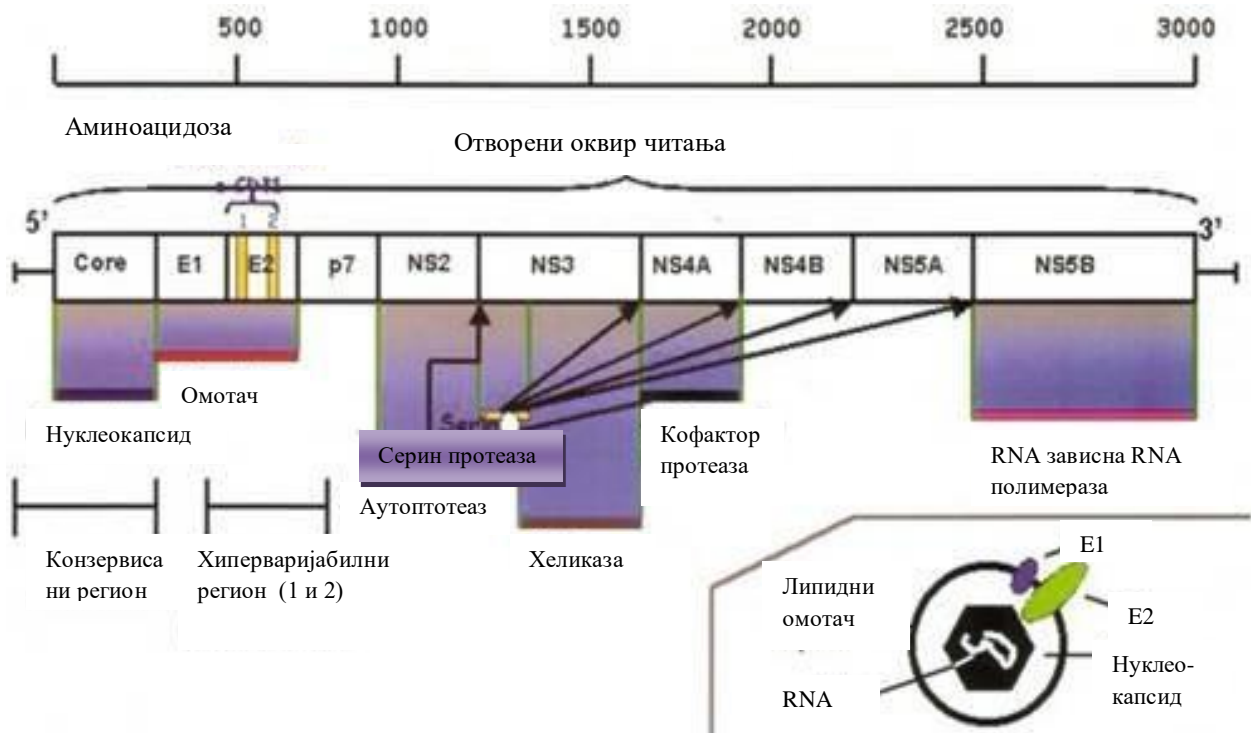
A project of the New Mexico AIDS Education and Training Center. Partially funded by the National Library of Medicine
Fact Sheets can be downloaded from the Internet at <http://www.aidsinfonet.org>

Слика 3. Животни циклус вируса С хепатитиса

1.1.3. Генетска варијабилност

Вирус С хепатитиса је варијабилан RNA вирус. Варијабилност је последица мутација у геному вируса због високе репликативне активности. Дневна продукција вириона је 10^{12} а полуживот вируса је 2.7 сати (36).

Репликацију генома катализује вирусна RNA полимераза која не може да исправља сопствене грешке које неминовно прави током репликације. Конзервирани дијелови генома су 5' и 3' NTR (некодирајући региони) а најконзервиранији дио је ген који кодира капсид (С ген). За разлику од С гена Е1 и Е2 гени вириона различитих генотипова се разликују у нуклеотидним секвенцама. Поред тога Е2 регија је хиперваријабилна због спонтаних мутација у овом гену, што је од посебног значаја када се зна да су антигенијела према Е2 протеину неутралишућа (11) (слика 4).



Слика 4. HVR региони

(Преузето од <http://epidemiologiamolecular.com/virus-hepatitis-vhc/>)

Најваријабилнији дијелови генома су гени за протеине омотача. Први хиперваријабилни (HVR) регион представља 5' крај E2 гена - HVR1. Други хиперваријабилни регион се налази на 3' крају HVR2, појављује се само код генотипа 1b и чини га 21 нуклеотид. HVR2 регион се састоји од 60 нуклеотида а његов полипептидни продукт је главни неутралишући епитоп HCV-а (37). Сви гени код различитих генотипова имају исту дужину, са изузетком E2, NS5A и 3' NTR. Генотипови 2a и 2b у NS5A региону имају инсертовану секвенцу од 60 нуклеотида (36). Геномска анализа HCV из истог изолата показала је структурне разлике у дужини секвенци односно појави квазиспецијеса. Термин квазиспецијес произашао је из варијабилности генома HCV у оквиру истог изолата (разлика генома у барем једном нуклеотиду). За трајање терапије велики допринос дало је истраживање полиморфизама HCV генома који је варијабилан цијелом дужином (37, 38). На основу процента нуклеотидне разлике генома, до данас је јасно дефинисано 7 различитих типова HCV (разлика генома до 30%), а у оквиру сваког генотипа утврђено је постојање неколико различитих субгенотипова који су дефинисани на основу нуклеотидне разлике од 20% на дужини цијелог генома (39, 40). У сваком изолату једне инфициране особе присутно је више различитих квазиспецијеса (39-42). Квазиспецијеси код HCV-а се појављују углавном захваљујући постојању HVR1 E2 гена. Код генотипа 1b утврђено је постојање још једног хиперваријабилног дијела HVR2 (43). С обзиром да HVR кодира протеине који представљају главне неутралишуће епитопе, настајање квазиврста и њихове сталне измјене у току инфекције су основни механизам којим HCV избјегава имунски одговор што спречава развој ефикасног и трајног имунског одговора омогућујући тако настанак хроничног хепатитиса. Изузетна варијабилности генаома HCV онемогућује развој ефикасне вакцине, а тако и адекватну превенцију и контролу над ширењем инфекције. Значајан дио истраживања у молекулској биологији HCV-а односи се на разјашњавање механизма настанка цирозе, као једног облика премалигне лезије као и хепатоцелуларног карцинома. Механизми онкогенетског потенцијала HCV нису до данас сасвим познати. Највјероватније се ради о имунопатолошким збивањима која прате хроничну HCV инфекцију. Подаци из литературе указују на могућ утицај вирусних протеина на регулаторне нуклеарне протеинске компоненте ћелија домаћина (43, 44).

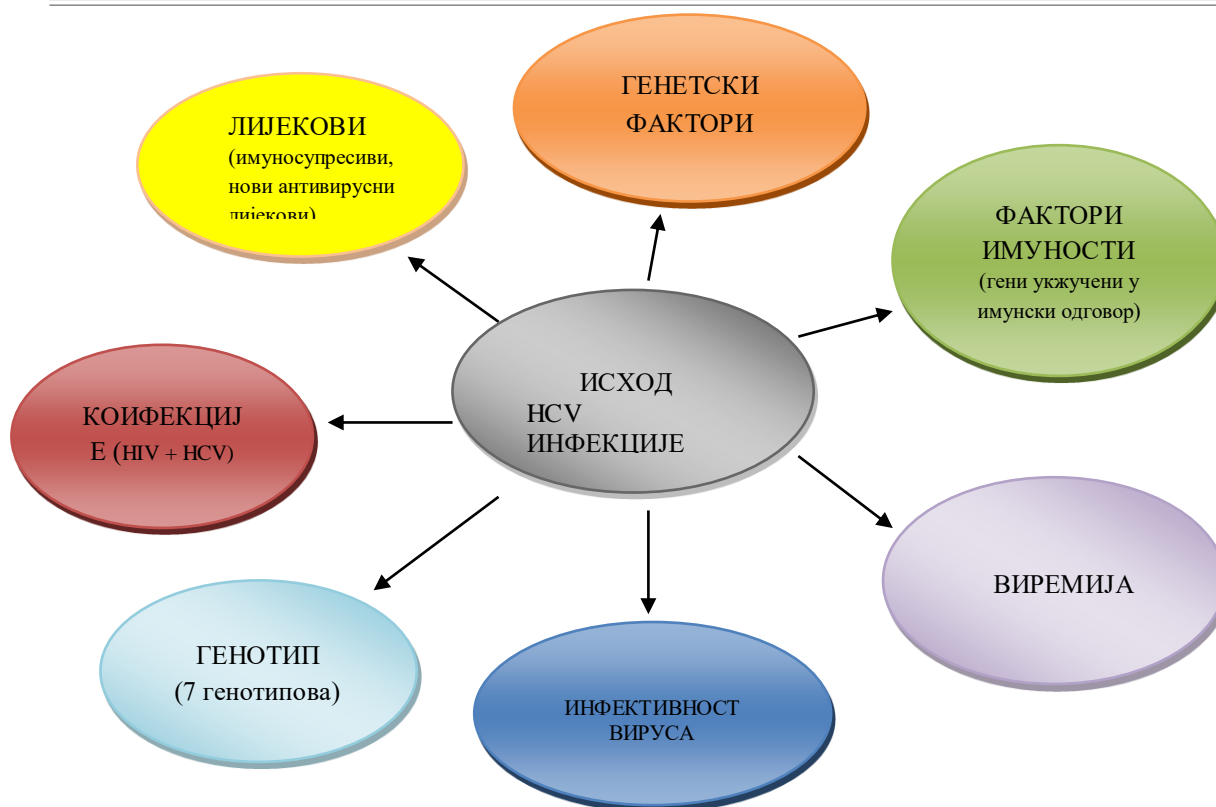
Како HCV инфекцију карактерише изузетна антигенска варијабилност у болесника често постоје антитела различите специфичности, што и серолошку дијагностику понекада чини недовољно поузданом.

1.1.4. Патогенеза HCV хепатитиса

Извор инфекције је човјек са акутном или хроничном инфекцијом. Вирус се налази у крви, саливи, сперми, вагиналном секрету, млијеку и другим тјелесним течностима. Пuteви преношења су: парентерални (преко крви, крвних деривата, трансплантираних органа и крвљу контаминираних предмета), сексуални и вертикални (перинатални и постнатални). Према подацима из литературе у 43% случајева пут преноса је непознати (45, 46). Најчешћи пут трансмисије био је посланица интравенског коришћења дроге или body piercing-а, као и због професионалног ризика при раду са инфицираним болесницима (47).

Вирус доспијева у јетру путем крви. Патогенетски механизми који индукују оштећења нису у потпуности разјашњени. Хуморални имунски одговор у акутној HCV инфекцији карактерише се појавом антитијела на капсидни С протеин, гликопротеине Е1, Е2 и остале неструктурне вирусне протеине. Активна инфекција у овој фази може да се потврди на основу присуства генома RNA и појаве антитијела на вирусне антигене. Код око 15% инфицираних болест има акутни клинички ток. Инкубација тј. период од уласка вируса у домаћина до појаве знакова болести износи просјечно око 7 недеља (распон 4-20 недеља). Код болесника са акутном HCV инфекцијом, чији је исход елиминација вируса, секвенца RNA вирусног генома може се открити PCR методом већ у току прве недеље, вредности трансминаза су повћане у периоду између 5-10 недеље, а антитијела између 7. и 30-те недеље од почетка инфекције. Послије елиминације вируса и нормализације вредности трансминаза концентрација антитијела одржава се још најмање годину дана или уопште не опада. Зато, због касне сероконверзије и присуства антитијела и послије елиминације вируса код болесника са транзиторном виремијом, присуство и концентрација антивирусних антитијела не могу бити поуздан маркер вирусне репликације и инфекције (11). Око 10-15% болесника доживи спонтану регресију („self-limited disease“), уз сероконверзију. Овај феномен забележен је претежно код младих, а нарочито жена.

У преко 80% болесника, после акутне инфекције, успоставља се перзистентна продуктивна, хронична инфекција (48). Хронична инфекција се дефинише као присуство репликације вируса дуже од 6 мјесеци. Перзистентна HCV инфекција најчешће настаје као последица спонтаних мутација у гену E2 којима вирус избјегава елиминацију од стране имунског система (49, 50). Епидемиолошка и експериментална истраживања су показала да перзистентна HBV и HCV инфекција води успостављању хроничне инфекције која може да се компликује тешким болестима јетре, цирозом и хепатоцелуларним карциномом (51, 52). С обзиром да вирус В хепатитиса не посједује трансформишуће гене, иако се помиње улога гена *x* у трансформацији (53) вирус вјероватно дјелује индиректно, преко инсерционе мутагенезе или механизмом трансактивације протоонкогена (52, 54). Сматра се да имунски механизми учествују у онкогенези стимулацијом репарације ткива јетре (3). Механизам трансформације ћелије вирусом С хепатитиса, који не посједује онкогене, такође није довољно познат. Вјерује се да је могућ механизам инхибиција антионкогена p53, одговорног за заустављање уласка ћелије у S фазу деобног циклуса. Губитком функције p53 ћелија улази у циклус пролиферације без заустављања у контролним тачкама, што води имортализацији као првом кораку у малигној трансформацији (53). Када се успостави хронична инфекција многи фактори учествују у интеракцији између вируса и домаћина и значајно утичу на ток болести, а инфекцију чини јединственом за сваког болесника (слика 5). У факторе домаћина спадају имуногенска предиспозиција, хуморална и ћелијска имуност и продукција цитокина. Болесници који се инфицирају у старијој животној доби имају брже прогредирајућу болест за разлику од оних код којих је инфекција настала у раној фази живота. Негативан утицај на ток болести имају мушки пол, HLA-Cw 4 генотип, дијабетес. У факторе вируса који значајно утичу на ток болести спадају директно цитопатогено дјеловање, концентрација вируса тј. вирусно оптерећење преко 2×10^6 IU/ml серума, а могуће и генотип, дистрибуција квазиспецијеса (55). Посттрансфузијски хепатитис носи већи ризик за развој цирозе у односу на друге начине трансмисије (56-58). Кофактори, као што су конзумирање алкохола који промовише оксидативни стрес и умањује учинак интерферонске терапије, имunosупресивни лијекови и коинфекција са другим вирусима могу убрзати прогресију болести.



Слика 5. Фактори који утичу на природни ток HCV инфекције (Преузето од *Infectious Agents and Cancer*2016**11**:23. DOI: 10.1186/s13027-016-0070-0)

Фактори домаћина и самог вируса који значајно утичу на ток и исход инфекције приказани су на слици 5. Коинфекције и коморбидитети такође доприносе исходу инфекције.

Код болесника са хроничном HCV инфекцијом постоји перзистентна виремија праћена осцилирајућим вриједностима трансаминаза и антитијелима специфичним за вирусне антигене (46). Доказ присутности HCV RNA у два независна анти-HCV позитивна узорка узета у 6-9 мјесечном периоду потврда је хроничног хепатитиса С (59). Сматра се да је оштећење јетре последица прије свега анти-HCV имунског одговора, а не директног цитопатогеног ефекта вируса *per se* (60).

HCV инфекција јавља се у три клиничка облика:

1. **Хронични хепатитис са нормалним вредностима ALT.** Овај облик има 25% болесника с хроничним С хепатитисом. Они су по правилу без симптома и хистолошки имају блажи облик болести у односу на оне с повишеним ALT. Њих око 20% има значајну фиброзу или цирозу на хистолошким препаратима након биопсије јетре.

2. **Благи хронични хепатитис праћен је благим, флукутирајућим повишењем ALT-а.** Обољели обично немају симптома и жале се на умор. Хистолошке промјене показују благу некроинфламатозну лезију и благу фиброзу. Ову групу чини око 50% болесника са хроничним хепатитисом. Прогресија болести је спора и ризик развоја цирозе је мали.
3. **Умјерени и тешки хронични хепатитис** се јавља у 25% болесника са хроничним хепатитисом. Већина њих нема симптоме, осим умора који не корелира са тежином болести. На хистолошким препаратима након биопсије јетре види се значајна некроинфламатозна лезија уз узнапредовалу фиброзу понекад и цирозу.

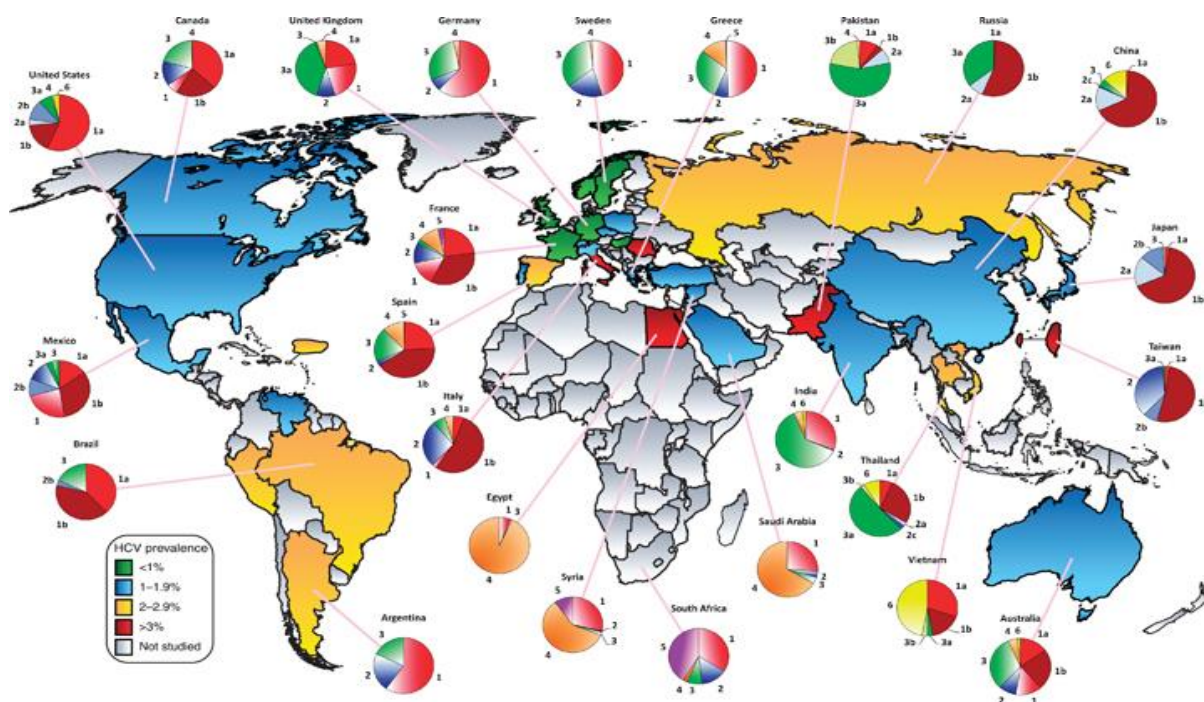
Дакле, клинички ток хроничног С хепатитиса је подмукао и дуго времена без икаквих симптома и/или знакова. Зато се дијагноза најчешће поставља случајно током прегледа крви код рутинских прегледа.

1.1.5. Повезаност HCV генотипова са клиничким манифестацијама HС инфекције

HCV генотипска дистрибуција у свијету је веома разноврсна. Неки генотипови се јављају у високом проценту широм свијета (генотипови 1а, 1б, 2а, 2б) док се други јављају само у одређеним регијама (36, 47, 61, 62) (слика 6). Поједини HCV генотипови су јасно повезани са одређеним дијеловима свијета што је важно за епидемиолошко праћење поријекла и ширења инфекције. У Европи доминирају генотипови 1, 2 и 3. Подтип 1б најчешћи је у јужној и источној Европи. Нпр. у већини европских земаља ширење различитих генотипова везано је за старосне групе. Поједини подтипови чешћи су међу припадницима ризичних група па је тако генотип 3 чешћи међу интравенским корисницима дрога. Код хемофиличара и интравенских корисника дрога могуће је присуство више генотипова. У литератури нема много података о дистрибуцији HCV генотипа међу хемодијализним (ХД) болесницима. У студијама спроведеним у Холандији, Француској, Мароку, Мексику и Турској уочена је предоминантност генотипа 1б међу болесницима на ХД (63, 64). У неким студијама, генотип 1б је био у корелацији са вишом стопом еволуирања у хроничност, тежим обликом обољења јетре и агресивним током. Поједини истраживачи указују на то да је генотип 1б само маркер

тежег обољења који осликава дуже трајање инфекције, јер су болесници са генотипом 1b обично старији (65). У студији у САД-у, субтип 1 био је најчешћи, док су у Италији код ХД болесника субтипови 2a и 3a били доминантни.

Генерално гледано, чини се да је субтип 1a чешћи код ХД болесника него код опште популације (63, 66).



Слика 6. Дистрибуција HCV генотипова у свијету
(Преузето од Negro и Alberti. Posted by HCV New Drugs at Monday. 2011:31:1-3)

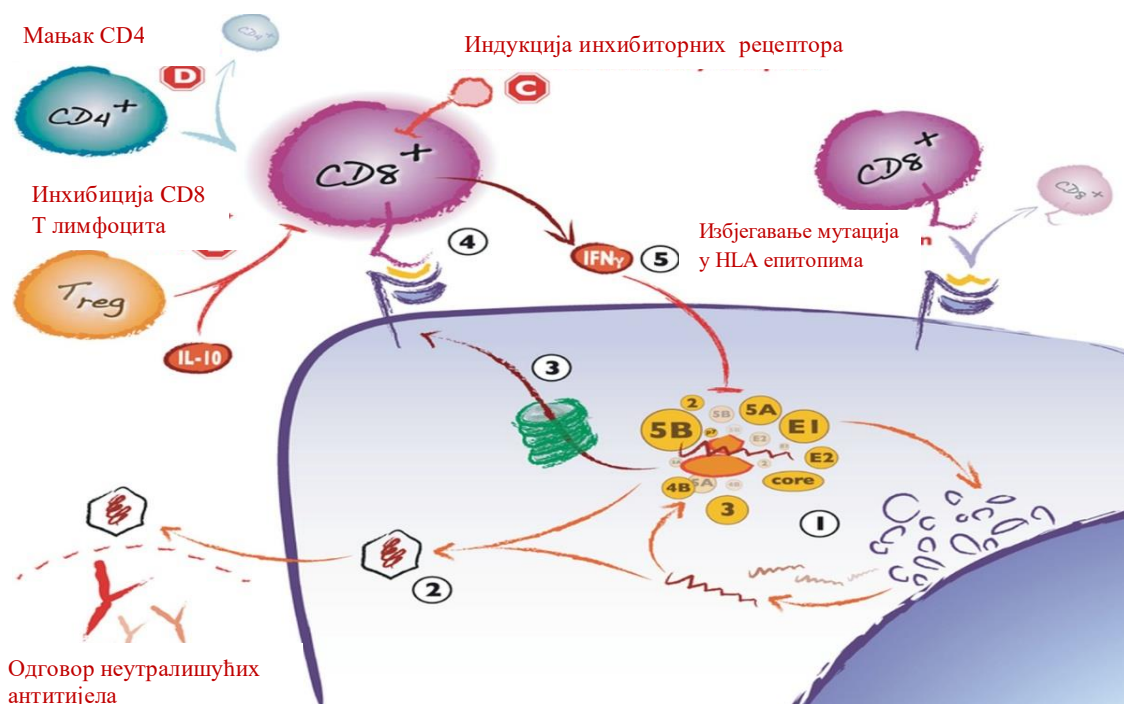
Подручје HVR1 смјештено на терминусу E2 може бити адаптивно и повезано је с повољним током болести јетре као што је генотип 2, нижим вредностима трансминаза и мање израженим хистолошким промјенама у јетри. Код болесника са генотипом 1b широки спектар реактивности серумских антитијела на HVR1 (анти HVR1) корелира са вирусним оптерећењем и одговором на интерферон. Подручје повезано са осјетљивошћу на интерферон је на неструктурном протеину 5A (NS5A) HCV генотипа 1b (67, 68). Одређивање којем генотипу HCV припада битно је због прогнозе и одговора на лијечење вируса. Генотипови 1 и 4 сматрају се резистентнијим. Начин лијечења хроничног хепатитиса С зависи од генотипа (40,41).

1.2. ИМУНСКИ ОДГОВОР НА ВИРУС С ХЕПАТИТИСА

Инфекцију вирусом С хепатитиса карактерише реакција имунског система домаћина на сам вирус. Са појавом вирусних антигена, у крвотоку, покрећу се и ефекторски механизми урођене и стечене имуности. Урођени одговор се покреће неколико сати након појаве виремије и контролише вирусно оптерећење док се специфични Т и В лимфоцитни одговори јављају након неколико дана и могу допринети искорјењавању инфекције и стварању имунитета (69). Рани антиген-неспецифични одговор против вируса укључује непосредно стварање и активацију интерферона (α и β) у инфицираним ћелијама, активацију комплемента те ћелија као што су НК ћелије (енгл. *Natural Killer Cells*). Наведени фактори представљају прву линију одбране од вирусних инфекција. Основни механизми одбране од интрацелуларних микроорганизама, какви су и вируси, су: убијање инфицираних ћелија, у овом случају хепатоцита и продукција IFN- γ који снажно активира макрофаге. Вирусни протеин Е2 може да инхибира НК ћелије и тако допринесе слабљењу имунског одговора и успостављању хроничне инфекције (70). Опште је прихваћено да стечена имуност игра централну улогу у патогенези и исходу болести код болесника са HCV (71, 71). Највјероватније је више компоненти стеченог имунског одговора укључено у контролу вирусне инфекције. Стога, интензитет, разноврсност и квалитет стеченог имунског одговора детерминишу исход инфекције (73). Већина инфицираних особа са HCV производе антителија против епитопа структурних и не-структурних протеина вируса (74). Међутим, већина њих има релативно антивирусно дјеловање, а само мали дио антителија је у стању да неутралише вирус прије уласка вируса у ћелију или да учествује у елиминацији механизмом опсонизације. Иако се током ове инфекције стварају неутралишућа антителија, она су специфична за сој вируса те не омогућавају потпуну заштиту од реинфекције хомологним или хетерологним вирусом, а експерименталне инфекције на мајмунима упућују и на то да имуност није доживотна. Многе студије су показале да код већине болесника с акутном HCV инфекцијом недостају неутралишућа антителија, док код болесника са хроничним током инфекције постоји развој таквих антителија након што је успостављена перзистенција вируса (75-79).

Антитијела могу допринијети оштећењу хепатоцита везивањем комплемента и ћелијском цитотоксичношћу посредованом антителима. Ефекторске функције вирус специфичних CD8⁺ и CD4⁺ Т лимфоцита важне су за елиминацију вируса и резолуцију болести (80). CD8⁺ цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T lymphocyte, CTL) представљају главни механизам стечене антивирусне имуности, а у HCV инфекцији су такође главне антивирусне ефекторске ћелије (81, 82). CTLs елиминишу ћелије инфициране вирусом продукцијом перфорина и гранзима и посредством лиганата смрти. CTL, који учествују у елиминацији вируса, продукују и велике количине IFN- γ (73, 83) и секретују антивирусне цитокине (84). Међутим, у раној фази инфекције CD8⁺ лимфоцити не могу излучити антивирусне цитокине као IFN- γ , стање названо „закочени фенотип“. У каснијој фази они поново стичу способност продукције цитокина што је повезано са брзим смањењем вiremije и на послетку и елиминацијом вируса. Специфични CD8⁺ и CD4⁺ Т лимфоцити перзистирају годинама након инфекције, чак дуже од хуморалног одговора. Насупрот томе, у перзистентној инфекцији одговор CD8⁺ лимфоцита је знатно слабији и није мултиспецифичан. Одговор вирус-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита праћен је појачаном секрецијом IL-2 и IFN- γ (85). Међутим у хроничној HCV инфекцији одговор CD4⁺ Т лимфоцита је слаб или изостаје, а ослабљена је и њихова функција нарочито продукција IL-2 (86). С друге стране, перзистентност HCV инфекције праћена је повећаном заступљеношћу регулаторних CD4⁺CD25⁺ Т лимфоцита (Treg), који могу директно или индиректно да супримирају активност HCV специфичних цитотоксичких Т лимфоцита код болесника (87) као и лучење IFN- γ , што олакшава перзистенцију вируса.

Студије показују да неки HCV протеини имају имуномодулацијски ефекат (слика 7). Протеин капсида (С протеин) дјелује на диференцијацију Т лимфоцита и њихову функцију. Он се везује на рецепторе за комплемент на површини макрофага и Т лимфоцита што смањује продукцију IL-2 и пролиферацију Т лимфоцита (88). Такође су током HCV инфекције запажене модификације Т и В епитопа што омогућава вирусу да избјегне имунски одговор. Зато је перзистенција вируса вјероватно последица честих мутација у HVR-1 региону те настанак квазиспецијеса што опет омогућава избјегавање имунског одговора. Осим хепатоцита HCV инфицира и Т и В лимфоците и тако оштећује њихову функцију (89).



Слика 7. Механизми избјегавања имунског одговора HCV-а
 Преузето од Thimme R и сар. FEMS Microbiol Rev. 2012;36:663-683.

Многе су стратегије које HCV користи да избјегне стечени имунски одговор. Генерисање вирусних протеина и преписивање HCV генома и доприносе стварању мембранских везикула, које су мјеста за RNK репликацију (1). Структурни протеини и вирусни геноми се користе за стварање нових вирусних честица (2) које се ослобађају секрецијом. Вирусни протеини се прерађују у протеазому (3) а настали пептиди се у склопу молекула HLA класе I и на површини ћелије представљају CD8⁺ Т лимфоцитима (4). Након активације, секретује се IFN- γ који блокира репликацију вируса (5). HCV може побјећи неутралишућим антителијелима директним преласком из ћелије у ћелију или индукцијом не-неутралишућих антителијела (Слика 7).

Цитокини

Цитокини представљају протеине које продукују многе, а прије свега ћелије имунског система: лимфоцити, моноцити/макрофаги, фибробласти, ендотелне и епителне ћелије (90) и који су снажни имуномодулатори и главни учесници у заштити од вирусне инфекције, било „обликовањем“ имунског одговора домаћина било инхибирањем репликације вируса (91). У цитокине спадају интерлеукини, хемокини,

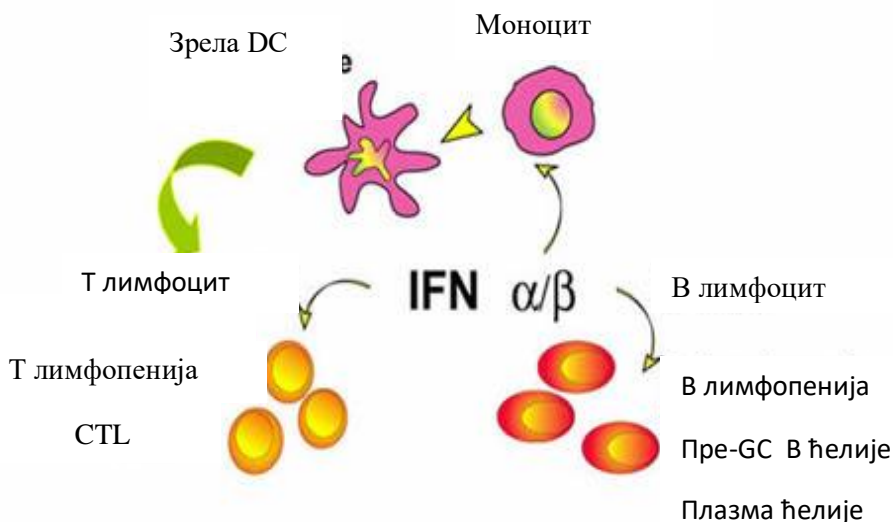
фактори раста и интерферони. Играју кључну улогу како у урођеном тако и у стеченом имунском одговору.

Луче се у врло ниским концентрацијама (дјелују у концентрацијама 10^{-9} до 10^{-15} М) и углавном дјелују локално и краткотрајно, углавном паракрино (на околне ћелије) или аутокрينو (на саме ћелије које их луче) а могу и ендокрино (секретују се у крвоток па тако дјелују на удаљене ћелије) и имају врло кратак полуживот (92). Цитокини могу бити позитивни и негативни модулатори имунског одговора (93). Ефекторске функције цитокина су активација и диференцијација ћелије, хемотакса и пролиферација ћелија. Њихова активност зависи од њихове концентрације у микрооколини и јачини експресије специфичних рецептора на површини циљне ћелије. Остварују своје дејство везивањем за мембранске рецепторе индукујући сигнал који мијења генску експресију циљне ћелије. Продукција цитокина је подстакнута антиген специфичном активацијом CD4 лимфоцита тј. Т помагачких лимфоцита. По дејству цитокина, дијелимо их на: проинфламаторне цитокине, антиинфламаторне цитокине, антивирусне цитокине, цитокине активаторе фагоцита, цитокине активаторе Т и В лимфоцита, цитокине активаторе еозинофила, хематопоезне цитокине (94).

Интерлеукини (IL): Велика скупина цитокина које луче лимфоцити, а дијелом мононуклеарни фагоцити и неке ткивне ћелије. Главна им је функција регулисање раста и сазријевања ћелија. Сваки цитокин дјелује на одређену скупину циљних ћелија, које имају рецептор за одређени цитокин. С обзиром на ћелије које их луче, разликујемо монокине које луче моноцити/макрофаги (IL-1 α , IL-8, IL-12, IL-18) и лимфокине које луче лимфоцити (IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17). Функције су им многоструке, углавном стимулаторне, али могу бити и супресивне: стимулисање размножавања и диференцијације лимфоцита, активирање лимфоцита, активирање макрофага и NK ћелија, стимулисање експресије антигена МНС-I и МНС-II, стимулисање адхезије леукоцита, али и заустављање лучења цитокина (94) Углавном се класификују у двије групе: Тип-1 (про-инфламацијски) цитокини: IL-1, IL-2, IL-3, IL-12, TNF- α , IFN- γ . Ови цитокини учествују у стимулацији вирус-специфичних цитотоксичких Т лимфоцита и следственој елиминацији вирусне инфекције; Тип-2 цитокини: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 који стимулишу активацију и диференцијацију В лимфоцита. IL-1 синтетишу макрофаги, ендотелне ћелије и неке епителне ћелије, а мултифункционални проинфламаторни је цитокин који

се синтетише међу првима. IL-1 породицу сачињавају IL-1 α , IL-1 β и IL-1 рецепторски антагониста (IL-1Ra/IL-1RN) (94). IL-4 синтетишу Th-2 лимфоцити и мастоцити. Он дјелује антагонистички на различите IFN-стимулисане функције на Th-1 диференцијацију (95). IL-6 синтетишу макрофаги, ендотелне ћелије. Дјелује и као проинфламаторни и као анти-инфламаторни цитокин и игра кључну улогу у промовисању раста ћелија и у анти-апоптоцидним активностима (96). IL-32 у хепатоцитима је повезан са упалом и фиброзом јетре код HCV инфекције, док IL-33 припада субпопулацији IL-1 и дјелује тако што поспјешује лучење цитокина из Th-2 популације и тако смањује проинфламаторне цитокине (97).

Интерферони (IFN): Интерферони су скупина цитокина које луче разне врсте ћелија. Разликују се три скупине интерферона (слика 8): (i) IFN- α : луче га неутрофили, Т и В лимфоцити и макрофаги; IFN- β : луче га фибробласти и макрофаги; IFN- γ : луче га активирани Т лимфоцити и NK ћелије.



Слика 8: Групе интерферона и њихово дејство

1. Преузето од Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Seventh edition, Elsevier 2012;225-243.

Осим од раније познатог антивирусног дјеловања, интерферони имају бријне имунорегулаторне функције, нпр.могу заустављати синтезу антителијела и пролиферацију Т и В лимфоцита, али могу имати и имуностимулаторне ефекте попут активирања Тс лимфоцита и НК ћелија. Могу заустављати размножавање здравих и туморских ћелија. IFN- γ има мултифункционалну улогу и искључиво га производе Т лимфоцити, APC и НК ћелије. Он појачава ћелијски одговор стимулишући експресију МНС II и костимулатора В7 на макрофагима и дендритским ћелијаматј. Снажан активатор макрофага. Уриче на стимулацију синтезе неких класа антителијела а има и антивирусно дејство. Активирање интерферонског пута је добро познат урођени имунски одговор на HCV инфекцију, а недавне студије су разјасниле и његову улогу у анти-туморској имуности (98).

Од осталих цитокина треба споменути факторе туморске некрозе (“tumor necrosis factor”, TNF), важан у регулацији упале и цитотоксичном дјеловању имуноцита. TNF- α луче макрофаги и НК ћелије а TNF- β Т лимфоцити. Обје врсте TNF могу дјеловати и антитуморски. TNF је снажан плеиотропни цитокин, који је проинфламаторни и имуномодулаторни цитокин. TGF- β 1 из породице полипротеина фактора раста, а који дјелује као снажан инхибитор раста код зарастања рана и и процеса диференцијације. Он врши инхибицију активације Т лимфоцита и диференцијацију Т-reg лимфоцита (94). Нуклеарни фактор капа-В (NF-kB) пут је умјешан у развој HCV посебно током напредовања активираних туморских клонова (99), иако постоје и супротна мишљења око његове улоге у хепатокарциногенези (100).

Једном када доспије у хепатоцит HCV користи различите механизме за промјене антигена и избјегава имунски одговор домаћина, стога стимулишући развој хроничне инфекције у јетри (101). Интеракције HCV гликопротеина с липопротеинима високе густине (HDL) и рецептора чистача В1 (SCARB1) учествују у уносу HCV у ћелију, и тако штите вирус од неутралишућих антителијела (76). Специфични гликан на Е2 модификује улазак у ћелију и даје заштиту од антителијела (102, 103) и конформационе промјене могу спријечити везивање неутралишућих антителијела (104). Такође се сматра да HVR-1 омета вирусни CD81 рецептор везивања и конзервиране епитопе за неутрализацију (105). Недавна истраживања су показала да директним трансфером вируса из ћелије у ћелију омогућује HCV да избегне неутрализацију антителијелима (106-108).

Вирус С хепатитиса користи неколико стратегија да избјегне целуларни имунски одговор домаћина: висока стопа репликације HCV-а може надмашити антивирусни капацитет имунског одговора; студије сугеришу и да CD8⁺ Т лимфоцити постају 'анергични' и неспособни да произведу IFN током врхунца виремије; HCV индукује апоптозу вирус-специфичних цитотоксичних Т лимфоцита посредством CD95 (Fas) (109). Иако је HCV осјетљив на интерферон *in vitro*, новије студије су показале да HCV може интерферирати с његовом антивирусном активношћу. HCV може да супримира интрацелуларну продукцију овог цитокина због инхибиторног учинка појединих неструктурних протеина HCV (NS3-NS4A, NS5A) (110, 111). Такође је доказан инхибиторни учинак гликопротеина HCV на NK ћелије (112). Везивањем за површину NK ћелија, гликопротеини ихибирају њихову активацију, секрецију цитокина и цитотоксичку активност. Неки HCV протеини показују имуномодулаторски учинак (81, 82). Опажено је да протеин капсида (С) дјелује на диференцијацију Т лимфоцита и њихову функцију. Протеин С се веже за рецепторе за комплемент на површини макрофага и Т лимфоцита што смањује продукцију IL-2 и пролиферацију Т лимфоцита (88). HCV може ометати обраду и презентацију антигена на хепатоцитима и тако смањити њихову видљивост за имунски систем (113, 114). Према неким студијама, превладавање цитокина типа 2 у хроничном хепатитису доприноси перзистенцији вируса због инхибиције пролиферације Т лимфоцита, експресије рецептора за IL-2 (IL-2R), експресије гена главног комплекса ткивне подударности и смањеног капацитета моноцита за презентацију антигена (115, 116).

Иако је ћелијски имунски одговор домаћина прилично неефикасан у хроничној фази инфекције С хепатитиса ипак баланс, HCV-специфичних CD4⁺ и CD8⁺ Th1, Th17 и NK ћелија које инфилтришу јетру одређује исход, односно развој фиброзе и цирозе (109). Резултати студија које су испитивале концентрације Th1 и Th2 цитокина у HCV инфекцији су опречни. Неки су аутори нашли повећан Th2 одговор у болесника са хроничним С хепатитисом, док су други нашли смањен број Th2 лимфоцита и повећану продукцију Th1 цитокина (114-117).

1.3. HCV ИНФЕКЦИЈА КОД БОЛЕСНИКА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕСТИ БУБРЕГА

Иако постоје разлике у учесталости и преваленцији у зависности од државе, скорашње студије су означиле терминалну болест бубрега (енгл. *End Stage Renal*

Disease, ESRD) као 18-ти фактор смрти (118). Раније студије су потврдиле значај дијабетес мелитуса и пушења као главних фактора ризика за развој ESRD-а (119). ESRD се дефинише као смањена гломеруларна филтрација и албуминурија и дијели се на пет фаза на основу концентрацијаа екскреције протеина у урину и функције бубрега (120). Један је од најважнијих узрока кардиоваскуларних обољења, смањеног квалитета живота и морталитета (121). Инфекција са HCV може да буде, али чешће није разлог постојања хроничне болести бубрега. Болесници са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом углавном имају хронични хепатитис С (66). Хронична HCV инфекција лоше утиче на квалитет живота, скраћује животни вијек, фаворизује одбацивање трансплантата бубрега, и повећава смртност од кардио васкуларног обољења болесника који пате од хроничних болести бубрега (122-124). Код оболелих од ESRD постоји и велики број других важних аспеката HCV инфекције, укључујући и лажно-негативне серолошке тестове и биохемијске параметре у границама нормалног упркос виремији. Међутим, и поред тога, може настати прогресивно обољење јетре, а то је посебно ризично за болесника који је прималац бубрежног трансплантата (125). Иницијална виремична фаза је повезана са повећањем активности аланин трансминазе (ALT) (до 74 IU/L) и претходи јој анти- HCV сероконверзија коју прате перзистентна виремија, нормализовање ALT активности и дуготрајан анти HCV имунски одговор. Стога, једини показатељ акутне HCV инфекције код ESRD болесника може бити благи и иначе необјашњив пораст концентрације ALT-е (126).

1.3.1. Фактори ризика за настанак HCV инфекције код болесника на хемодијализи

Болесници са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом, који су на хемодијализи, представљају ризичну групу за HCV инфекцију, због инвазивних медицинских процедура којима су изложени (127). Иако је данас ризик од нозокомијалне HCV трансмисије сведен на минимум због употребе одвојених дијализних машина за болеснике који имају HCV инфекцију и ХД болеснике и даље постоји могућност стицања ове инфекције на одјељењима за хемодијализу (128, 129).

Фактори ризика за настанак HCV инфекције код болесника на хемодијализи укључују број трансфузија крви, трајање хемодијализе, начин дијализирања,

преваленција HCV инфекције у дијализној јединици, претходна трансплантација органа, кориштење интравенских опијата, мушки пол, старија животна доб и болнички пренос HCV у хемодијализној јединици који може настати због грешака у стандардној пракси контроле инфекције, физичке близине зараженог болесника, cross-инфекције путем апарата за дијализу, прекинут интегритет мембране дијализатора или обрада дијализатора (130). Давање лијекова (хепарин) и неадекватно прање руку особља прије, и мање често, након активности укључује ризик од контаминације и вазни су узроци ширења HCV-а у ХД јединицама (131). Тако су Окуда и сар. у свом раду описали значајну улогу медицинског особља у трансмисији HCV инфекције у болничким условима. Они описују да немијењање рукавица приликом извлачења игле за приступ дијализи између болесника на ХД са HCV инфекцијом и оних без ње представља висок ризик за настанак нозокомијалне инфекције на одјељењима за хемодијализу. Након едуковања чланова особља и примјене љепљиве подлоге у вријеме извлачења игала, ниједан додатни случај акутног HCV-а није откривен у периоду од више од годину дана код 730 болесника на хроничној ХД (4, 125, 132). Филогенетска анализа HCV изолата имплицира да су многе HCV инфекције током хемодијализе сигурно резултат болничких преноса болесник-болесник (133,134). Ризик од инфекције обично расте са преваленцијом HCV, а број и дужина изложености хемодијализи у одговарајућим ХД јединицама (5, 122, 135, 136). У протекле двије деценије, осјетљивост и специфичност лабораторијских тестова за детекцију HCV је значајно побољшана, што је омогућило још строжији скрининг давалаца крви и значајан пад нових HCV инфекција (124, 133, 137). С друге стране, доступност еритропоетина је смањила потребу за трансфузијом крви код болесника на хемодијализи. У складу са тим, ризик од HCV инфекције путем трансфузије крви код ових болесника је значајно смањена у многим земљама (4, 133). Важно је напоменути да је HCV инфекција независни предиктор mortalитета код болесника на хемодијализи (138).

1.4. ИМУНОСТ БОЛЕСНИКА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕСТИ БУБРЕГА

Током последњих 20 година, многе студије су се фокусирале на дисфункцију имунског система код болесника са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (139). Показано је да су и целуларна и хуморална имуност измјењене код ових болесника (139, 140).

ESRD прати инфламација и погоршана функција имунског система (141).

Имуносупресија је једна од многих последица хроничне бубрежне инсуфицијенције (142). Функција Fc- γ рецептора на моноцит/макрофагима је смањена код оболелих од терминалне бубрежне инсуфицијенције, и ова измјена функције макрофага доприноси генералној имуносупресији (143). Оштећење функције Т лимфоцита у ХД болесника праћено је неадекватним лучењем цитокина и одговорно је за дефектан имунски одговор (144, 145). Ти цитокини заједно са цитокинима који су створени због биоинкопатибилне мембране или контаминаната присутних у дијализату, узрокују синтезу и ослобађање протеина акутне фазе нпр. CRP, серумскг амилоида А и фибриногена. Клиничка стања повезана с лучењем и ослобађањем цитокина укључују амилоидозу, малнутрицију и атерогенезу (146-148). Смањена експресија активационог рецептора NKG2D на НК ћелијама и повећана синтеза његовог лиганда MICA детектовани су код оболелих од терминалне бубрежне инсуфицијенције и објашњавају смањену активност НК ћелија као дио системске имунодефицијенције регистроване код ових болесника (142). Ове абнормалности не могу се кориговати хемодијализом. Измјењена стечена имуност (ослабљен имунски одговор на патогене и на вакцинацију) карактеристична је за оболеле од терминалне бубрежне инсуфицијенције (149). Неки од ових дефеката су вјероватно последица дејства такозваних „уремичних токсина“ (150, 151) у које спада велики број молекула као што су β 2-микроглобулин и реактивни кисеонични радикали (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (142).

Повећана концентрација проинфламацијских цитокина у серуму је једна од типичних карактеристика уремије, вероватна је последица њихове акумулације услед смањене елиминације и/или повећане индукције уремијским токсинима, волумнског оптерећења, оксидативног стреса, коморбидитета (152, 153). Упркос несумњивом повећању проинфламацијских цитокина у циркулацији уремија је повезана са имуносупресијом због утицаја уремијског миљеа и разних поремећаја који се дешавају на имуносним ћелијама. Значајно је повећана експресија лектина кои везује манозу код ESRD (154). Са друге стране код ESRD болесника инфицираних HCV бележи се ниска, а не висока експресија овог лектина и повезна је са повећаном смртношћу (155). Осим тога показано је повећање експресије макрофагних ендоцитозних рецептора на макрофагама: SR-A (енг. *Scavenger Receptor A*, SR-A) и CD36 код ESRD болесника (156-158). Ово би могло бити последица запаљенских процеса и/или оксидативног стреса (158, 159). *In vitro* тестови показују да је синтеза цитокина код болесника са уремијом нормална (160). Контакт крви с мембраном дијализатора: брзо продубљује

леукопенију, активира комплемент те настаје и биолошки активна компонента C5a, оштећује функцију периферних мононуклеарних ћелија (PBMС), неутрофила и моноцита, и из њих ослобађа проинфламацијске цитокине. ESRD индукује генерализовану хиперцитокинемију укључујући појачану продукцију анти-инфламацијских цитокина, као што је IL-10 (153), као и про-инфламацијских цитокина као што су TNF (153), IL-6 (161, 162) и IL-1 α , (163, 164). Описано је и повећање концентрације солубилног рецептора IL-2 (sIL-2R) у крви болесника на хемодијализи (144, 145). Такође и ослабљена смањена филтрација повећава концентрације цитокина у циркулацији ESRD болесника, а тзв. интерлеукинска хипотеза постављена још 1983. године, предпоставља да је повећање IL-1 последица хипотензивних епизода код ESRD болесника (161). Т лимфоците болесника са ESRD карактерише смањен пролиферативни одговор на митогене *in vitro* (165, 166). Равнотежа између Th1 и Th2 се сматра важном у напредовању атеросклеротских лезија код ESRD болесника (153). Th1 лимфоцити активирају макрофаге и неутрофиле, док су Th2 лимфоцити укључени у промовисање хуморалне имуности. Код болесника на перитонеалној дијализи, смањена је активација Th лимфоцита како у односу на контроле, тако и у односу на хемодијализне болеснике. У ESRD болесника ипак превађава Th1 одговор. Код тих болесника опажен је висок проценат моноцита који луче IL-12 кључни цитокин који опредељује имунски одговор у Th1 правцу. С друге стране постоји и хиперпродукција имunosупресивних цитокина. Код ESRD болесника се бележи и неравнотежа између проинфламацијских цитокина (IL-1- β , TNF, IL-6) и њихових инхибитора. Познато је и да стварање цитокина зависи и од типа мембране дијализатора, па је тако код болесника дијализираних на Хемофан и Купрофан мембранама запажено повећање концентрација TNF- α , IL-1 и IL-6 (166-168). Измјењена функција Т лимфоцита, код ESRD болесника, може се приписати и поремећају функција TLR (149), јер активација Т лимфоцита зависи у великој мјери од функционисања ових рецептора исказаних на ћелијама урођене имуности. ESRD, а посебно код пацијената на дијализи, је повезана и са смањењем броја В лимфоцита. Предпоставља се да је један од главних узорака овог поремећаја повећана осетљивост В лимфоцита на апоптозу (169). Међутим, доказано је да су концентрације IgG, IgM и IgA у серуму нормалне код болесника на дијализи (149). Болесници на хемодијализи често пате од поновљених бактеријских инфекција, имају слаб одговор на вакцину против В хепатитиса и чешће развијају туморе у односу на општу популацију (170).

1.5. ИМУНСКИ ОДГОВОР НА НСВ КОД БОЛЕСНИКА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕШЋУ БУБРЕГА

Иако фактори који „штите“ уремичне болеснике од оштећења јетре имунским механизмима нису добро познати, постоје неке занимљиве теорије о овом парадоксу. Чини се да је овај дефектни имунски одговор мултифакторијалан. Иmunска дефицијенција се осликава смањеном функцијом фагоцита и антиген-презентујућих ћелија, као и ослабљеним хуморалним и ћелијским имунским одговором услед „потрошње“ В лимфоцита и наивних и меморијских CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита (171). Описана је смањена експресији костимулатора В7-2 (CD86), што води смањеној пролиферацији и активацији Т лимфоцита (168). Уочене су алтерације субпопулација В лимфоцита са неравнотежом између незрелих и меморијских В лимфоцита, а такође и смањење експресије и сигнализације преко BAFF рецептора и следственог смањења диференцијације и преживљавања ових ћелија (172, 173).

Галектини су мултифункционални лектин који везују β-галактозид и исказани су на различитим ћелијама имунског система (174) попут епителних ћелија, ендотелних ћелија, леукоцита, итд (175). До данас је код сисара идентификовано 15 чланова галектинске фамилије протеина (176). Сваки члан садржи један или два CRD, а галектин-3 (gal-3) је јединствен по томе што садржи један CRD у С-терминалном домену прикључен на N-терминални домен који се састоји од пар кратких понављајућих домена богатих пролином. Галектини играју важну улогу у имунском одговору и прогресији тумора и другим физиолошким и патолошким процесима (177-180).

Различите позиције галектина-3 (у једру, цитоплазми или на површини ћелије) омогућавају његову интеракцију са екстраћелијским и интраћелијским лигандима, што објашњава мултифункционалну улогу овог молекула (181, 182). Галектин 3 учествује у неколико биолошких процеса, укључујући пролиферацију ћелија, диференцијацију и апоптозу, а такође игра битну улогу у регулисању имунског одговора домаћина код инфламације, инфекције и тумора (175, 182, 183). Показано је да ендогени галектин-3 инхибира апоптозу (184, 185), посредник је стимулације продукције и секреције цитокина у мастоцитима (186, 187), стимулише фагоцитозу макрофага и алтернативну активацију ових ћелија (188). Ипак није до краја јасно који су то све механизми којима ендогени Gal-3 обавља ове функције. Галектин-3 се експримира и на CD4⁺ и CD8⁺ Т

лимфоцитима након што се они активирају анти-CD3 антителима или митогенима (189). Доказано је да галектин-3 секретован егзогено индукује продукцију IL-2 у Jurkat ћелијама (185) и узрокује апоптозу у активираним Т лимфоцитима (190, 191). Ендогени галектин-3, међутим, инхибира апоптозу у Jurkat ћелијама (192). Активација Т лимфоцита путем TCR зависи од ангажовања многих рецептора и сигналних молекула у контакт подручју које се формира између Т лимфоцита и антиген-презентујућих ћелија што је означено као имунска синапса (енг. *Immunological Synapse*, IS) (193). Сигнализација Т-ћелијских рецептора и IS подразумева континуирано формирање TCR микрокластера који регрутују сигналне молекуле (194, 195). Ови микрокластери се брзо сједињују и формирају супрамолекулске активационе кластере (енг. *Supramolecular Activation Clusters*, SMAC) (196, 197). Централну зону овог кластера (сSMAC) чине, на страни Т лимфоцита, TCR/CD3. Ову зону окружују; периферна зона (рSMAC) обиљеженом антигеном повезаним са функцијом лимфоцита (LFA-1) и дистална зона (dSMAC) (198). Тренутни модели показују да сSMAC може да или деградира или костимулише TCR, рSMAC учествује у везивању и транспорту TCR микрокластера, и dSMAC учествује у формирању TCR и LFA-1 микрокластера (199, 200). Показано је да CD4⁺ Т лимфоцити gal-3^{-/-} мишева више IFN- γ и IL-4 него gal3^{+/+} ћелије. Галектин-3 се регрутује са цитоплазматске стране IS у CD4⁺ ћелије након ангажовања TCR и примарно је локализован у рSMAC. Истраживања су показала да овако везани галектин-3 дестабилизује IS. Такође, постоје налази који указују да галектин-3 спречава активацију раних догађаја у трансдукцији сигнала и фацилитира низводну сигнализацију са TCR-а. Откривено је и да је galt-3 повезан са компонентом ендозомалног разврставања комплекса потребних за транспорт (енг. *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT), за коју се зна да регулише експресију одређених рецептора на површини ћелије (186).

Раније студије откриле су значај Gal-3 као потенцијалног маркера за различита обољења јетре. Показано је да су системске концентрације Gal-3 знатно смањене код болесника са хроничном HCV инфекцијом (201). Такође је показано да постоји снажна корелација између повећаних системских концентрација галектина-3 и реналне дисфункције као и високог ризика за развој хроничног обољења бубрега (202). Па ипак, улога галектина-3 у биологији ESRD болесника заражених HCV вирусом још увијек остаје нејасна.

Овај статус „редукованог имунонадзора“, а не очите „имуносупресије“ има анти-инфламатцијски, заштитни ефекат код болесника на дијализи са хроничном HCV инфекцијом. Треба узети у обзир и ниску виремију код ових болесника као фактор слабог имунског одговора.

1.6. Дијагностика хепатитиса С код болесника са хроничним обољењем бубрега на хемодијализи

Смјернице KDIGO (енгл. Kidney Disease: Improving Global Outcomes) за С хепатитис, из 2009. Године, препоручују да се болесници на хемодијализи тестирају на HCV када започну хемодијализу или када се пребаце из друге установе за хемодијализу. Нарочито би се требали тестирати, евалуирати и, ако је неопходно, лијечити од С хепатитиса болесници на дијализи који су кандидати за трансплантацију бубрега прије неголи доспију на листу чекања (203). Према овим смјерницама разумно је обављати почетно тестирање на С хепатитис код ХД болесника EIA-ом (енг. Enzyme immunoassay) треће генерације, док је употреба рекомбинантног 'immunoblotting' теста (RIBA), као потврдног теста у случају позитивног EIA, углавном замјенили NAT (енг. Nucleic acid test) Са друге стране, непознат, али знатан број болесника на дијализи, биће негативан на анти HCV антитијела, док ће имати детектабилну HCV нуклеинску киселину. Нема сумње да је детекција HCV-RНК уз помоћ RT-PCR најсензитивнији и најспецифичнији тест за детекцију HCV-а. Узимајући у обзир број лажно негативних резултата и високу преваленцу вируса код болесника на дијализи, референтни тест за почетно тестирање је NAT, али је коначна одлука избор сваке јединице за дијализу и зависи од преваленције HCV инфекције и расположивих ресурса одређене земље. Код иницијално анти HCV негативних ХД болесника, ретестирање са EIA-ом би требало узети у обзир сваких 6-12 мјесеци. Ретестирање NAT-ом је препоручљиво код болесника са необјашњивим повећањем концентрација аминотрансферазе, ако се сумња на епидемију HCV-а у ХД јединици, код болесника на листи чекања за трансплантацију и за праћење терапије код оних који се лијече.

Према KDIGO смјерницама, једина јасно дефинисана подгрупа ХД болесника код којих се препоручује основна биопсија јетре јесте подгрупа кандидата за трансплантацију бубрега (204). Објашњење је то што знатан проценат кандидата за трансплантацију (до 25%) може имати субклиничко, пре-циротично обољење које искључује трансплантацију бубрега. Штавише, кандидати за трансплантацију са

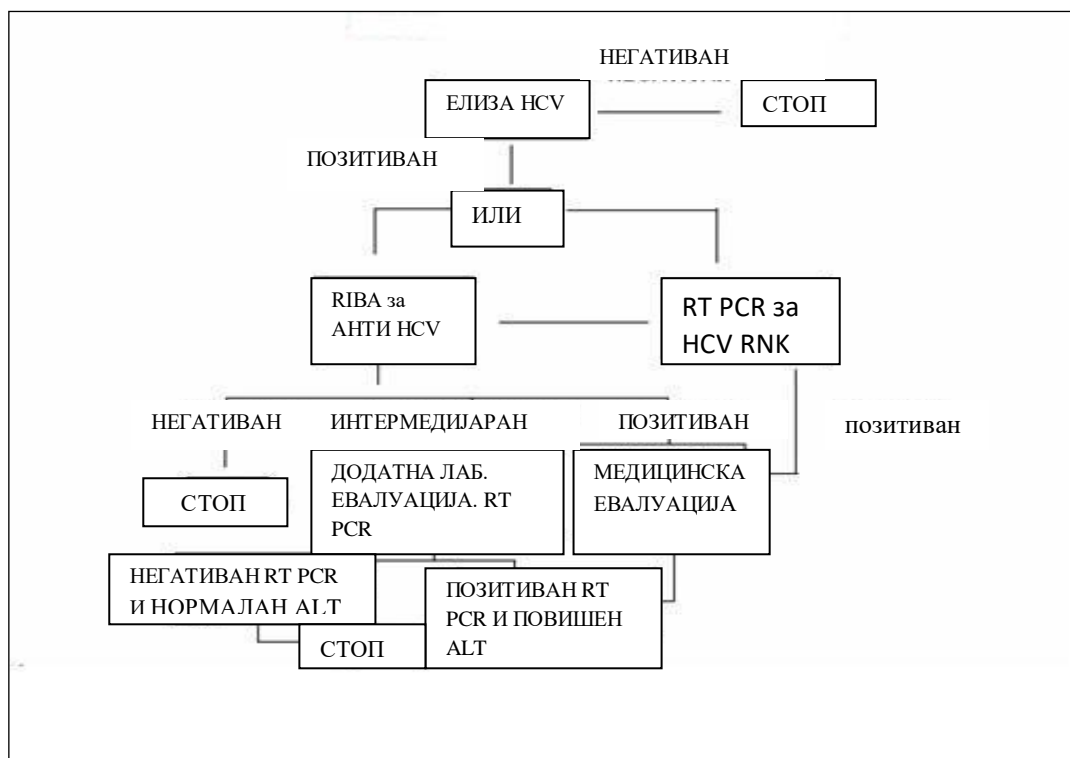
перзистентном виремијом трабало би се лијечити ради постизања одрживог вирусног одговора или барем ниског вирусног оптерећења прије трансплантације. У оквиру овог контекста биопсија јетре може усмјерити терапију и одредити прогнозу. Поред биопсије јетре, користе се и нове, неинвазивне технике за потврду хепатичне фиброзе. Пролазна еластографија (Фиброскан) евалуира степен фиброзе мјерењем ригидности јетре. Користи се код неуремичних болесника са хроничним хепатитисом С до сада је дала добре резултате. Други неинвазивни метод је (енг. AST to Platelet Ratio Index, APRI). Код ХД болесника, упркос обећавајућим резултатима забиљеженим у једној студији, ТЕ се мора потврдити у већим групама, док је APRI показао ниску дијагностичку прецизност. Стога, биопсија јетре остаје златни стандард у евалуацији СНС-а и, упркос забринутости у вези са већим ризиком од крварења услед уремичне дисфункције, показало се да се може безбједно обављати и код ХД болесника.

1.7. Алгоритми у дијагностици HCV инфекције

Код болесника са клиничким и биохемијским параметрима акутног С хепатитиса негативан ELISA тест у вријеме појаве симптома болести не искључује акутну инфекцију због касне сероконверзије.

Болеснике са негативном ELISA-ом треба пратити у наредних 6 мјесеци или тестирати на присуство вирусног RNA генома RT-PCR методом. Болеснике са позитивним ELISA тестом треба тестирати потврдним имуноблот тестом. Код болесника код којих анти HCV антитијела перзистирају дуже од годину дана неопходна је PCR метода да би се разграничила хронична активна од претходне инфекције која се завршила елиминацијом вируса. Осим тога RT-PCR метода је неопходна у дијагностици HCV инфекције новорођенчади анти HCV позитивних мајки и у праћењу ефикасности терапије С хепатитиса. Одговарајући алгоритми се користе у оваквим случајевима (шема 1).

Шема 1. Алгоритам у дијагностици HCV инфекције



1.8. Терапија HCV инфекције и мониторинг терапијског успеха

Лијечење акутног и хроничног С хепатитиса укључује и супституциону и симптоматску терапију. Специфична терапија у првом реду представља терапија интерферонима. Рибавирин у комбинацији са Интерфероном је давао најбоље резултате у лијечењу хроничног вирусног С хепатитиса.

Златни стандард у лијечењу хроничне HCV инфекције је пегиловани интерферон $\alpha 2a$ 180 μ g недељно и рибавирин 800-1200mg на дан подијељено у 2 до 3 дозе у трајању 24 до 48 недеља зависно од генотипа (205, 206). IFN је специфичан за ћелију која га је произвела а не за вирус који је индуковао његову синтезу тако да IFN може да штити ћелије исте биолошке врсте од дејства било ког вируса. Више од 50 молекула IFN по ћелији успоставља антивирусно стање (11, 46).

Имунорегулаторна активност се остварује на неколико начина:

- Активирањем макрофага
- Повећањем цитотоксичне активности T Ly

- Појачањем активности НК ћелија
- Промјенама у мембранама ћелија имунског система
- Повећањем експресије молекула МНС I (major histocompatibility complex) и МНС II класе
- Повећањем броја рецептора за Fc фрагмент имуноглобулина
- Улогом у регулацији антигенске презентације

Рибавирин је синтетски аналог гуанозина и активан је према RNA вирусима. Рибавирин је синтетски триазол који има антивирусни ефекат као трифосфат. Не уграђује се у структуру RNA или DNA током њихове синтезе. Има сложено и вишеструко дјеловање. Омета транскрипцију и посттранскрипциону обраду вирусне RNA као и функцију саме RNA полимеразе (11, 46). Фактори који утичу на ефикасност терапије су генотип вируса, количина вируса у крви, раса, старост, мушки пол, BMI већи од 30 kg/m², злоупотреба алкохола, коинфекција са HBV, екстрахепатичне манифестације, стеатоза, одмакла цироза > F2, доза, придржавање и подношење терапије, трајање терапије. Генотип је најважнији предиктор терапијског одговора (205, 207, 208). Оболели са трансплантираним бубрегом и HCV инфекцијом треба да буду третирани антивирусном терапијом, у чему се слажу сви објављени водичи (табела 1).

Стадиј СКС	IFN ^a	Рбавирин	Нуспојаве
1 i 2	PG-IFN alfa-2a: 180µg sc. 1x седмично PG-IFN alfa-2b: 1,5 µg/kg sc. 1x седмично	800-1200 mg на дан у двије подјелезне дозе	IFN: главобоља, грип, депресија Рибавирин: погоршана анемија због хемоллизе
3 i 4	PG-IFN alfa-2a: 135 µg sc. 1x седмично PG-IFN alfa-2b: 1 µg/kg sc. 1x седмично	Стадиј 3: 400-800 mg на дан у двијеподјелезне дозе Није препоручено код eGFR<50 ml/min/ 1,73 m ²	IFN: исто као изнад Рибавирин може узроковати хемолитичку анемију и његова употреба мора бити подржана са повећањем еритропоетина по потреби
5	PG-IFN alfa-2a: 135µg sc. 1x седмично PG-IFN alfa-2b: 1 µg/kg sc. 1x седмично	Није препоручено	IFN: исто као горе

5D	Alfa-2a IFN: 3mU sc. 3x седмично Alfa-2b IFN: 3 mU sc. 3x седмично	Није препоручено	IFN: исто као горе
5T 1-5	Није препоручено изузев код третирања холестетичког хепатитиса или васкулитиса опасног по живот	Није препоручено	Коришћење IFN је повезано са одбацавањем и затајењем алографта

Табела 1: Терапијски протоколи биолошке антивирусне терапије код болесника с HBV и HCV.

eGFR- Калкулисана гломеруларна филтрација; IFN-интерферон; sc. субкутано; а) Оболели са генотипом 1 и 4 HCV требају примати терапију 48 недеља, ако се „позитивни терапијски одговор“ постигне за 12 седмица (цијењено као $>2\log$ смањења титра вируса-мјерено као NAT); Генотипови 2 и 3 третирају се 24 недеље; б) Видјети у тексту и одговарајућој табели дозе Рибавирина прилагођене минутној гломеруларној филтрацији. Оболели с генотипом HCV 2 и 3 треба да примају 800 mg Рибавирина дневно код стадија 1 и 2 ХБИ. Оболели с генотипом 1 и 4 и стадијем 1 и 2 ESRD треба да примају 1000-1200 mg Рибавирина дневно .

Ефекат препоручених терапијских протокола (PG-INF и рибавирин) је доста ограничен, а у контролисаним клиничким студијама креће се до око 60% у општој популацији, док су подаци о учинку ове терапије код хроничне хроничне болести бубрега и дијализних болесника лимитиране употребљивости. Као друго, ова терапија је врло скупа, па је *cost-benefit* разматран увијек за сваки појединачни случај. Потребно је узети у обзир опште стање оболелог, степен инсуфицијенције бубрежне функције, патохистолошко и функционално стање јетре (које се према садашњој методологији може доста успјешно квантификовати, тј. присуство знакова активног хепатитиса, степен фиброзе ткива јетре, INR и истало). Одлука о томе да ли третирати HCV инфекцију код ХББ треба да се базира на тренутном стању хистологије јетре, животной доби болесника, коморбидитетима, као и нежељеним ефектима терапије. Према ревидираним смјерницама *National Institut of Health (NIH, USA)* из 2002 године, које су оригинално урађене 1997. године стоји да биопсија јетре није неопходна за почетак третмана. Прецизније, биопсија је неопходна ако се PCR реакцијом утврди да се ради о генотиповима 1 и 4 (од укупно 7 познатих генотипова HCV). Ако се ради о генотиповима 2 и 3, код којих је „позитивни терапијски одговор“, биопсија није неопходна.

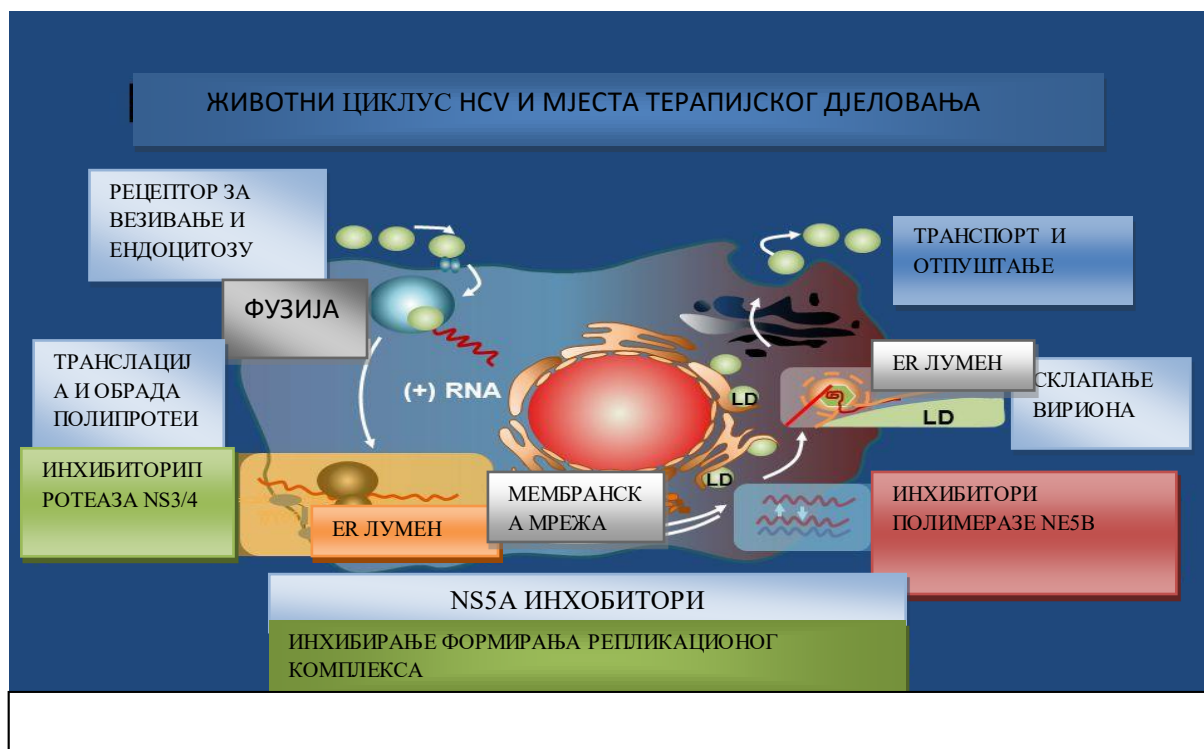
Код пацијената са обољењем бубрега завршне фазе, иако је дуготрајан стабилан вирусолошки одговор (SVR) знатно бољи него код неуремичних болесника, све опције

лијечења асоциране су са повећаном токсичношћу. Са друге стране, имајући у виду појачану токсичност повезану са третманом, високим коморбидитетом и стопом прогресије обољења јетре, не постоји образложење за лијечење свих ХД болесника са HCV виремијом. Према KDIGO смјерницама, ERBP радна група сматра да „лијечење треба узети у обзир код млађих болесника без већих коморбидитета“ и да „одлука о лијечењу мора бити донесена у договору са оболелима, нарочито ако су заражени генотипом 1“. Такође указују на „покушај елиминисања HCV-а код кандидата за трансплантацију прикладним третманом“. У последњих неколико година дошло је до наглог развоја нових доктрина у терапији HCV инфекције, који се прије свега односе на превазилажење употребе пегилованог α IFN из HCV терапијског протокола у комбинацији са рибавирином или тзв. трипл терапије са још два антивиrotика bosprevirom и teleprevirom, прва генерација нових инхибитора вирусне протеазе, тј. директно дјелујућих анти HCV лијекова (engl. direct acting antivirals DAA), због брзог развоја резистенције на лијек, су дали добре резултате код ХД болесника.

Међутим, анемија је важна нуспојава код DAA терапије чак и код болесника са нормалном гломеруларном филтрацијом. Потпуно познавање животног циклуса HCV а посебно кристалне структуре релевантних вирусних протеина је омогућило развој новијих генерација DAA, чији је главни циљ обезбеђивање дуготрајног SVR. Данас постоје три групе ових лијекова. Прва група је усмјерена против вирусне протеазе NS3/4A (инхибитори протеазе; називи лијекова се завршавају на –преви), други против вирусне RNA-зависне RNA-полимеразе NS5B (полимеразни инхибитори, називи им се завршавају на –бовир) и трећа група DDA усмјерени су против вирусних протеина који учествује у формирању репликационог комплекса NS5A (NS5A инхибитори, и завршавају се суфиксом –асвир) (209) (слика 9). Sofosbuvir (SOF) је инхибитор NS5B-полимеразе. Као аналог нуклеотида узрокује престанак репликације ланца. У SOF има пан-генотипске ефикасности и висока отпорност баријера. Узима се једном дневно са добром подношљивошћу. Нема унакрсних реакција са другим супстанцама (210). Због елиминације SOF-а преко бубрега он се може дати само оболелима са гломеруларном филтрацијом изнад 30 ml/мин по 1.73 m². Болесници са тешким оштећењем бубрега (гломеруларне филтрације <30 ml/мин по 1.73 m²) или хроничним обољењем бубрега који су на дијализи стога захтјевају други антивирусни режим (211). Симепревивир има клинички релевантне антивирусне ефекте против генотипова 4 и 6. Слично боцепревиру узима се само једном дневно. Нежељени ефекти се састоје углавном од

лезија на кожи са или без свраба, мучнина и диспнеја. Симепревивр је неуспјешан у лијечењу инфицираних генотипом 1a (212). Daclatasvir (DCV) је NS5A-инхибитор који има високу антивирусну активност против генотипова 1-4 *in vivo* и *in vitro* и против генотипова 5 и 6. (213). Ledipasvir (LDV) представља још један NS5A-инхибитор са антивирусном активношћу посебно против генотипа 1 и дјелимично против других генотипова, као што су 4, 5 и 6. LDV је доступан само у комбинацији фикс дозу са SOF (214).

Дакле Sofosbuvir и Simeprevir се не препоручују за оболеле са хроничним обољењем бубрега или болесницима који захтијевају ХД, а инсуфицијенција бубрега нема утицаја на фармакокинетички профил asunaprevira (215). Потребне су додатне информације и искуства када је у питању ДАА терапија код ових болесника (216)



Слика 9. Мјеста терапијског дјеловања ДАА
(Преузето од Adapted from Manns MP, et al. Nat Rev Drug Discov. 2007;6:991-1000.)

Велики број генотипова и субгенотипова као и варијабилност генома, заједно са slabим разумијевањем патофизиологије хроничне HCV инфекције објашњава садашњу немогућност развијања ефикасне профилактичке вакцине (217).

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај терминалне бубрежне инсуфицијенције на тежину оштећења јетре код HCV инфекције као и на модулацију антивирусног имунског одговора.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

Утврдити учинак терминалне бубрежне инсуфицијенције на:

1. клиничко-биохемијске параметре функције јетре (трансаминазе, γ GT, LDH)
2. виремију
3. концентрације инфламацијских молекула (ST2, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, IL-33, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , галектин-3) у серуму; код оболелих са HCV

ОСНОВНА ХИПОТЕЗА

Пацијенти са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и хепатитис С вирусном инфекцијом имају ниже вредности параметара функције јетре (трансаминазе, гама GT, LDH), већу виремију („viral load“), ниже серумске вредности про-инфламацијских цитокина, а више вредности анти-инфламацијских цитокина у односу на пацијенте са хепатитис С вирусном инфекцијом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је спроведено у Центру за лабораторијску дијагностику службе за микробиологију и биохемију у Универзитетској болници у Фочи, Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у периоду од двије године.

Спровођење студије је одобрио Етички одбор Универзитетске болнице у Фочи и Етички одбор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Студија је одобрена као непрофитна клиничка студија, која се спроводи искључиво у научно истраживачке сврхе. Прије започете студијске процедуре, болесници су потписали образац сагласности за учешће у студији. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (GCP, енгл. Good Clinical Practice).

3.1. ИСПИТИВАНИ УЗОРАК

Рађена је компаративна-експериментална студија током које су се упоређивали тестирани параметри у експерименталној и контролној групи испитаника. У студији је учествовало 100 испитаника, старосне доби од 18-70 год. Сви испитаници укључени у студију подјељени су у четири групе. Прву и другу групу су чинили оболели са терминалном бубрежном болести изабрани унутар 5 одвојених ХД. Свим болесницима у тих 5 ХД јединица у току редовне дијагностичке процедуре урађено је серолошко тестирање на присуство Anti-HCV антитијела, на основу чега су ти болесници и подијељени у двије групе. Прву групу чинили су оболели код којих смо доказали присуство Anti-HCV антитијела и који су дали свој пристанак да даље учествују у студији. Другу групу чинили су оболели којима није доказано присуство Anti-HCV антитијела а који су дали свој пристанак за учешће у студији. Тако да је у коначном истраживању прву групу испитаника чинило 40 болесника са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (на хемодијализи) која је утврђена биохемијским параметрима који су испитивани и хепатитис С вирусном инфекцијом која је утврђена серолошким маркерима и касније и квалитативним RT-PCR-ом. Другу групу чинило је 20 болесника са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (на хемодијализи), која је утврђена биохемијским параметрима. Трећу групу испитаника чинило је 20 болесника са хепатитис С вирусном инфекцијом, утврђеном серолошким маркерима и касније квалитативним RT-PCR-ом а који нису били на дијализи, тј. немају терминалну бубрежну болест, што су и показали биохемијски параметри који су испитивани. Четврта група је контролна, коју чине добровољни даваоци крви Универзитетске болнице у Фочи (n=20). Испитаници из свих испитиваних група су потписали образац за сагласност учешћа у студији.

Све четири испитиване групе задовољавају све укључујуће и ни један искључујући фактор. Општи укључујући критеријум за све групе испитаника су старосна доб изнад 18 година и добровољни пристанак за учешће у студији.

Из студије су у првој и трћој групи били искључени испитаници са хепатитис С вирусном инфекцијом који су претходно користили терапију (кортикостероиде, имunosупресивне лијекове и биолошку терапију), за које је то био искључујући фактор.

3.2. ИСТРАЖИВАЧКИ ПОСТУПАК

Протокол студије подразумева да су у студију укључени сви болесници код којих је HCV инфекција доказана серолошки, налазом анти HCV антитела. Све микробиолошке (серолошке, молекулске) и биохемијске анализе рађене су у Центру за лабораторијску дијагностику одсек за микробиологију и биохемију Универзитетске болнице у Фочи (Република Српска), а имунолошке анализе су урађене у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Свим испитаницима који су на дијализи крв је узимана прије дијализног поступка, из разлога што се процесом дијализе вредности свих до сада испитиваних параметара значајно мијењају и има се другачија слика у односу на стварно стање код ових болесника, а установљено је да хепарин који се користи током дијализе може ометати и саму PCR технику. Осим тога, хемодијализни поступак смањује HCV-RNK концентрацију адсорпцијом HCV-RNK на унутрашње површине дијализатора и уништава вирусне честице хидрауличким притиском (218, 219). Из тог разлога су овакви болесници, патогенеза њихових обољења (са посебним освртом на HCV), као и клиничка слика и даље контроверза.

Свим испитаницима у току нашег истраживачког поступка на дан пријема је узета крв за испитивање биохемијских параметара, за одређивање концентрације цитокина у серуму, присуства и количине анти HCV антитијела, те за молекулску дијагностику HCV (доказивање присуства HCV нуклеинске киселине, количине исте, као и генотипизација HCV).

-Узорци

Свим оболелима у експериманталним и контролној групи, као испитивани материјал коришћена је венска крв добијена периферном венепункцијом на таште (најмање 12-24 сати ноћног гладовања). Узимана је крв из кубиталне вене венепункцијом у више епрувета:

- Двије епрувете без антикоагуланса произвођача BD (Becton Dickinson Company –BD) и то једна са 5 ml крви за одређивање биохемијских параметара: уреа, креатинин, ALT, AST, LDH, GGT, билирубин. Крв је након вађења остављена 30-35 минута на собној температури да би спонтано коагулисала, а затим за издвајање серума центрифугирана 10 мин на 3000 обртаја/мин након чега су

анализе одмах рађене. Друга епрувета са 10 ml крви за серолошка и имунолошка испитивања која је центрифугирана 5 минута на 2000 обртаја/мин, а затим је издвојен серум. Серолошка испитивања на анти-НСV су рађена одмах а остатак серума је аликвотиран чуван на температури од -20°C за имунолошка тестирања до почетка рада. Прије почетка рада сви реагенси и узорци су се одмрзавли на собној температури до потпуног отапања и вортексовали 5-10 секунди.

- Двије епрувете са EDTA (етилен-диамино-тетрасирћетна киселина) антикоагулансом произвођача BD (Becton Dickinson Company –BD) и то једна са 3 ml за одређивање крвне слике према препоруци ICSH (Internacional Council for Standardiyation in Haematology) која је рађена одмах; друга епрувета са 10 ml за молекулску дијагностику која је центрифугирана 10 минута на 2500 обртаја. Слој леукоцита, „buffy coat“ који се издваја између еритроцита на дну и плазме изнад, на даље се користила као узорак за изолацију, детекцију, одређивање виремине („viral load“) и генотипизацију нуклеинске киселине. Издвојено је 800-900 µl и замрзнуто на -80°C до почетка рада. Прије почетка рада сви реагенси и узорци су се одмрзавли на собној температури до потпуног отапања и вортексовали 5-10 секунди.

3.2.1. Лабораторијска дијагностика НCV инфекције

Откривање и надзор над НCV инфекцијом подразумијевају двије стратегије: серолошку, којом се у свакодневном раду најчешће доказује НCV инфекција детекцијом специфичних НCV антитијела, док су за потврду инфекције и утврђивање активности вируса, од посебног значаја молекулски тестови. Дијагноза оболелих заражених НCV спроводи се помоћу двије категорије вирусолошких тестова: индиректни тестови и директни тестови (220). Индиректни серолошки тестови, којима се доказује серолошки специфичан имунски одговор, су најчешће ензим-имунотестови треће генерације који откривају антитијела на НCV. Антигени коришћени у тестовима да открију антитијела су из структурних и не-структурних дијелова НCV-а: capsid, protein, cofactors, polymerase, итд (221). Директни вирусолошки тестови обухватају тестове којима се доказују вирусни антигени и вирусна нуклеинска киселина.

Савремена HCV дијагностика базира се на примјени директних тј. молекуларно биолошких метода као што су квалитативни PCR тестови за доказивање HCV RNK генома, „real time“ PCR за квантификовање HCV генома тј. утврђивање виремије-, „viral load“ као и методе за генотипизацију HCV (7, 206). Као први тестови раде се серолошки тестови којима се детектују антитијела HCV. Уобичајено је да се HCV инфекција дијагностикује налазом HCV антитијела (тестови) најчешће уз обавезну потврду Western blot тестом, RIBA тестом или RT-PCR тестом.

3.2.2. Одређивање биохемијских параметара

Крвна слика: број леукоцита (WBC), број еритроцита (RBC), одређиван је на аутоматском хематолошком анализатору Sysmex KX-N21 за *in vitro* дијагностику у клиничкој хематолошкој лабораторији. Анализатор одређује 17 хематолошких параметара и 3-dif WBC диференцијацију крвних ћелија. Анализатор ради на принципу импенданције и волуметријског бројања крвних ћелија.

Свим испитаницима су урађени и следећи биохемијски параметри: уреа, креатинин, билирубин, лактат-дехидрогеназа (LDH), аспартат-аминотрансфераза (AST), аланин-аминотрансфераза (ALT), гама-глутамилтрансфераза (GGT), коришћењем комерцијалних реагенаса (Abbott, USA) у анализатору Architect с4000, Abbott.

Концентрација креатинина у серуму одређена је по Jaffe-у уз депротеинизацију узорка, која се базира на реакцији креатинина са пикринском киселином у алкалној средини, при чему адицијом креатинина и пикрата у еквимоларном односу настаје црвено једињење познато као Janovsky-ev комплекс. Брзина формирања обојеног једињења пропорционална је концентрацији креатинина. Референтне вредности: мушкарци 53-110 $\mu\text{mol/L}$; жене 44-97 $\mu\text{mol/L}$.

За одрђивање **концентрације урее** у серуму коришћен је ензимски, спектофотометријски кинетички метод. Каталитичким дејством уреазе, уреа се хидролизује до амонијака и угљеник (IV) –оксида. Настали амонијак, у присуству глутамат дехидрогеназе (GLDH), са α -кетоглутаратом и NADH гради глутамат. Брзина

оксидације NADH директно зависи од концентрације урее. Референтна вредности: серум 3.0- 7.8 mmol/L.

Концентрација укупног и директног билирубина у серуму одређена је по методи Malloy-Evelyn-а. Билирубин у овом тесту реагује са диазотовом сулфанилном коселином (диазобензосулфонска киселина која настаје реакцијом натријум нитрита и сулфанилне киселине у присуству HCL) при чему настаје розе-љубичасти азопигмент. Диазобензосулфонска киселина заправо раскида везу између II и III пироловог прстена билирубина па настају два дипирола који затим регују са диазобензосулфонском киселином стварајући азопигмент. Конјуговани (директни) билирубин реагује одмах, док неконјуговани (индиректни) реагује тек након издвајања из везе са албумином. Због тога се у реакциону смјешу, у којој се одређује концентрација цјелокупног билирубина додаје концентровани метил алкохол који таложи бјеланчевине и истовремено раскида везу неконјугованог билирубина и албумина. Концентрација неконјугованог билирубина у серуму добија се тако што се од вредности укупног одузме вриједност конјугованог билирубина. Референтне вредности: директни билирубин 0-3.4 $\mu\text{mol/L}$; укупни билирубин 3.4-17.1 $\mu\text{mol/L}$.

За одређивање **активности аспартат аминотрансферазе (AST)** у серуму коришћен је IFCC кинетички, UV метод. Аспартат аминотрансфераза (AST) катализује реакцију трансминације амино групе са L-аспартата на 2-оксоглутарат, при чему настају L-глутамат и оксалацетат. Оксалацетат се даље, у присуству коензима NADH уз каталитичко дејство MDH, рагује до L-малата. Брзина оксидације NADH је директно пропорционална активности AST. Референтне вредности: мушкарци до 37 U/L 37°; жене до 31 U/L 37°.

За одређивање **активности аланин аминотрансферазе (ALT)** у серуму коришћен је IFCC кинетички, UV метод. Аланин аминотрансфераза(ALT) катализује реакцију трансминације амино групе са аланина на 2-оксоглутарат, при чему настају пируват и ALT–глутамат. Пируват се даље, у присуству коензима NADH и уз каталитичко дејство, редукује до L–лактата. Брзина оксидације NADH је директно пропорционална активности ALT. Референтне вредности: мушкарци до 40 U/L 37°; жене до 31 U/L 37°.

За одређивање **активности лактат дехидрогеназе (LDH)** у серуму коришћен је IFCC кинетички, UV метод. Пируват се, у присуству коензима NADH, уз каталитичко дејство лактат дехидрогеназе (LDH), редукује до лактата. Брзина оксидације NADH је директно пропорционална активности LDH. Референтне вредности: одрасли до 450 U/L 37°.

За одређивање **активности гама-глутамил-трансферазе (GGT)** у серуму коришћен је кинетички, колориметријски метод. Ензим L-γ-глутамилтрансфераза GGT катализује преношење γ-глутамил групе, донор супстрата (L-γ-глутамил-3-карбоксинитроанилид – GRUPA) на глицилглицин акцептор, уз ослобађање 5-амино-2-нитробензоата у алкалној средини. Континуирани пораст апсорбенције на 405 нм директно је пропорционалан активности GGT. Референтне вредности: мушкарци 11-50 U/L 37°; жене 7-32 U/L 37°.

3.2.3. Одређивање серумских концентрација инфламацијских молекула

Концентрације IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, IL-33, IFN-γ, TNF-α, TGF-β, Gal-3 и sST2 у серуму одређиване су одговарајућим комерцијалним ELISA тестовима специфичним за хумане цитокине (DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA). За анализу IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, IL-33 TGF-β, Gal-3 и sST2 коришћен је (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA), а за TNF-α и IFN-γ коришћен је (OptEIA Set, BD Biosciences, San Diego, CA. USA) тест.

Стандарди су прије употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 600 pg/ml за IL-6; 2000 pg/ml за IL-4, IL-12, TGF-β, sST2; 1500 за IL-33; 1000pg/ml за IL-17, TNF- α, IFN-γ; 4000 pg/ml за Gal-3; 8000 pg/ml за IL-23; а од оваквих штокова направљена су серијска растућа разблажења у 7 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача. 100 μl радне концентрације везујућег антителијела (енгл. Capture Antibody) сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. microtiter plate- MTP) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су потом прелијеplене адхезивном фолијом (енгл. ELISA Plate Sealers) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчиће испрани пуфером за испирање (енгл. Wash Buffer) у аутоматској машини за испирање MTP-а. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (BlockBuffer, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300μl и MTP су остављене минимум један сат на собној

температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Анализа TGF- β подразумева претходну активацију латентног TGF- β у имунореактиван облик (табела 2).

Табела 2. Конверзија TGF- β из латентног у имунореактиван облик

	серум/плазма
1.	На 40 μ L серума додати 20 μ L 1 N HCl
2.	Добро промешати
3.	Инкубирати 10 минута на собној температури
4.	Неутралисати кисели узорак додавањем 20 μ L 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES
5.	Добро промешати
6.	Непосредно пре анализе, разблажити активирани узорак 20-пута у Reagent Diluent-у
7.	Добијене вредности читавања стандардне криве морају се увећати одговарајућим коефицијентом разблажења

Разблажени узорци и припремљени стандарди насути су у МТР, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања МТР, у све бунарчиће је додато по 100 μ l радне концентрације детекционог антителијела (енгл. DetectionAntibody), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури.

Плоче су потом испране, а у бунарчиће је сипано 100 μ l радне концентрације Streptavidin-HRP (енгл. Streptavidin horseradish peroxidase). Инкубација на собној температури и без директног излагања свјетлости прекинута је након 20 минута, испирањем МТР-а. У бунарчиће је сипано 100 μ l раствора супстрата (енгл. SubstrateSolution: ColorreagentA+ColorreagentB,1:1). Двадесет минута касније, додати је 50 μ l стоп раствора (енгл. Stop Solution: 2N H₂SO₄) и одмах потом мјерена оптичка густина у сваком бунарчићу, помоћу Microplate reader-а (Zenyth, Anthos, UK) подешеног на 450nm.

Све измјерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слијепе пробе (дејонизована вода). На основу измјерених вриједности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње израчуната вриједност за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мејрени у трипликату.

3.2.4. Детекција анти HCV антителијела

За серолошко тестирање коришћени су комерцијални тестови за детекцију анти HCV антителијела, према упутству произвођача, на Мини VIDAS апарату, ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) техником, тј. комбинацијом ELISA технологије са финалним плавим флуоресцентним читавањем. VIDAS Anti-HCV је тест треће генерације који користи одговарајуће антигене из HCV језгра, NS3 и NS4 протеине за одређивање анти-HCV антителијела. Наставак са чврстом фазом SPR (engl, Solid Phase Receptacle) служи и као чврста фаза и као средство за пипетирање теста. Реагенси за тест су спремни за употребу и на располагању су у затвореним реагенс трачицама (стриповима). Алкална фосфатаза се користи као ензим. Супстрат је 4 Methyl-umbelliferyl fosfat (4-MUP), који хибридује у 4 Methyl-umbelliferon и реемитује свјетлост на 450 nm, након ексцитације на 370 nm.

Прије почетка рада сви узорци су се одмрзавали на собној температури до потпуног отапања, а потом прочишћени центрифугирањем. Бочице са калибраторима, контролама и узорци серума су промјешани користећи мјешач типа вортекс (за серуме одвојене од пелета). Прије тестирања узорака серума од оболелих, у први и други тест „HCV“ стрип (комерцијални стрип чији централни дио садржи различите реагенсе неопходне за рад теста) пипетирано је по 100 µl калибратора означеног као S1 који се тестира у дупликату, у трећи тест „HCV“ стрип пипетирано је 100 µl C1 позитивне контроле, а у четврти тест „HCV“ стрип 100 µl C2 негативне контроле која нам служи за провјеру да перформанса реагенаса није промјењена. Потом у предвиђено удубљење (бунарчић) на тест „HCV“ стрипу пипетирано је по 100 µl серума сваког болесника појединачно и убачено у апарат заједно са претходно припремљеним контролама и калибраторима као и њима одговарајућим „HCV“ SPR-овима (фишечичи обложени антигенима који представљају HCV језгро, NS3 и NS4 протеине). Према упутству произвођача пустан је у рад апарат који аутоматски сам изводи све кораке теста. Током првог корака узорак се разређује и заједно са реакционим раствором циклично улази и

излази из SPR-а. Anti-HCV антителија присутна у узорку везују се за антигене који представљају HCV језгро. Невезане компоненте узорка се испирају. Током наредног корака, мишија моноклонска анти-хуман IgG антителија (Fab фрагмент), конјугована за рекомбинантну алкалну фосфатазу се циклично уводе и изводе из SPR-а и повезаће се за хумани Ig повезан молекулима у чврстој фази. Даљи кораци испирања уклониће неvezане компоненте. Када се заврши тестирање, компјутер аутоматски анализира резултате. Флуоресценција се мјери два пута у епрувети за читање реагенс стрипа за сваки тестирани узорак. Прво читање је читање позадине кивете супстрата прије него што се SPR унесе у супстрат. Друго читање се ради после инкубирања супстрата са ензимом преосталим у унутрашњости SPR-а. Ензим конјугата катализира хидролизу овог супстрата у флуоресцентни производ (4 Methyl-umbelliferon), чија се флуоресценција мјери на 450 нм. Интензитет флуоресценције је пропорционалан концентрацији антигена присутног у узорку. На крају теста, резултате аутоматски рачуна апарат на основу „S1“ сачуваног у меморији. RFV (релативна флуоресцентна вредност) је рачуната одузимањем читања позадине од коначног резултата. За интерпретацију смо користили арбитрарне јединице = тест вредност (TV) уз граничну вредност 1,00. TV представља количник RFV узорка / RFV „S1“ и пропорционална је количини антителија у узорку, која се прате. Дијагностичка специфичност VIDAS Anti-HCV теста је око 99,50% а дијагностичка осјетљивост теста око 99,77%

3.2.5. Квалитативни RT PCR

HCV геном детектован је комерцијалним PCR тестом са реверзном транскрипцијом- RT-PCR (Amplior Hepatitis C virus Test, version 2.0, Roche diagnostics Systems, Mannheim, Germany) чији позитивни налаз (детектована HCV RNA) је указивао на активност HCV. Реверзна транскрипција, умножавање и детекција се аутоматски обавља у COBAS TaqMan48 Analyzer апарату. Тест се заснива се на три главне процедуре: (1) припрема узорака за екстракцију HCV RNA; (2) аутоматизована реверзна транскрипција циљног RNA за генерисање комплементарне DNA (cDNA); (3) PCR амплификација циљне cDNA коришћењем HCV специфичних комплементарних прајмера и истовремена детекција одвајања двоструких флуоресцентних бојаом-означених олигонуклеотидних проба које омогућавају касније и квантификацију циљног HCV умноженог продукта.

Прије обраде узорка припремљен је *Master Mix* у епрувету према упутству произвођача и чуван до употребе на температури 2-8°C у простору пред умножавање-припреме узорка и контрола, све док нису припремљени узорци и контроле. Потом у претходно означене епрувете је пипетирано 400 µl Радног реагенса за лизу а потом додато 200 µl узорка, а исто је учињено и са контролама и инкубирано у сувом стерилизатору 10 минута при 60°C ± 2°C и вортексовано 10 секунди. Додато је 600 µl 100% изопропилног алкохола у епрувете па центрифугирано 3-5 секунди и инкубирано 2 минуте на собној температури. Потом су епрувете са узорцима и контролама у микроцентрифуги центрифугиране при 12,500-16,000 µg 15 мин на собној температури. Након тога је одбачен супернатант и потом додато 10 ml 70% етанола и вортексовано 3-5 секунди па опет центрифугирали 5 мин. Потом је опет одбачен супернатант и па опет центрифугиран при највећој брзини 3-5 секунди, опет одбачен супернатант и додато 200 µl HCV Diluenta и вортексовано 10 секунди.

Додато је 50 µl сваког тако припремљеног узорка и позитивна и негативна контрола у епрувете у које је сипан мастермикс користећи микропипетор са аеросолном баријером или врхом који се може уклонити. Обрађени узорци (50 µl) и контроле којима су додати претходно припремљен мастермикс, користе се директно за PCR.

Премјештени су припремљени узорци и контроле у простор за умножавање.

Умножавање је неопходно отпочети што је прије могуће, али не касније од 45 минута након што су обрађени узорци и контроле додане у епрувете тзв А-прстенове који садрже мастермикс а како би се осигурало оптимално извођење теста.

У дијелове COBAS AMPLICOR (CA) уређаја за умножавање стављене су касете са одговарајућим реагенсима према упутству произвођача, а такође и епрувете (А-прстенове) са обрађеним узорцима и контролама. Затим је направљена радна листа како је описано у приручнику за употребу СА уређаја који је потом покренут. Реверзна транскрипција, умножавање и детекција аутоматски се изводе у СА уређају. Програм траје око 3 сата. Резултат квалитативног теста се изражава као детектована је или није детектована HCV RNA.

Тако амплификована нуклеинска киселина може се држати на собној температури не више од 2 сата од завршетка теста прије квантитирања или наставка на LINEAR ARRAY за генотипизацију. Ако се реакција даље не може извести у року 2 сата, денатурирана умножена нуклеинска киселина може се оставити на 2-8°C до 5 дана, или замрзнути на -80°C дужи период.

3.2.6. Квантитативни “Real time” RT-PCR

Након што је доказано присуство вирусне RNK у узорку израчуната је количина исте. Квантитативна анализа HCV RNA радила се „real time“ PCR комерцијалним китом за квантитацију (Cobas Amplicor HCV monitor test, version 2.0 - Roche diagnostics Systems, Mannheim, Germany) на COBAS® TaqMan® 48 Analyzer, према упутству произвођача аналитичке осјетљивости од 25 IU/ml до више од 100.000.000 IU/ml, а у складу са међународним стандардом за HCV RNA NAT анализе. Амплификовани узорак се серијски разређује и уз примјену одговарајућих стандарда израчунава се количина HCV-RNA у највећем разблажењу. COBAS® TaqMan® 48 аутоматски израчунава титар, концентрацију, HCV-RNA у тестираним узорцима упоређивањем HCV сигнала са сигналом HCV Стандарда за квантитацију за сваки узорак и контролу. Количина HCV-RNA се исказује у интернационалним јединицама (IU/ml) у складу са Међународним стандардом SZO за HCV-RNA тестове (NIBSC cod 96/798).

Табела 3: Процедура произвођача интерпретира тест према следећем:

Титар	Интерпретација
Недетектована HCV-RNA	Ако је HCV-RNA нижа од праговоног циклуса, вриједност је негативна, односно " HCV-RNK је недектетабилна."
$< 2.50E + 01$ IU/ml	Израчуната IU/ml је испод доње границе квантификације. Резултат: "HCV RNA је детектована, < 25 IU/ml."
$\geq 2.50E + 01$ IU/ml и $\leq 3.91E + 08$ IU/ml	Израчуната IU/ml је у опсегу теста. Резултат: ≥ 25 IU/ml- 31 IU/ml.
$> 3.91E + 08$ IU/ml	Израчуната IU/ml је изнад линеарног опсега. Резултат: > 31 IU/ml. Ако се жели даље квантитирати резултат, почетни узорак треба разблажити са HCV-негативном хуманом плазмом или серумом и тест поновити. Помножити добијене резултате са фактором разблажења.

Вођено је рачуна да резултат изнад опсега теста који производе резултат као "KS INVALID" не треба да буде приказан као $> 3.91E + 08$ IU/ml, према смјеницама самог теста.

3.2.7. Генотипизација HCV

Методe за генотипизацију могу да користе све технике молекуларне биологије којима се одређује секвенца генома, односно идентификује нуклеотидне измјене (мутације) у односу на константну секвенцу. Данас се за генотипизацију као златни стандард узима секвенционирање E1 гена и NS5B регије. Међутим, висок степен дивергенције у овим регијама често компликује сам PCR с једне стране а с друге стране генотипизација у овим регијама може се радити само помоћу техника нуклеотидног секвенцирања. Зато је прихваћено да се генотипизација HCV врши преко анализе 5' NTR-а и С гена што омогућава примјену једноставнијих и јефтинијих техника тзв. Техника брзог скрининга мутација, које имају само неколико процената мању специфичност у односу на златни старндард. Генотипизација се може радити на више начина- методом секвенционирања али се у лабораторијском раду користе комерцијални хибридизациони тестови на принципу блотинга.

HCV генотип је одређиван коршћењем Linear Array Hepatitis C Virus Genotyping testa

(Amplicor and Cobas Amplicor HCV Test, version 2.0), метода реверзне хибридизације на принципу blottinga, последице претходно изведене амплификације PCR тестом. Генотипизација је рађена помоћу прајмера специфичних за core-регион. Прије отпочињања извођења Linear Array теста за генотипизацију, према упутству произвођача, припремљен је пуфер за хибридизацију и стандардни пуфер за испирање, као и пуфер за испирање, цитратни пуфер и конјугат. Након припреме свих реагенаса и узорака са претходно денатурираном умноженом нуклеинском киселином, загријан је пуфер за хибридизацију и стандардни пуфер за испирање на 50°C у воденом купатилу најмање 10 минута. Затим су траке за одређивање HCV генотипа стављене у одговарајуће жежице микротитарске плоче и додан је 4 ml загријан пуфер за хибридизацију у сваку жежицу, а потом 100 µl претходно денатуриране нуклеинске киселине (узорак) и покривено поклопцем те постављено у водено купатило на 55°C и инкубирано 20 минута. Потом је вршено испирање са пуфером за испирање након чега је додат конјугат и опет све инкубирано 20 минута. Поступак испирања је поновљен још 2 пута и то након додавања стандардног пуфера. Потом је додат цитратни пуфер и инкубиран још 5 минута. Након уклањања цитратног пуфера и додавања супстрата, 4 пута је додана и уклањана дејонизована вода (4 ml).

Прије тумачења резултата LINEAR ARRAY траке за генотипизацију HCV-а, уклоњене су са микротитарске плоче користећи чисту пипету. Траке су полагане на чисти ацетатни рупчић и упорешиване са референтним показатељем HCV-а уз референтне линије на врху траке ради одређивања генотипа испитиваног узорка. Ако узорак на траци не одговара тачно узорку нити једне колоне, узимана је могућност да узорак можда не садржи више генотипова или нову варијанту вируса.

3.3. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

A. Варијабле које се мјере

Анализирани су следећи параметри:

- 1) лабораторијска анализа: вриједности урее, креатинина, број еритроцита, број леукоцита, гама GT, LDH, AST, ALT, вредност билирубина;
- 2) серумске концентрације анти HCV антителијела;
- 3) виремија тј. број копија HCV RNA/ml, генотип HCV;

- 4) серумске концентрације инфламацијских молекула IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, IL-33, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , Gal-3 и sST2.

Д1. Категоризација варијабли

Претходно описане варијабле су се разматрале у погледу узрочно-последичног односа.

Независне варијабле:

- **Примарна независна узрочна варијабла:** терминална бубрежна инсуфицијенција која се детерминише лабораторијским анализама (уреа, креатинин), временом ступања на дијализу и дужином дијализирања.

Зависне варијабле:

- **Примарне зависне исходишне варијабле:** времија тј. број копија HCV RNK/ml, генотип HCV, серумске концентрације анти HCV антитела.
- **Секундарне зависне исходишне варијабле:** лабораторијске анализе (број леукоцита, гама GT, LDH, AST, ALT, вриједност билирубина), серумске концентрације IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, IL-33, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , Gal-3 и sST2.

Збуњујуће варијабле

- Старост болесника
- Терапија болесника

В. Снага студије и величина узорка

Снага студије за истраживање је рачуната на основу студије *Babaei M* и сарадника (36) где је као примарна, зависна исходишна варијабла узета серумска концентрација цитокина IL-6, а као примарни независни, узрочни фактор- терминална бубрежна инсуфицијенција. На основу серумске концентрације цитокина IL-6 код оболелих са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом која је износила 3.79 ± 0.37 pg/mL и концентрације истог цитокина код здраве контроле, а која је износила 2.3 ± 0.05 pg/mL, потребна величина узорка за концентрација значајности $\alpha=0,05$ и статистичку моћ теста $1-\beta$ од 80% израчуната је потребна величина узорка од 40. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student-ов t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између двије групе испитаника, са снагом

студије $\geq 80\%$.

С. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА

Подаци су анализирани коришћењем софтверског пакета IBM SPSS Statistics20 (v.20.0, SRSS Inc., Chicago, IL). Добијени резултати су груписани и приказани, табеларно и графички. За утврђивање мјера централне тенденције и варијабилитета коришћене су методе дескриптивне статистике, независан Т тест и/или Mann-Whitney тест, Pearson и/или Spearman коефицијент корелације. Статистички метод израчунавања критичне вриједности, како би се утврдио исход неког догађаја, биће одређиван ROC кривом и израчунавањем сензитивности и специфичности за сваки од испитиваних параметара. Резултати су приказани као средње вредности (енгл.mean), стандардне грешке (енгл.standarderror). Дефинитивни избор статистичких метода зависио је од природе добијених података. Праг значајности (α) за сва статистичка израчунавања био је 0,05.

Све статистичке анализе у овом раду су урађене са интервалом повјерења од 95%. Резултати статистичке анализе су прихваћени као статистички значајни, уколико је концентрација вјероватноће нулте хипотезе $<5\%$, односно уколико је значајност теста $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Карактеристике испитаника

У студију је укључено 100 болесника. Они су подељени у четири групе: 40 болесника са крајњим стадијумом болести бубрега и HCV инфекцијом (ESRD⁺ HCV⁺), 20 HCV позитивних болесника (HCV⁺), 20 болесника са крајњим стадијумом болести бубрега (ESRD⁺) и 20 здравих особа контролне групе (HC).

Демографске и клиничке карактеристике ових болесника представљене су у Табели 3. Није нађена статистички значајна разлика у полној дистрибуцији између дефинисаних група болесника. Сви болесници су били старости од 18-70 година.

Средња вредност година старости у групи болесника са крајњим стадијумом болести бубрега и хепатитис С вирусном инфекцијом (ESRD⁺ HCV⁺) је била $55,2 \pm 1,47$, у групи хепатитис С позитивних болесника (HCV⁺) $53,8 \pm 2,32$, у групи болесника са крајњим стадијумом болести бубрега (ESRD⁺) $55,6 \pm 2,84$ и 20 у групи здравих особа $52,9 \pm 1,67$. Средња вриједност старосне доби је била слична, али су здрави испитаници били нашто млађи у односу на остале три испитиване групе. Битна разлика уочена је у трајању дијализе између ESRD⁺ HCV⁺ болесника који су дужи временски период на хемодијализи и ESRD⁺ болесника ($p=0.00$). Није било статистички значајне разлике у трајању HCV инфекције између ESRD⁺ HCV⁺ групе болесника ($7,02 \pm 4,28$) и HCV⁺ болесника ($8,25 \pm 4,68$).

Табела 4: Демографски подаци и клиничке карактеристике

Параметар	ESRD ⁺ HCV ⁺	HCV ⁺	ESRD ⁺	HC
Број	40	20	20	20
Мушкарци	18	9	13	12
Жене	22	11	7	8
Старост (године \pm SE)	$55,2 \pm 1,47$	$53,8 \pm 2,32$	$55,6 \pm 2,84$	$52,9 \pm 1,67$
Дијализа (године \pm SE)	$13,8 \pm 1,26$ *	/	$3,85 \pm 0,34$ *	/
HCV-статус (година \pm SE)	$7,02 \pm 0,67$	$8,25 \pm 1,04$	/	/

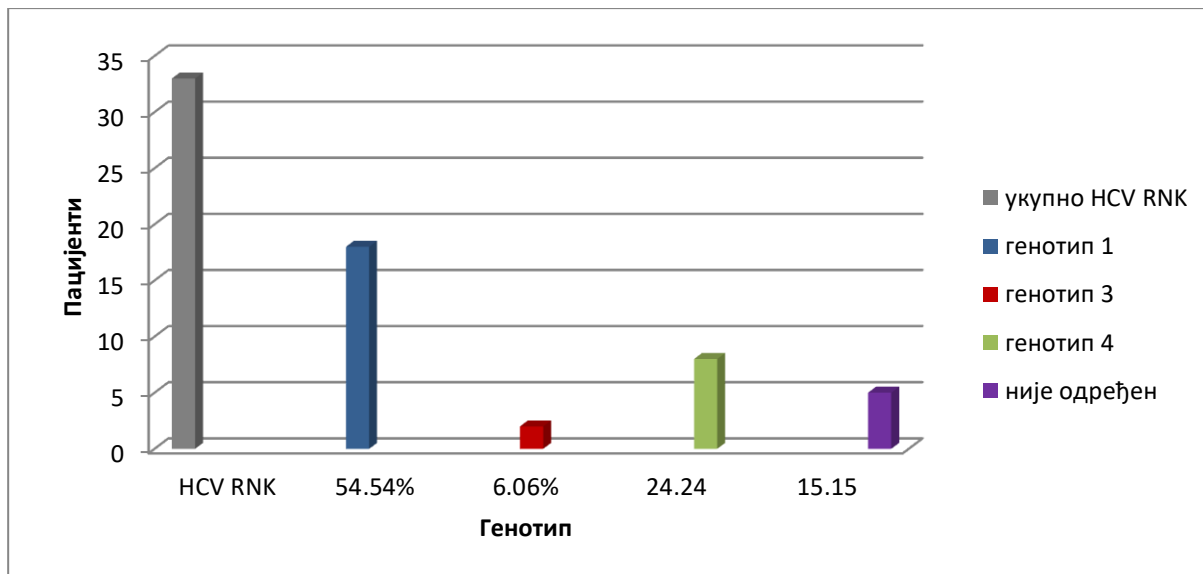
* ESRD $P < 0.05$ (Mann-Whitney test)

У групи обољелих од С хепатитиса 95% болесника је имало завршено основно или средње образовање, а свега 5% вишу или високу школу. 20% жена није било сексуално активно, док је 80% мушкараца имало сексуалне активности. Обољеле жене никада нису конзумирале алкохол, док 80% мушкараца и даље конзумира. Биопсија јетре, у групи болесника са терминалном болешћу бубрега а обољелих од С хепатитиса, није рађена због компликација прилично инвазивне процедуре, њихових личних одлука и недостатка мотивације. 95% болесника су имали више поновљених трансфузија прије него је установљено да су HCV позитивни.

Најчешћи узроци бубрежне инсуфицијенције код испитиваних болесника били су хронични гломерулонефритис, шећерна болест, полицистична болест бубрега ређе друге болести као што су хипертензија, амилоидоза и ренална дисфункција. 60% болесника је касније у току болести као коморбидитете имала осим хепатитис С вирусне инфекције и анемију, бубрежну остеодистрофију, *cor hipetonikum*, а њих 17% је имало и хепатитис В инфекцију.

4.2. Концентрације анти-HCV антителиа и HCV RNA

Пет (12,5%) болесника имало је детектабилна анти- HCV антителиа у серуму, пре почетка хемодијализе, док је 35 (87,5%) њих стекло антителиа у наредним годинама током дијализирања. HCV RNA је откривена код 34 (85%) болесника на дијализи док код њих 6 (15%) није. Код болесника са недетектабилном виремијом измерени су ниски титрови антителиа. 11 (27,5%) болесника на хемодијализи има високу виремију $>8 \times 10^6$ IU/ml, њих 23 (57,5%) има ниску виремију мање од 8×10^6 IU/ml, а 6 (15%) нема виремију. Код 6 (15,15%) болесника са откривеном HCV RNA због изузетно ниске вриједности виремије, <25 IU/ml, није било могуће одредити генотип. Просјечна вриједност квантитативног теста „*viral load*“ на вирусну RNA за генотип 1 износила је 1.879.035 IU/ml, а за генотип 4 износила је 1.478.187 IU/ml. У испитиваној групи генотип 1 је био доминантно заступљен, потом генотип 4, док су само два болесника имали генотип 3 (графикон 1).



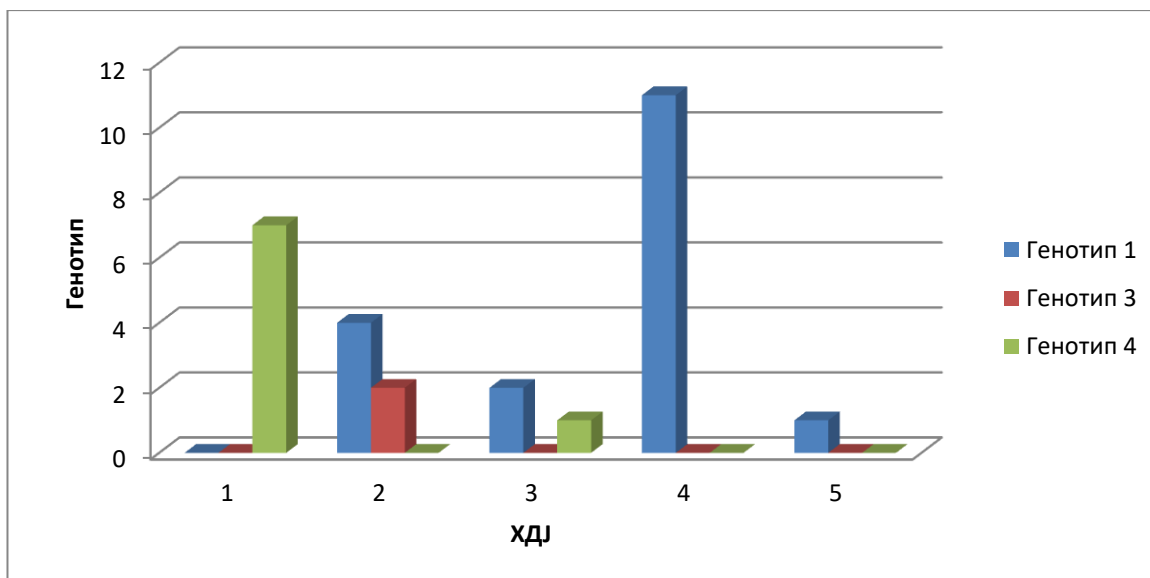
Фигура 1. Дистрибуција по генотиповима у групи болесника са ESRD⁺.

Код 34/40 болесника са крајњим стадијумом болести бубрега и хепатитис С вирусном инфекцијом (ESRD⁺ HCV⁺) етектована је RNA. Од њих, 18 је имало генотип 1, 2 болесника су имали генотип 3, док је генотип 4 имало 8 болесника. Није било могуће одредити генотип код 6 болесника.

Резултати су проценти. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Генотип 1 је заступљенији код женског пола у односу на мушки. Заступљеност генотипова 3 и 4 била је иста код оба пола.

Од 5 хемодијализних јединица из којих су се генерисали болесници у студији у три јединице је био заступљен само по један генотип и то у двије генотип 1, а у једној генотип 4. У двије јединице су били заступљени генотип 1 и 3 у једној а генотип 1 и 4 у другој (фигура 2).

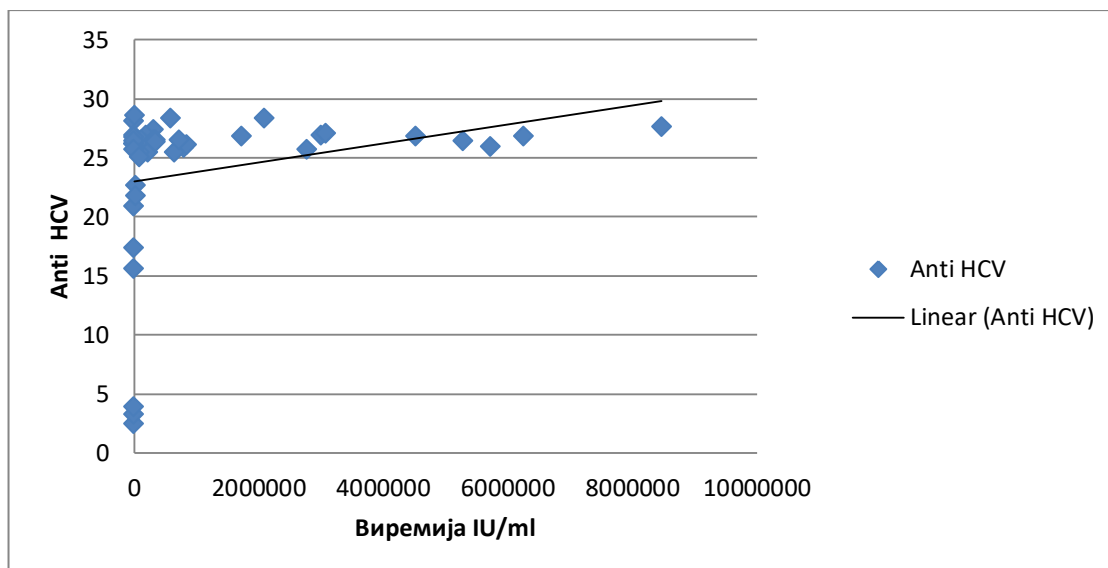


Фигура 2. Дистрибуција генотипова по хемодијализним јединицама.

У хемодијализној јединици 1 код свих седам болесника са детектованом HCV RNA заступљен је био само генотип 4. У хемодијализној јединици 2 била су 3 болесника са генотипом 1 и 2 болесника са генотипом 3. У хемодијализној јединици 3 код 2 болесника нађен је генотип 1 а код једног генотип 4. У хемодијализној јединици 4 заступљен је био само генотип 1 код 11 болесника и у хемодијализној јединици 5 један болесник са генотипом 1.

Анализирана је корелација између високих вирусних концентрација ($>8 \times 10^6$ IU/ml) и количине анти HCV. Анализирана је концентрација анти HCV антитијела. Рађен је такође Спирманов тест и добијене су вредности $r = -0.308$, $p = 0.331$ што показује да не постоји корелација између наведених параметара, тј. са повећањем вирусне концентрације не расте концентрација антитијела (подаци нису приказани графички).

Даљом статистичком анализом испитали смо повезаност између количине HCV RNA и концентрације анти HCV антитијела у крви у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника. Применом Spearman-овог коефицијента корелације утврдили смо умерену корелацију између количине HCV RNA и концентрације анти HCV антитијела у крви у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника (Spearman-ов коефицијент корелације, $r = 0.474$; $p = 0.002$) (фигура 3).

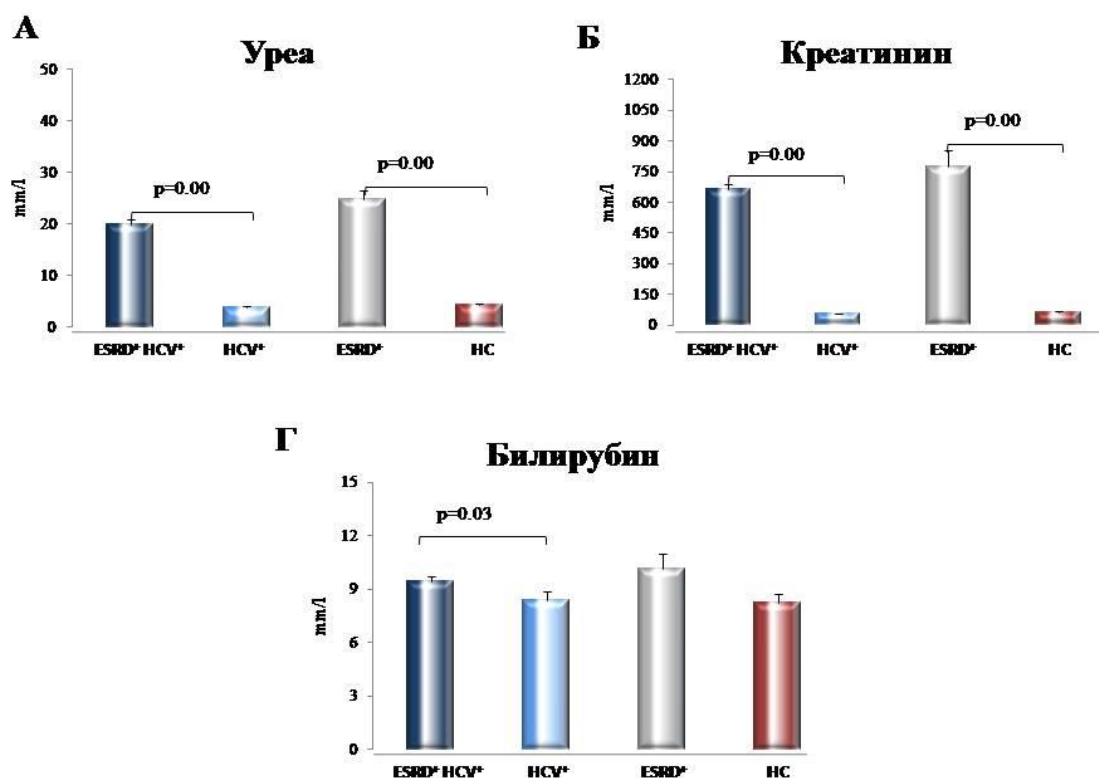


Фигура 3. Количина HCV RNA корелира са концентрацијом анти HCV антитијела

Анти HCV антитијела су одређена ELISA (ELFA техника) тестом. Квантитативна анализа HCV RNA радила се „real time“ PCR комерцијалним китом за квантитацију. Статистичка значајност је одређивана применом Spearman-овог коефицијента корелације ($r=0.474$; $p=0.002$).

4.3. Концентрације биохемијских параметара урее, креатинина и билирубина значајно су веће у серуму испитаника са ESRD

Свим испитаницма су одређиване серумске концентрације биохемијских параметара: урее, креатинина и билирубина (уреа методом по Jaffe-у; креатинин ензимским, спектофотометријским кинетичким методом; билирубин методом по Malloy-Evelyn-a). Серумска концентрација урее је статистички значајно виша код болесника са ESRD+ у односу на контролну групу испитаника ($24,77 \pm 1,71$ vs. $4,28 \pm 0,22$ mmol/l; $p=0.00$), као и код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима ($19,90 \pm 0,91$ vs. $3,77 \pm 0,34$ mmol/l; $p<0.05$). Системска вредност креатинина је такође статистички значајно већа код болесника са ESRD⁺ у односу на контролну групу испитаника ($777,96 \pm 80$ vs. $63,68 \pm 1,87$ mmol/l; $p=0.00$), као и код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима ($667,11 \pm 21,74$ vs. $57,07 \pm 1,61$ mmol/l; $p<0.05$). И концентрација билирубина је статистички значајно виша код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима ($9,40 \pm 0,26$ vs. $8,40 \pm 0,51$; $p=0.03$) (фигура 4).



Фигура 4. Концентрација биохемијских параметара урее, креатинина и билирубина у серуму.

Серумске концентрације биохемијских параметара су одређене методом по Jaffe-у; ензимским, спектофотометријским кинетичким методом и билирубин методом по Malloy-Evelyn-a.

4А: концентрација урее је статистички значајно виша код болесника са ESRD⁺ у односу на контролну групу испитаника (средња вриједност±стандардна грешка 24,77 ± 1,71 vs. 4,28 ± 0,22 mmol/l; p=0.00), као и код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима (19.90 ± 0.91 vs. 3.77 ± 0.34 mmol/l; p<0.05).

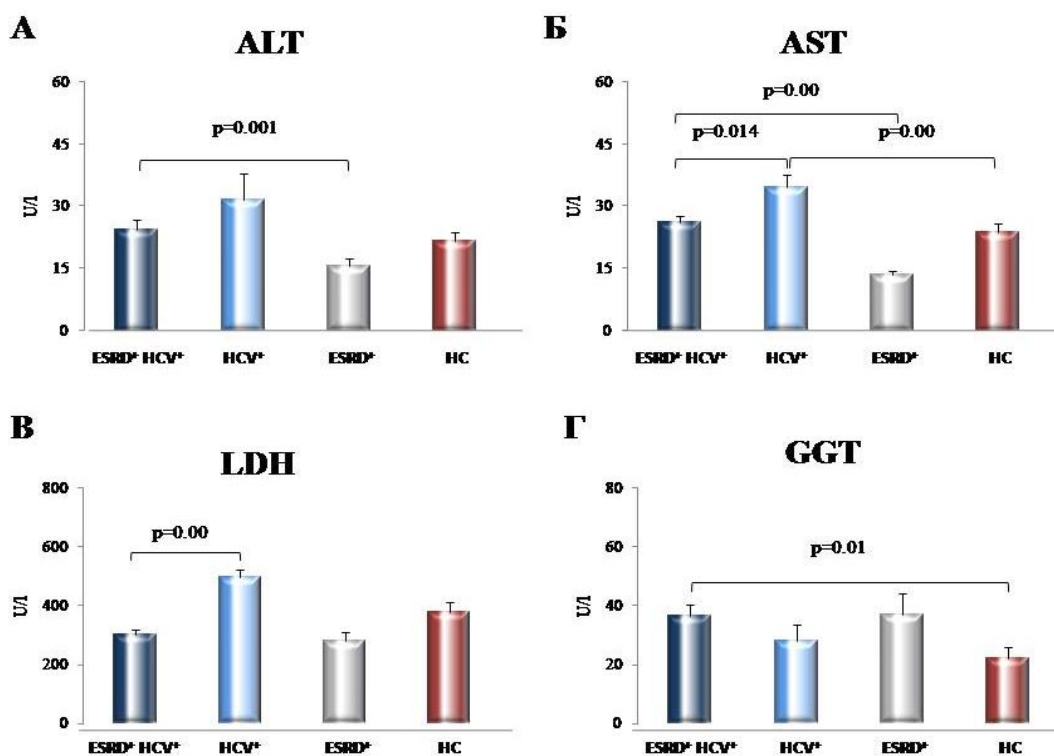
4Б: концентрација креатинина је статистички значајно виша код болесника са ESRD⁺ у односу на контролну групу испитаника (средња вриједност ± стандардна грешка: 777,96 ± 80 vs. 63,68 ± 1,87 mmol/l; p=0.00), као и код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима (667,11 ± 21,74 vs. 57,07 ± 1,61 mmol/l; p<0.05).

4В: концентрација билирубина је статистички значајно виша код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима (средња вриједност ± стандардна грешка: 9,40 ± 0,26 vs. 8,40 ± 0,51; p=0.03).

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Додатно, мјерили смо маркере функције јетре: ALT, AST, LDH и GGT. Серумски концентрацијаи биохемијских параметара су одређени IFCC кинетичким UV методом. Добијени резултати јасно показују да је концентрација ALT-а статистички значајно већа у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на болеснике са ESRD (24,43 ± 2,40 vs. 31,71 ± 6,26; p<0.05). Забележили смо и снижену системску концентрацију

ALT-а код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ пацијентима, али ова разлика није достигла статистичку значајност (фигура 5А). Системска вредност AST-а такође је значајно већа у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на болеснике са ESRD, али је и статистички значајно мања код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима ($26,10 \pm 1,71$ vs. $34,53 \pm 3,22$ U/l; $p < 0,05$) (фигура 5Б). Серумска концентрација лактат дехидрогеназе (LDH) је статистички значајно нижи у ESRD⁺ HCV⁺ у односу на HCV⁺ групу испитаника ($300,40 \pm 18,40$ vs. $495,88 \pm 27,79$ U/l; $p < 0,05$) (фигура 5В). Концентрација GGT-а статистички значајно је већа код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на контролну групу испитаника ($36,35 \pm 3,87$ vs. $22,10 \pm 3,67$; $p < 0,05$) (фигура 5Г).



Фигура 5. Серумска концентрација биохемијских параметара јетре ALT, AST, LDH и GGT.

Серумске концентрације биохемијских параметара су одређене IFCC кинетичким UV методом.

5А: Концентрација ALT-а статистички значајно је већа у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на болеснике са ESRD ($24,43 \pm 2,40$ vs. $31,71 \pm 6,26$; $p < 0,05$).

5Б: Серумска вредност AST-а статистички је значајно мања код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима ($26,10 \pm 1,71$ vs. $34,53 \pm 3,22$ U/l; $p < 0,05$).

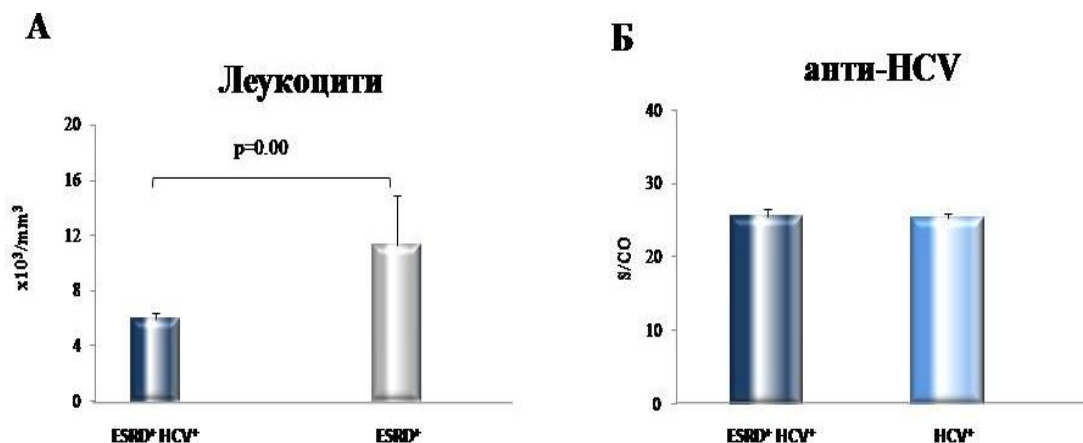
5В: Концентрација лактат дехидрогеназе (LDH) је статистички значајно нижи код ESRD⁺ HCV⁺ у односу на HCV⁺ групу испитаника. ($300,40 \pm 18,40$ vs. $495,88 \pm 27,79$ U/l; $p < 0,05$)

5Г: Концентрација GGT-а статистички значајно је већа код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на контролну групу испитаника ($36,35 \pm 3,87$ vs. $22,10 \pm 3,67$; $p < 0,05$)

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

У наставку студије одређиван је број леукоцита у периферној крви ESRD⁺ HCV⁺ и ESRD⁺ оболелих. Број леукоцита у периферној крви одређен је на принципу импеданције и волуметријског бројања крвних ћелија. Детектован је значајно мањи број леукоцита у периферној крви ESRD⁺ HCV⁺ испитаника у односу на ESRD⁺ испитанике ($5,97 \pm 0,42$ vs. $11,35 \pm 3,54$; $p < 0,05$) (фигура 6А).

Такође је измјерен серумски концентрација анти-HCV антитијела у периферној крви ESRD⁺ HCV⁺ и HCV⁺ оболелих. Анти HCV антитијела су одређена ELISA (ELFA техника) тестом. Није детектована значајна разлика у концентрацију анти-HCV антитијела између ESRD⁺ HCV⁺ болесника и HCV⁺ болесника ($25,49 \pm 1,11$ vs. $25,47 \pm 0,49$ S/CO; $p > 0,05$) (фигура 6Б).



Фигура 6. Број леукоцита и серумске концентрације анти HCV антитијела.

Број леукоцита у периферној крви одређен је на принципу импеданције и волуметријског бројања крвних ћелија. Анти HCV антитијела су одређена ELISA (ELFA техника) тестом.

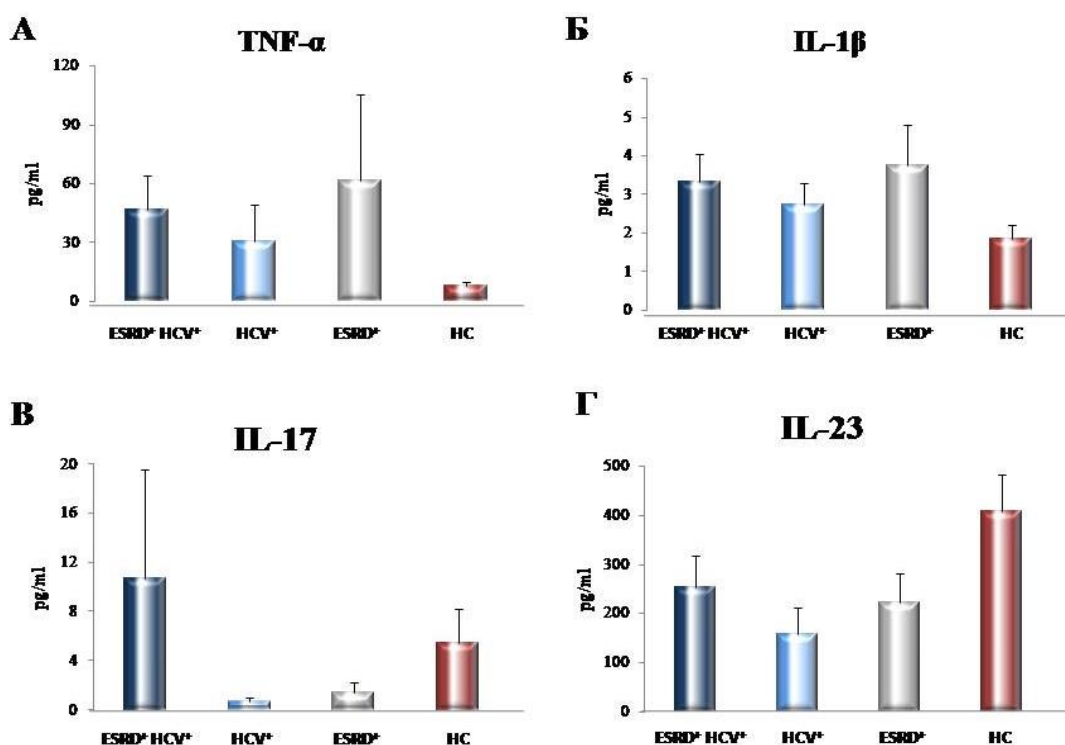
6А: Значајно мањи број леукоцита у периферној крви ESRD⁺ HCV⁺ испитаника у односу на ESRD⁺ испитанике (средња вриједност±стандардна грешка $5,97 \pm 0,42$ vs. $11,35 \pm 3,54$; $p < 0,05$).

6Б: Није детектована значајна разлика у концентрацију анти-HCV антитијела између ESRD⁺ HCV⁺ болесника и HCV⁺ болесника (средња вриједност ± стандардна: $25,49 \pm 1,11$ vs. $25,47 \pm 0,49$ S/CO; $p > 0,05$).

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

4.4. Концентрације цитокина у серуму испитаника

У наставку истраживања, одређивали смо и серумске концентрације цитокина IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, IL-33, TNF- α и TGF- β . Болесници су подијељени у четири групе, на основу функције бубрега и HCV инфекције. Испитивали смо да ли и како HCV инфекција и терминална бубрежна инсуфицијенција индукују селективне промјене у концентрацијама наведених цитокина. Није нађена статистички значајна разлика у системским вредностима проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-1 β , IL-17 и IL-23 између група ESRD⁺ HCV⁺ болесника и HCV⁺ болесника, као ни између ESRD⁺ болесника и здравих контрола (Фигура 7).



Фигура 7. Серумске концентрације TNF- α , IL-1 β , IL-17 и IL-23.

Серумске концентрације цитокина су одређене ELISA тестом.

7А: Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији TNF- α између дефинисаних група.

ESRD⁺ HCV⁺ болесници vs. HCV⁺ болесници: 46,29 ± 17,71 vs. 30,15 ± 18,84 pg/ml; p>0.05.

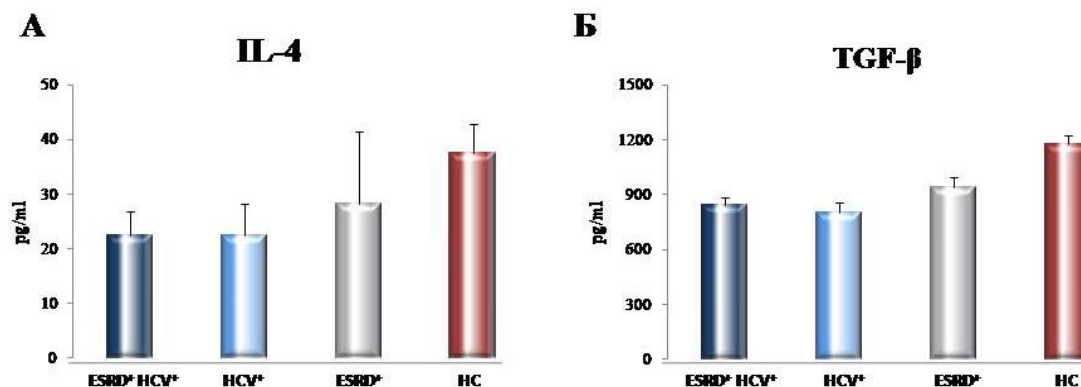
7Б: Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији IL-1 β између дефинисаних група. ESRD⁺ HCV⁺ болесници vs. HCV⁺ болесници: 3,32 ± 0,72 vs. 2,71 ± 0,57 pg/ml; p>0.05.

7В: Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији IL-17 између дефинисаних група. ESRD⁺ HCV⁺ болесници vs. HCV⁺ болесници: 10,66 ± 8,91 vs. 0,62 ± 0,35 pg/ml; p>0.05.

7Г: Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији IL-23 између дефинисаних група. ESRD⁺ HCV⁺ болесници vs. HCV⁺ болесници: 253,58 ± 62,93 vs. 157,61 ± 54,69 pg/ml; p>0.05.

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-test

Анализом про-Т2 цитокина IL-4 и имуносупресивног TGF- β није нађена значајна разлика у системским вредностима између дефинисаних група. Забиљежен је благи пораст серумске концентрације код здраве контролне групе у односу на остале (фигура 8), док је најнижа концентрација IL-4 забиљежена код инфицираних хемодијализираних болесника.



Фигура 8. Серумске концентрације IL-4 и TGF- β .

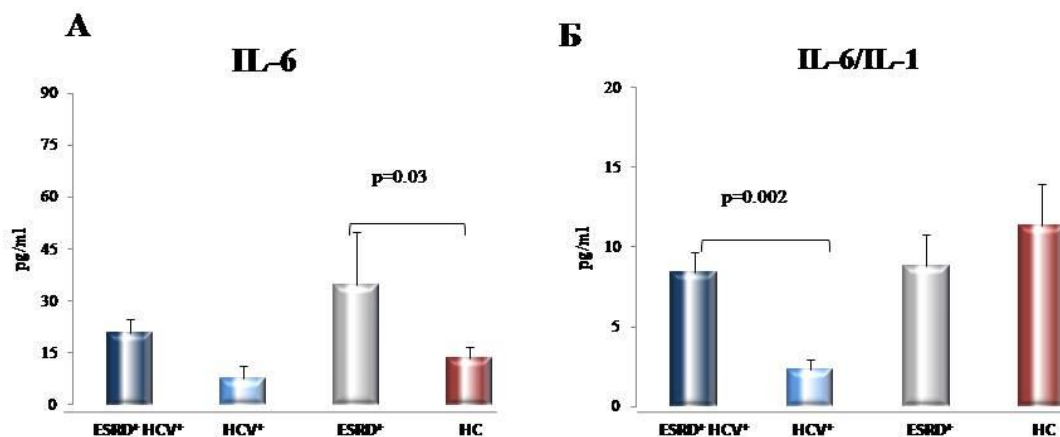
Серумске концентрације цитокина су одређене ELISA тестом.

8А: Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији IL-4 између дефинисаних група. ESRD⁺ HCV⁺ болесници vs. HCV⁺ болесници: 22,36 ± 4,47 vs. 22,42 ± 5,93 pg/ml; p>0.05

8Б: Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији TGF- β између дефинисаних група. ESRD⁺ HCV⁺ болесници vs. HCV⁺ болесници: 847,36 ± 37,65 vs. 804,65 ± 56,48 pg/ml; p>0.05

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Након тога смо анализирали концентрацију IL-6 у серуму све четири дефинисане групе. ESRD болесници имали су знатно веће системске вредности IL-6 у поређењу са здравим контролним субјектима. Серумски концентрација IL-6 такође је био знатно повишен у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима као и са здравим контролама. Сматра се да однос контрарегулаторних цитокина може да представља релевантан показатељ обољења. Стога су размотрени односи хепатопротективног IL-6 са проинфламацијским цитокинима. Једина значајна уочена разлика био је IL-6/IL-1. Однос IL-6/IL-1 био је повећан у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу са HCV⁺ болеснике (Фигура 9).



Фигура 9. Серумска концентрација IL-6 и однос контрарегулаторних цитокина IL-6 и IL-1.

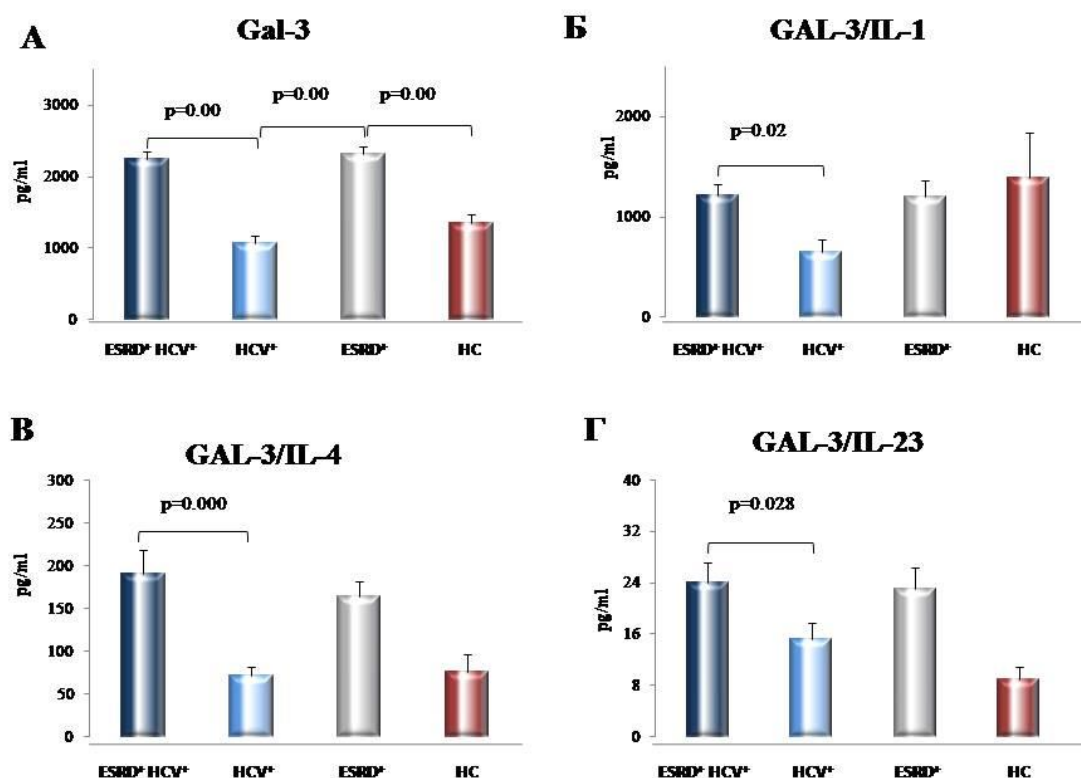
Серумске концентрације цитокина су одређиване ELISA тестом.

9А: Концентрација IL-6 статистички значајно је већа код ESRD болесника у односу на контролну групу испитаника ($34,46 \pm 15,43$ vs. $13,56 \pm 3,1$ pg/ml; $p=0.003$). Значајно је већа и код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ испитаницима ($20,79 \pm 3,81$ vs. $7,36 \pm 3,87$ pg/ml; $p<0.05$).

9Б: Утврђен је значајно већи однос серумских вредности IL-6 и IL-1 у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на HCV⁺ болеснике ($8,42 \pm 1,25$ vs. $2,35 \pm 0,57$; $p=0.002$).

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Такође, мерили смо серумски концентрација галектина 3 (Gal-3) у све четири групе болесника као и његов однос са проинфламацијским и имunosупресивним цитокинима. ESRD болесници имали су знатно повишену серумску концентрацију Gal-3 у поређењу са здравим контролним субјектима. Показано је да су ESRD⁺ HCV⁺ болесници такође имали повећан концентрација Gal-3 у поређењу са HCV⁺ болесницима. Концентрација Gal-3 значајно је већа у групи болесника са хроничним обољењем бубрега у односу на HCV⁺ и болеснике из здраве контролне групе. Анализом односа системских вредности Gal-3 и других мерених цитокина у студији показано је да Gal-3/IL-1 однос статистички значајно већи у ESRD⁺ HCV⁺ групи болесника у односу на HCV⁺ групу. Овај тренд карактеристичан је и за однос Gal-3/IL-4 и Gal-3/IL-23, гдје је такође уочена већа вредност односа ових маркера у ESRD⁺ HCV⁺ групи болесника у односу на HCV⁺ групу (Фигура 10).



Фигура 10. Серумска концентрација Галектина-3 и однос Галектина-3 и цитокина IL-1, IL-4 и IL-23

Серумске концентрације галектина-3 и цитокина су одређиване ELISA тестом.

10А: Концентрација Gal-3 статистички значајно је већа код ESRD⁺ болесника у односу на контролну групу испитаника ($342308,31 \pm 111,29$ vs. $1341,90 \pm 127,85$ pg/ml; $p < 0,05$). Значајно је већа и код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ испитаницима $2252,50 \pm 97,18$ vs. $1072,76 \pm 108,80$ pg/ml; $p < 0,05$).

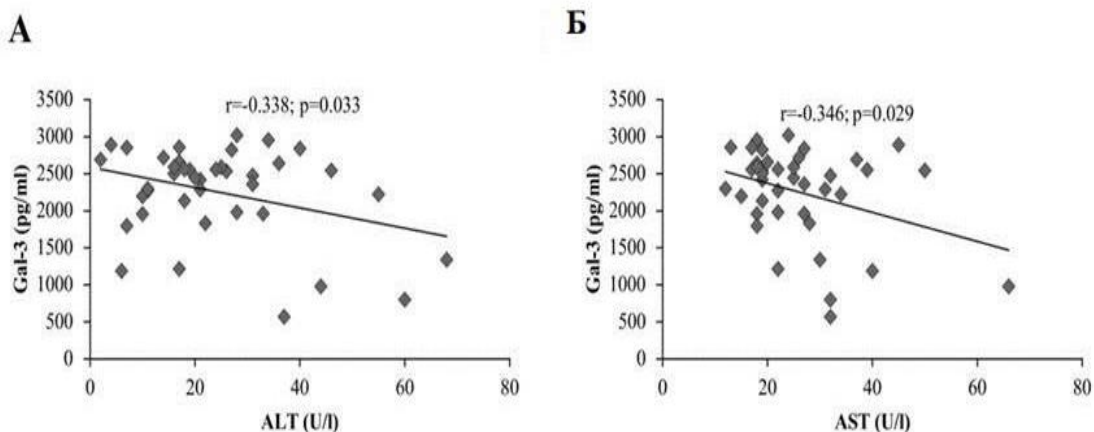
10Б: Измерен је значајно већи однос серумских вредности Gal-3 и IL-1 у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на HCV⁺ болеснике ($1212,26 \pm 107,54$ vs. $641,91 \pm 131,37$; $p < 0,05$).

10В: Детектован је значајно већи однос серумских вредности Gal-3 и IL-4 у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на HCV⁺ болеснике ($190,24 \pm 27,98$ vs. $71,51 \pm 9,93$; $p < 0,05$).

10Г: Измерен је значајно већи однос серумских вредности Gal-3 и IL-23 у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на HCV⁺ болеснике ($24,14 \pm 3,03$ vs. $15,24 \pm 2,52$; $p < 0,05$).

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

У групи болесника са терминалним стадијумом бубрежне болести и хепатитис С вирусном инфекцијом (ESRD⁺ HCV⁺) анализирана је корелације између Gal-3 и маркера оштећења јетре. Статистичком анализом утврђена је негативна корелација системске вредности Gal-3 и вредности маркера оштећења јетре ALT и AST (Фигура 11).



Фигура 11. Серумска концентрација галектина-3 корелира са концентрацијом маркера оштећења јетре.

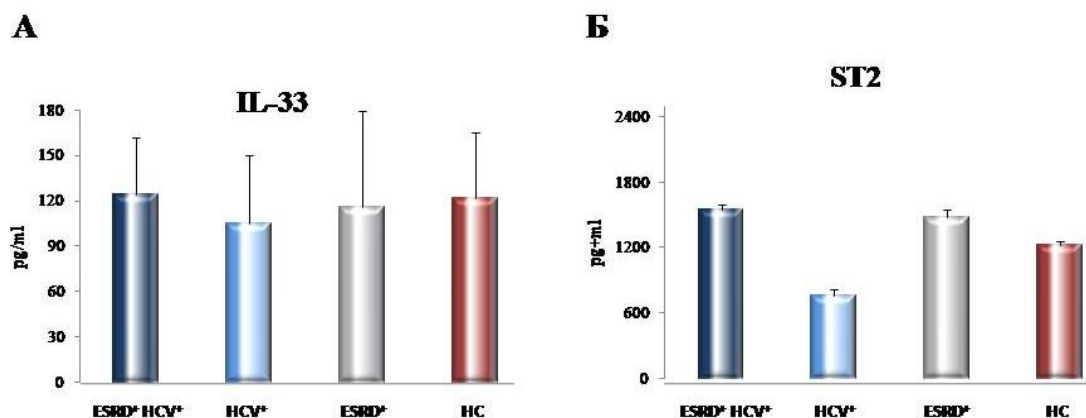
Серумска концентрација галектина-3 одређивана је ELISA тестом. Серумске концентрације биохемијских параметара су одређене IFCC кинетичким UV методом.

11А: Постоји умјерена негативна корелација између серумских вредности Gal-3 и ALT ($p < 0.05$)

11Б: Постоји умјерена негативна корелација између серумских вредности Gal-3 и AST ($p < 0.05$)

Приказане вредности су представљен *Scatter* дијаграмом. Статистичка значајност је одређивана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

Серумске вредности цитокина IL-33 као и sST2 који представља рецептор мамац за IL-33 одређиване су код свих болесника. Детектоване серумске концентрације IL-33 нису се значајно разликовала између група болесника, с тим што су забиљежене нешто веће вриједности у ESRD⁺ HCV⁺ као и у ESRD⁺ групи (Фигура 12А). Показано је да су ESRD⁺ HCV⁺ болесници имали повећан концентрација sST2 у поређењу са HCV⁺ болесницима (Фигура 12Б).



Фигура 12. Серумске концентрације IL-33 и sST2.

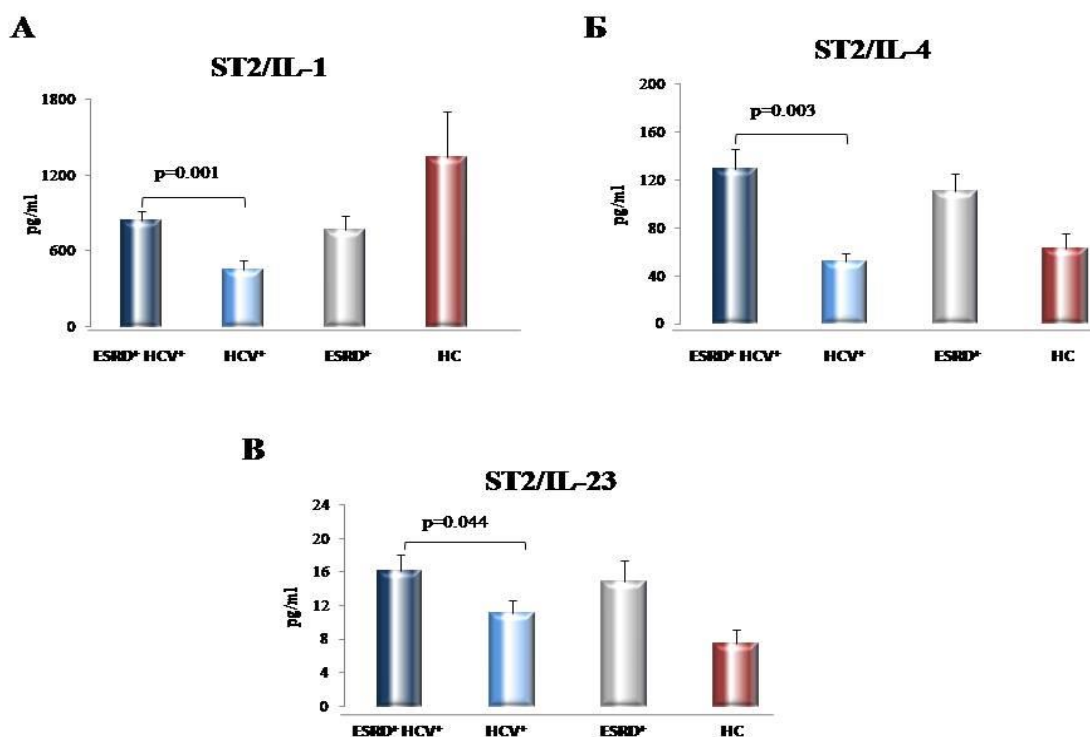
Серумске концентрације IL-33 и sST2 су одређиване ELISA тестом.

12А: Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији IL-33 између дефинисаних група. ESRD⁺ HCV⁺ болесници vs. HCV⁺ болесници: 124,17 ± 37,65 vs. 105,18 ± 45,48 pg/ml; p>0.05.

12Б: Концентрација sST2 статистички значајно је већа код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на HCV⁺ болеснике. ESRD⁺ HCV⁺ болесници vs. HCV⁺ болесници: 1551,05 ± 43,99 vs. 767,77 ± 52,53 pg/ml; p=0.00.

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Мјерен је и однос серумске концентрације sST2 са проинфламацијским и имunosупресивним цитокинима. Анализом односа показано је да је sST2/IL-1 значајно већи у ESRD⁺ HCV⁺ групи болесника у односу на HCV⁺ групу (ESRD⁺ HCV⁺ vs. HCV⁺: 845,77 ± 69,99 vs. 457,62 ± 68,19; p<0.05, фигура 13А). Овај тренд карактеристичан је и за однос sST2/IL-4 и sST2/IL-23, гдје је такође уочена већа вредност односа ових маркера у ESRD⁺ HCV⁺ групи болесника у односу на HCV⁺ групу (Фигура 13Б-В).



Фигура 13. Однос између sST2 и цитокина IL-1, IL-4 и IL-23.

Серумске концентрације sST2 и цитокина су одређиване ELISA тестом.

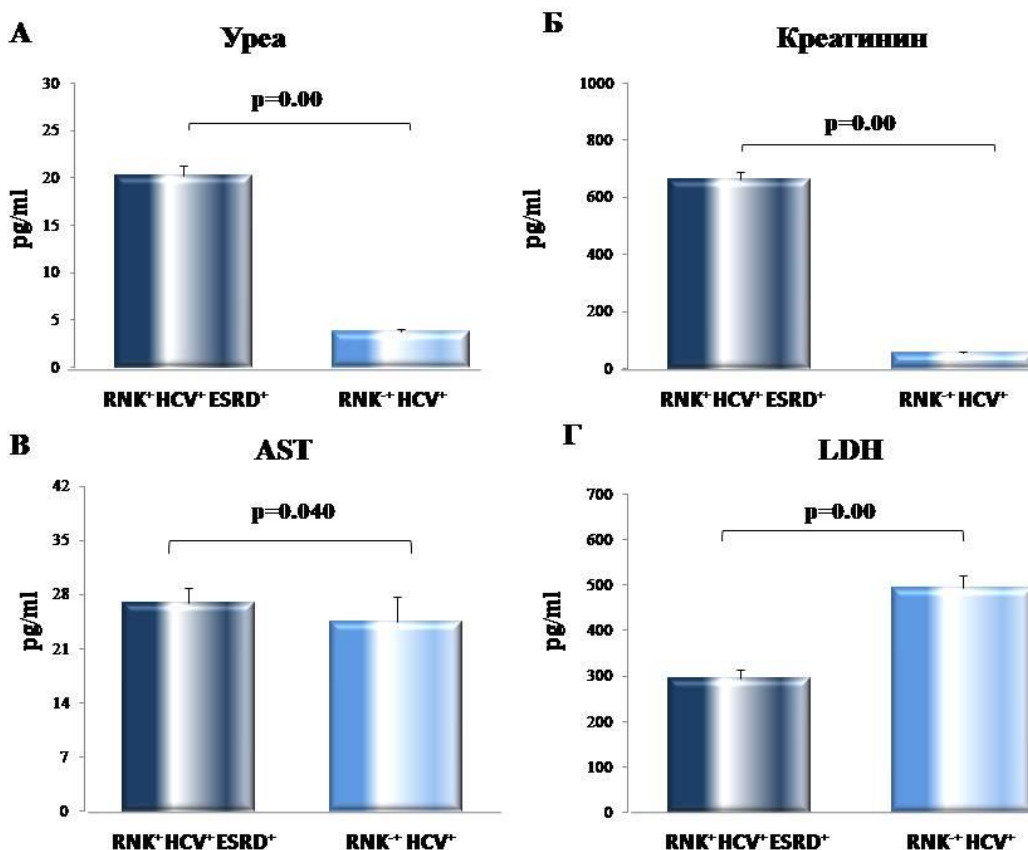
13А: Измерен је значајно већи однос серумских вредности sST2 и IL-1 у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на HCV⁺ болеснике ($845,77 \pm 69,99$ vs. $457,62 \pm 68,19$; $p < 0,05$).

13Б: Детектован је значајно већи однос серумских вредности sST2 и IL-4 у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на HCV⁺ болеснике ($129,34 \pm 17,08$ vs. $52,00 \pm 6,73$; $p < 0,05$).

13В: Измерен је значајно већи однос серумских вредности sST2 и IL-23 у групи ESRD⁺ HCV⁺ болесника у односу на HCV⁺ болеснике ($129,34 \pm 17,08$ vs. $52,00 \pm 6,73$; $p < 0,05$).

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

У наставку истраживања фокусирали смо се на болеснике којима је детектована HCV RNA. Мјерили смо и поредили биохемијске параметре и маркере функције јетре. Резултати су показали да су RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници имали повишену концентрацију уреје, креатинина и аспартат аминотрансферазе (AST) у поређењу са болесницима који нису на хемодијализи тј. RNA⁺ HCV⁺. Такође смо измјерили лактат дехидрогеназу (LDH) у серумима ових болесника. RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници имали су знатно смањену концентрацију LDH у поређењу са RNA⁺ HCV⁺ болесницима (фигура 14).



Фигура 14. Концентрација биохемијских параметара (уреа, креатинина) и маркера функције јетре (AST и LDH) у серуму.

Серумске концентрације биохемијских параметара су одређене методом по Jaffe-u; затим ензимским, спектофотометријским кинетичким методом, а маркери јетре су одређени IFCC кинетичким UV методом.

14А: Концентрација уреа у серуму статистички значајно је виша код RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ (средња вриједност ± стандардна грешка: 20,27 ± 1,04 vs. 3,77 ± 0,34 mmol/l; p<0,05).

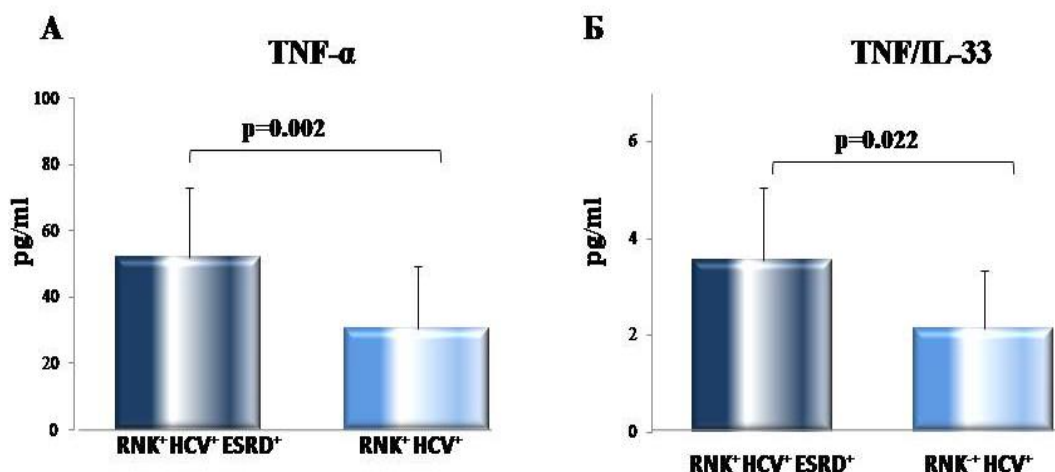
14Б: Концентрација креатинина статистички значајно је виша код RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ у односу на RNA⁺ HCV⁺ пацијенате (665,10 ± 24,63 vs. 57,07 ± 1,61 mmol/l; p<0,05).

14В: Постоји статистички значајна разлика између концентрацијаа AST код RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ у односу на RNA⁺ HCV⁺ пацијенате (26,88 ± 2,011 vs. 24,53 ± 3,22 U/l; p<0,05).

14Г: Концентрација лактат дехидрогеназе (LDH) статистички значајно је нижи код RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике (295,27 ± 20,54 vs. 495,88 ± 27,79 U/l; p<0,05).

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Мјерене су и серумске вредности цитокина као и однос серумских концентрација цитокина. Анализом је показано да су системске вредности TNF- α као и однос TNF- α /IL-33 значајно већи у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ групу (TNF- α : 52,01 \pm 21,28 vs. 30,05 \pm 18,84 pg/ml; p<0.05, фигура 15А; TNF- α /IL-33: 3,55 \pm 1,5 vs. 2,12 \pm 1,23; p<0.05, фигура 15Б). Односи системских вредности TNF- α и осталих мерених цитокина нису се значајно разликовали у дефинисаним групама.



Фигура 15. Серумска концентрација TNF- α и однос TNF- α и цитокина IL-33

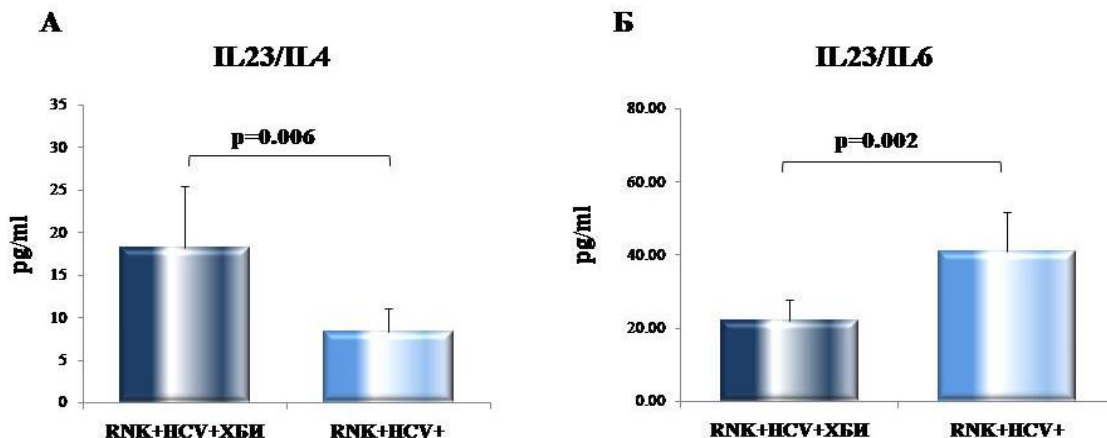
Серумска концентрација цитокина код испитаника одређена је ELISA тестом.

15А: Уочена је статистички значајна разлика у серумским вредностима TNF- α између RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групе болесника и RNA⁺ HCV⁺ групе. TNF- α : 52,01 \pm 21,28 vs. 30,05 \pm 18,84 pg/ml; p<0.05.

15Б: Значајно већа вредност односа TNF- α /IL-33 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 3,55 \pm 1,5 vs. 2,12 \pm 1,23 pg/ml; p<0.05.

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Испитивали смо однос серумске вредности IL-23 и других цитокина мерених у овој студији. Статистички значајне разлике између RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ и RNA⁺ HCV⁺ група нађене су за односе IL-23 са IL-4 и IL-6. Наиме, однос IL-23/IL-4 значајно је већи у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ групу (IL-23/IL-4: 18,28 \pm 7,18 vs. 8,39 \pm 2,68; p=0.006, фигура 16А), док је однос IL-23/IL-6 значајно мањи у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ групу (IL-23/IL-6: 22,18 \pm 5,74 vs. 41,05 \pm 10,55; p=0.002 (фигура 16Б).



Фигура 16. Однос серумских концентрација IL-23 и IL-4 и IL-6.

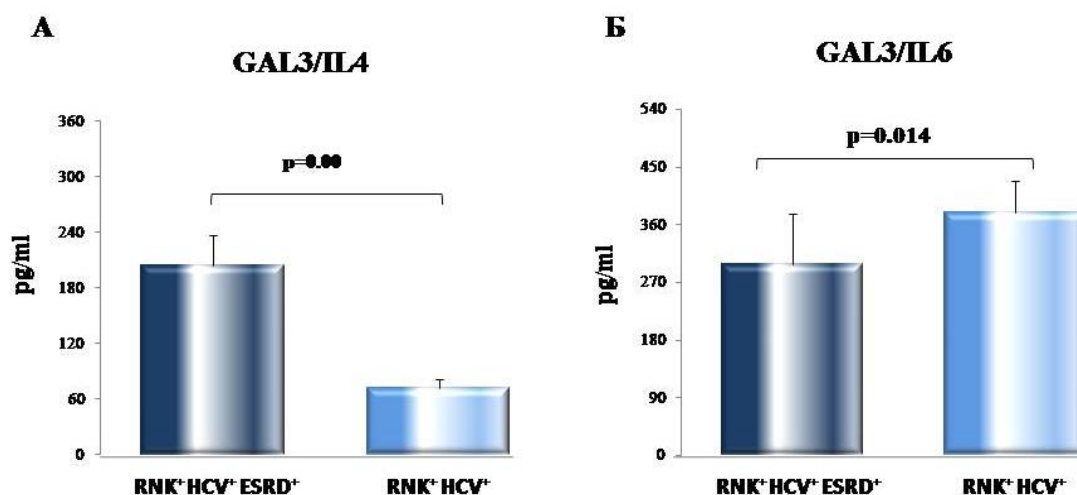
Серумске концентрације цитокина код испитаника су одређене ELISA тестом.

16А: Значајно већа вредност односа IL-23/ IL-4 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 18,28 ± 7,18 vs. 8,39 ± 2,68; p=0.006

16Б: Значајно мања вредност односа IL-23/ IL-6 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 22,18 ± 5,74 vs. 41,05 ± 10,55; p=0.002.

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Анализом односа системских вредности Gal-3 и цитокина значајна разлика добијена је у односима Gal-3 са IL-4 и IL-6. Однос Gal-3/IL-4 значајно је већи у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ групу (Gal-3/IL-4: 204,21 ± 32,99 vs. 71,51 ± 9,93; p=0.00, фигура 17А), док је однос Gal-3/IL-6 значајно мањи у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ групу (Gal-3/IL-6: 297,42 ± 78,93 vs. 379,25 ± 48,7; p=0.014, фигура 17Б).



Фигура 17. Однос серумских концентрација Gal-3 и IL-4 и IL-6.

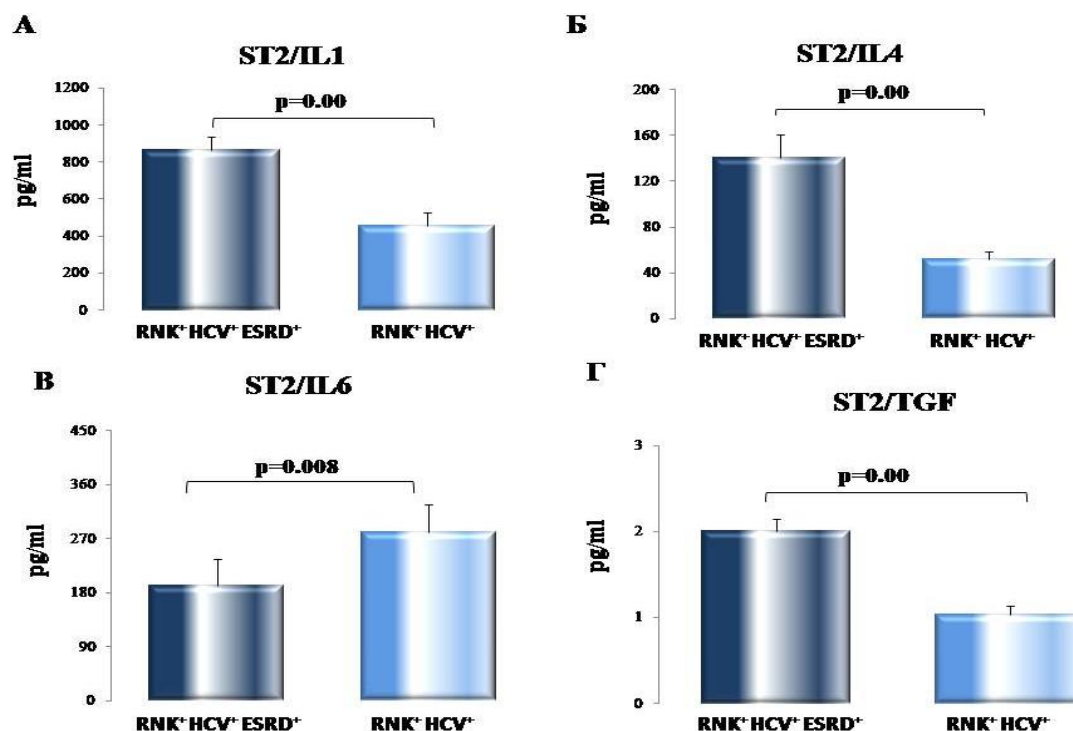
Серумске концентрације Gal-3 и цитокина код испитаника су одређене ELISA тестом.

17А: Значајно већа вредност односа Gal-3/ IL-4 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 204,21 ± 32,99 vs. 71,51 ± 9,93; p=0.00

17Б: Значајно мања вредност односа Gal-3/ IL-6 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 297,42 ± 78,93 vs. 379,25 ± 48,7; p=0.014.

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Добијена је у односима sST2 са IL-1, IL-4, IL-6 и TGF. RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници, у поређењу са RNA⁺ HCV⁺ групом, имали су значајно већи однос sST2/IL-1 (864,62 ± 71,18 vs. 457,62 ± 68,19; p=0.00; фигура 18А), sST2/IL-4 (140,78 ± 19,97 vs. 52,00 ± 6,73; p=0.00; фигура 18Б), sST2/TGF (2,00 ± 0,15 vs. 1,03 ± 0,1; p=0.00; фигура 18Г), а мањи однос sST2/IL-6 (192,12 ± 44,45 vs. 281,63 ± 44,91; p=0.008; фигура 18В).



Фигура 18. Однос серумских концентрација sST2 и IL-1, IL-4, IL-6 и TGF.

Серумске концентрације цитокина код испитаника су одређене ELISA тестом.

18А: Значајно већа вредност односа sST2/IL-1 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 864,62 ± 71,18 vs. 457,62 ± 68,19; p=0.00

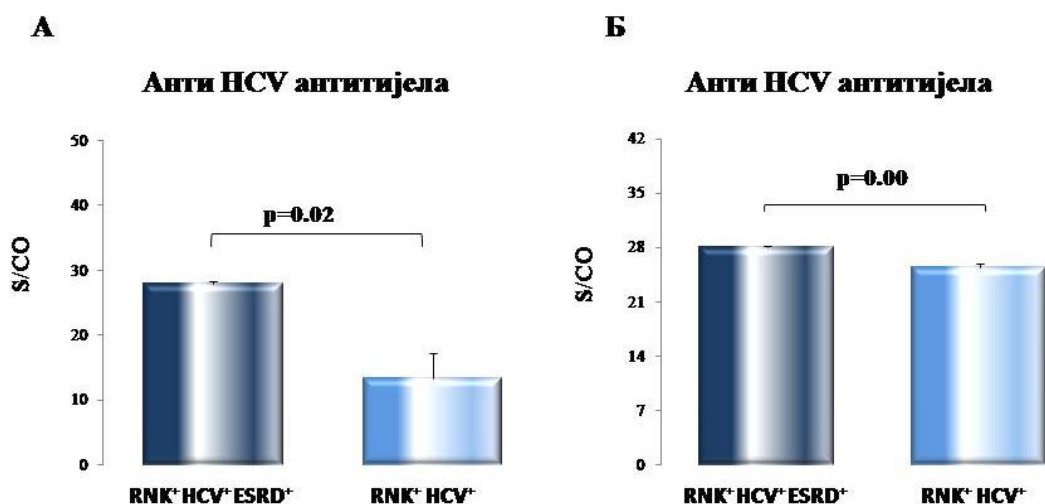
18Б: Значајно већа вредност односа sST2/IL-4 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 140,78 ± 19,97 vs. 52,00 ± 6,73; p=0.00.

18В: Значајно мања вредност односа sST2/IL-6 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 192,12 ± 44,45 vs. 281,63 ± 44,91; p=0.008.

18Г: Значајно већа вредност односа sST2/TGF у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 2,00 ± 0,15 vs. 1,03 ± 0,1; p=0.00

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Болеснике са HCV инфекцијом и терминалном бубрежном инсуфицијенцијом поделили смо на две групе у зависности од присуства вирусне RNA: RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ и RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺. У наведеним групама мјерили смо серумски концентрацију анти-HCV антителијела. Концентрација анти-HCV антителијела у серуму значајно је већи у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ групу (28,04 ± 0,26 vs. 13,43 ± 3,37 S/CO; p=0.02, фигура 19А). Такође, концентрација анти-HCV антителијела у серуму значајно је већи у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ групу (28,04 ± 0,27 vs. 25.47 ± 0.49 S/CO; p=0.00, фигура 19Б).



Фигура 19. Серумске концентрације анти HCV антитијела.

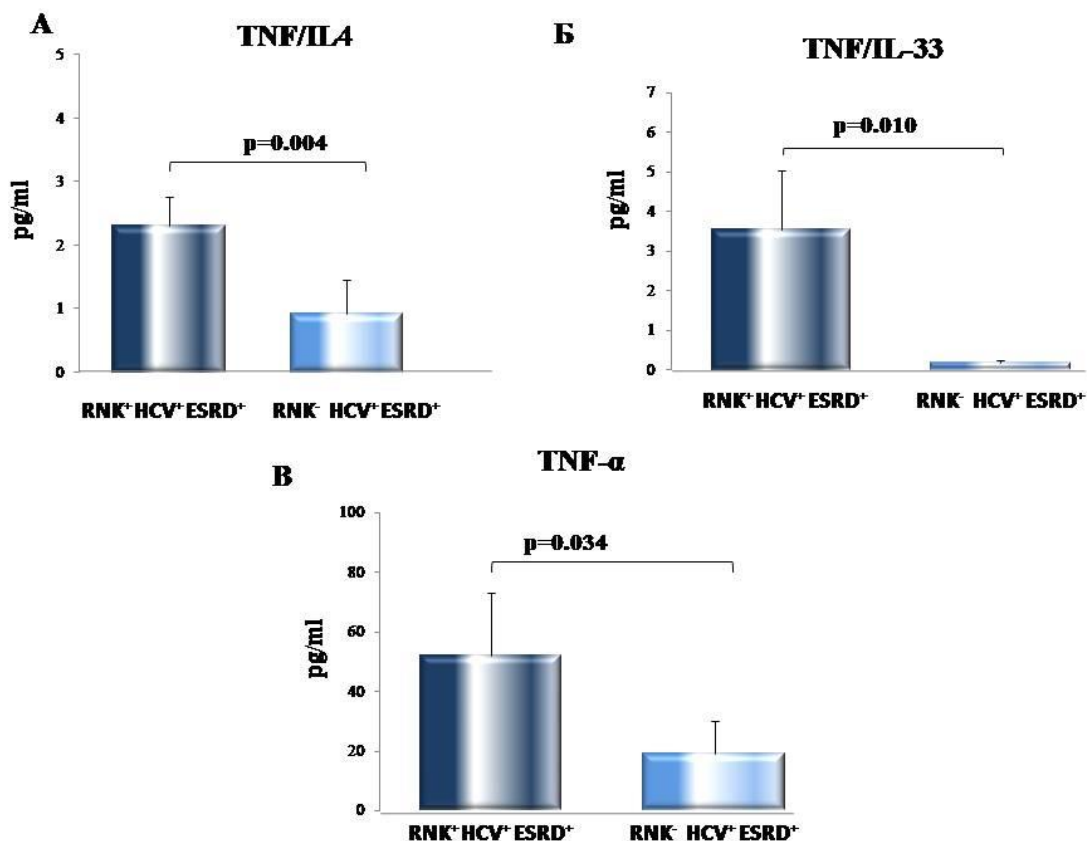
Серумска анти HCV антитијела су одређена ELISA (ELFA техника) тестом.

19А: Значајно већа концентрација анти HCV антитијела у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ болеснике: 28,04 ± 0,26 vs. 13,43 ± 3,37 S/CO; p=0.02

19Б: Значајно већа концентрација анти HCV антитијела у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁺ HCV⁺ болеснике: 28,04 ± 0,26 vs. 25,47 ± 0,49 S/CO; p=0.00

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Испитивали смо односе серумских концентрација цитокина TNF- α са IL-4 и IL-33 унутар RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ и RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ групе болесника. Анализом је показано да су системске вредности TNF- α као и односи TNF- α /IL-4 и TNF- α /IL-33 значајно већи у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ групу (TNF- α : 52,01 ± 21,28 vs. 19,30 ± 10,80 pg/ml; p=0.034, фигура 20B; TNF- α /IL-4: 2,30 ± 0,46 vs. 0,92 ± 0,53; p=0.004, фигура 20A; TNF- α /IL-33: 3,55 ± 1,48 vs. 0,18 ± 0,08; p=0.01, фигура 20Б). Односи системских вредности TNF- α и осталих мерених цитокина нису се значајно разликовали у дефинисаним групама.



Фигура 20. Серумска концентрација TNF-α и однос TNF-α и цитокина IL-4 и IL-33

Серумске концентрације цитокина код испитаника су одређене ELISA тестом.

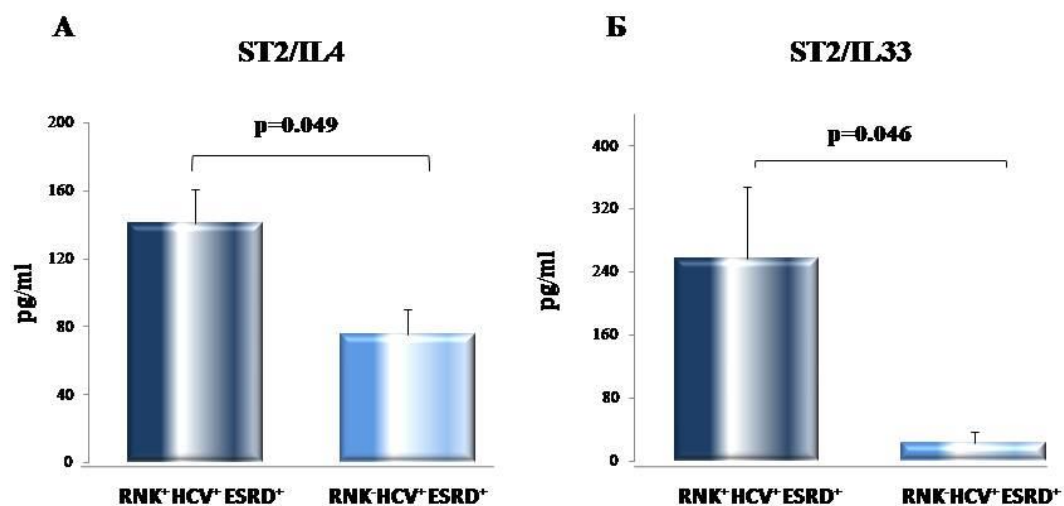
20А: Значајно већа вредност односа TNF-α /IL-4 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ болеснике: 2,30 ± 0,46 vs. 0,92 ± 0,53; p=0.004

20Б: Значајно већа вредност односа TNF-α /IL-33 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ болеснике: 3,55 ± 1,48 vs. 0,18 ± 0,08; p=0.01

20В: Уочена је статистички значајна разлика у серумским вредностима TNF-α између RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групе болесника и RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ групе. TNF-α: 52,01 ± 21,28 vs. 19,30 ± 10,80 pg/ml; p=0.034.

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Испитивали смо односе серумских концентрација sST2 са IL-4 и IL-33 унутар RNA⁺ HCV⁺ ЕSRD⁺ групe болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ ЕSRD⁺ групу (sST2/IL-4: 140,78 ± 75,4 vs. 19,67 ± 14,84; p=0.049, фигура 21А; sST2/IL-33: 257,20 ± 91,61 vs. 22,97 ± 15,06; p=0.046, фигура 21Б). Односи системских вредности sST2 и осталих мерених цитокина нису се значајно разликовали у дефинисаним групама.



Фигура 21. Однос серумских концентрација sST2 и IL-4 и IL-33.

Серумске концентрације sST2 и цитокина код испитаника су одређене ELISA тестом.

21А: Значајно већа вредност односа sST2/IL-4 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ болеснике: 140,78 ± 75,4 vs. 19,67 ± 14,84; p=0.049

21Б: Значајно мања вредност односа sST2/IL-33 у RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ групи болесника у односу на RNA⁻ HCV⁺ ESRD⁺ болеснике: 257,20 ± 91,61 vs. 22,97 ± 15,06; p=0.046

Приказане вредности су аритметичке средине. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

5. ДИСКУСИЈА

У првом диелу истраживања анализиране су серумске концентрације маркера оштећења бубрежне функције и јетре као и цитокина и галектина 3, у све четири групе испитаника (HCV⁺ ESRD⁺; HCV⁺; ESRD⁺ и здрава контрола). Серумске вредности урее, креатинина и билирубина значајно су веће код ESRD пацијената (са и без HCV инфекције). Показали смо смањени ниво ALT, AST и LDH код ESRD HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима. Нису уочене битније разлике у концентрацијама IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-17, IL-23, TGF- β и анти-HCV антителијела међу дефинисаним групама. Већа системска вредност IL-6 као и однос IL-6/IL-1 β детектована је код ESRD⁺ HCV⁺ испитаника, у поређењу са HCV⁺ као и код ESRD⁺ у поређењу са здравом контролом. По први пут смо показали да је Gal-3 био знатно повишен у серумима ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима. ESRD⁺ HCV⁺ болесници имали су знатно повишене Gal-3/IL-1, Gal-3/IL-23 и Gal-3/IL-4 односе у поређењу са HCV⁺ болесницима. Исти тренд забележен је код ESRD⁺ болесника у поређењу са контролом. Запазили смо умјерену негативну корелацију између Gal-3 и AST, као и између Gal-3 и ALT код ESRD⁺ HCV⁺ болесника.

Други део истраживања фокусиран је на HCV⁺ болеснике којима је детектована HCV RNA и који су подјелиени на RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ и RNA⁺ HCV⁺ групу. RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници имали су веће серумске концентрације урее и креатинина али мање концентрације ALT и AST, у поређењу са RNA⁺ HCV⁺ болесницима. RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници имали су веће вредности серумског TNF- α и односа TNF- α /IL-33, IL-23/IL-4, Gal-3/IL-4, sST2/IL-1 β , sST2/IL-4, sST2/IL-6, sST2/ TGF- β .

Познато је да су болесници на хемодијализи изложени великом ризику за настанак хепатитис С вирусне инфекције. HCV може бити и узрок а и посљедица обољења бубрега. Као узроку обољења можемо говорити о директној инфекцији ћелијског паренхима бубрега јер ћелије бубрега на себи имају експримиране CD81 и SR-B1 рецепторе за HCV. Везивање HCV-а за паренхим бубрега може индуковати гломерулонефритис, због екстрахепатичких манифестација и стварања имунских комплекса и следственог системског васкулитиса. А може бити и посљедица ESRD, због повећаног обољевања од различитих инфекција због ослабљеног имунског одговора у ESRD, због учесталих хемодијализа. Изложеност крви и крвним продуктима, интерна контаминација машина за хемодијализу, нозокомијално ширење и

дуго трајање дијализе главни су путеви преноса HCV-а код ESRD болесника (126, 222).

Већина истраживања се слажу да је трајање дијализе уско повезано са позитивном стопом анти-HCV антитјела (223). У нашем истраживању дужина дијализног статуса није значајно утицала на количину присутне HCV RNA, тј. виремију као ни на количину анти-HCV антитијела. У овом истраживању је утврђено да је виремија у позитивној корелацији са количином анти-HCV антитијела док висока виремија, она преко 8×10^6 IU/ml, није у корелацији са титром антитијела, тј. да са даљним повећањем виремије изнад 8×10^6 IU/ml не расте концентрација антитијела. Такође, титар антитијела није значајно зависио од генотипа вируса. Велики број студија је испитивао вирусну кинетику HCV-а прије, током и након стандардне 4-сатне сесије хемодијализе. Неке студије су откриле значајно смањење у „оптерећењу HCV вирусом“ током хемодијализе са повратком на основне нивое након 48 сати, прије следеће дијализе (224, 225). Литературни подаци говоре да HCV оптерећење код ESRD оболелих обично је ниско. Ипак, у неколико студија забиљежена су слична или већа оптерећења у поређењу са неуремичним болесницима (226-228), као и функција HCV-RNA и наизмјенична виремија (219). Две проспективне студије су показале смањење у HCV RNA нивоима, па чак и елиминацију вируса у одређеним тренуцима код хемодијализираних пацијената, али не и код неуремичних контролних субјеката (224, 229). Главни механизми за објашњавање интрадијалитичке редукције HCV-а су следећи: пролазак вируса кроз мембрану у дијализат или ултрафилтрат (230), адсорпција вируса или вирусних партикула дијализним мембранама (231, 232), редукција HCV-а факторима домаћина (225). Дистрибуција HCV генотипова је била слична онима који су пријавили и други аутори за блиске географске регије, да је HCV генотип 1 и 3 одговоран за већину инфекција, с тим што у нашој студији имамо у значајном проценту заступљен и генотип 4. У нашој студији добијена је јака позитивна корелација између измјерених вредности виремије и генотипа вируса. Виремија је била висока код болесника са генотипом 1 и 4 у односу на генотип 3.

Инфекција хепатитис С вирусом један је од најчешћих узрока обољења јетре (233). Код више од половине заражених инфекција прогредира у хроничну HCV инфекцију и постоји висок ризик од развоја хепатичне фиброзе, цирозе и хепатоцелуларног карцинома (234). Хронични хепатитис С је обично асимптоматски и углавном се детектује повећаним нивоом серумских аминотрансфераза као и

позитивним тестом на HCV антитијела (235).

Да би предвидјели или евалуирали ниво оштећења јетре, многе студије су показале значај мјерења AST и ALT током HCV инфекције. Постоје исраживања која указују да AST и ALT нису корисни маркери скрининг теста за оштећење хепатоцита. Неке студије сугеришу на то да је смањење серумских вредности AST и ALT последица редуковања вирусног оптерећења током дијализе (225, 236). Друге студије су откриле да је серумски ниво фактора раста хепатоцита знатно повишен након сесије хемодијализе и да директно стимулише митогенезу хепатоцита и регенерацију јетре, стога умањујући оштећење јетре а самим тим и серумски AST и ALT (237). Трећа група радова показује да алтерација AST и ALT зависи од системског повећања IFN- α , који расте непосредно након хемодијализе и смањује виремију и ниво AST и ALT у серумима (225, 238). Све ове студије указују на значај времена прикупљања узорка. На основу резултата, серумски AST и ALT зависе од времена узимања крви. У нашој студији, узорци крви ESRD⁺ HCV⁺ као и ESRD⁺ испитаника били су прикупљени прије дијализе, тако да временски фактор није могао утицати на ниво AST и ALT.

Открили смо смањене серумске нивое AST, LDH и ALT код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ групом. Ови резултати могу указати на блаже оштећење јетре ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима. Када је у питању ензим гама глутамил трансфераза (GGT) значајно више вриједности уочене су у групи испитаника са ESRD⁺ HCV⁺ у односу на контролну групу испитаника, док се вредности нису разликовале у односу на ESRD⁺ групу болесника. Добијени резултати су у складу са већином радова који су проучавали оштећење јетре, што указује на то да је углавном серумски ниво AST у корелацији са маркерима хепатичне инфламације и фиброзом и стога може бити објективан маркер за евалуацију оштећења јетре (239). Иако фактори који „штите“ уремичне болеснике од имунски посредованог оштећења јетре нису добро познати, постоје неке занимљиве теорије о овом парадоксу. Чини се да овај статус „редукованог имунонадзора“, а не очите „имуносупресије“, има анти-инфламацијски, заштитини ефекат на болеснике на дијализи са хроничном HCV инфекцијом. Још један од могућих патогенетских механизма који би могао објаснити профил блажег обољења хепатитиса С код ESRD⁺ болесника је тај да процедура хемодијализе повећава нивое HGF. HGF је моћан митоген за хепатоците који промовише регенерацију јетре и реституцију губитка ћелија јетре. Ниско вирусно оптерећење као фактор „окидач“

слабе имунске реакције такође се треба узети у обзир. Многе студије су показале да ESRD карактерише дисрегулација имунског система праћена промјеном ефекторских функција ћелија урођене и стечене имуности што повећава осјетљивост на инфекције (139, 140, 143). Имуносупресија је једна од многих последица хроничне бубрежне инсуфицијенције (142). Болесници на хемодијализи често „пате“ од поновљених бактеријских инфекција, имају слаб одговор на хепатитис В вакцину и чешће развијају туморе у односу на општу популацију (170). Током последњих 20 година, многе студије су се фокусирале на дисфункцију имунског система код болесника са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом. Показано је да су и целуларна и хуморална имуност измењене код ових болесника (139, 140). Моноцити/макрофаги се могу активирати али имају дефекте у опсонизацији (143). Т лимфоците карактерише смањена способност пролиферације индуковане митогеном (165, 166). Смањена експресија NKG2D рецептора и повећана синтеза његовог лиганда MICA детектовани су код болесника са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом. NKG2D рецептори су смањено експримирани код ових болесника. Претпоставља се да повећан ниво уремијских токсина (бета-2 микроглобулина) и ROS (реактивни облици кисеоника) дјелују инхибиторно на стимулацију и експресију ових рецептора. Доказано је да информациона RNA за синтезу NKG2D постоји, али да је проблем на нивоу транслације. Смањење NKG2D тј. смањена активација NK ћелија повећава осјетљивости према инфекцијама.

Смањена пролиферација Т лимфоцита сматра се, између осталог, последицом измењене функције APCs, зато што активација Т лимфоцита у великој мјери зависи од TLRs, а уочена је слабија експресија ових рецептора код ESRD због дејства уремијских токсина. Функције антиген-презентујућих ћелија, попут дендритских ћелија, такође су погоршане, стога утичући на њихову интеракцију са Т лимфоцитима (240). Ове абнормалности не могу се кориговати хемодијализом. Неки од ових дефеката су вероватно последица дејства такозваних „уремијских токсина“ (150, 151), који обухватају велики број молекула као што су β 2-микроглобулин и реактивни кисеонични радикали (енгл. Reactive Oxygen Species- ROS). Приказани резултати имплицирају да смањена функција имунског система код ESRD болесника редукује елиминацију ћелија заражених вирусом. С обзиром да су ESRD болесници у једној генералној имуносупресији очекујемо да слабији имунски одговор не може ни елиминисати вирус, као и због смањене филтрације бубрега вирус се дуже задржава у

организму док би сам поступак дијализе смањивао нивое вируса који би се враћали на почетне вредности у наредних 48 сати.

Наш следећи циљ био је анализа серумских вредности цитокина. Резултати су показали да није било значајне разлике у серумској концентрацији IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-17, IL-23, TGF- β и анти-HCV антителијела између ESRD⁺ HCV⁺ испитаника, у поређењу са HCV⁺ као и код ESRD⁺ у поређењу са здравом контролом. Како су IL-1 β , TNF- α и IL-23 проинфламацијски цитокини које секретују ћелије урођене имуности (241), сматрамо да нема значајне разлике у урођеном анти- HCV имунском одговору код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима.

Поред ћелијског имунског одговора у HCV инфекцији, хуморална имуност је такође битна у борби против вирусне инфекције (242). Хуморални имунски одговор игра значајну улогу у одбрани од HCV првенствено у акутној инфекцији гдје спречава настанак инфекције синтезом неутралишућих антителијела, али у хроничној инфекцији има мањи значај јер антителијела немају утицај на вирус који је већ ушао у ћелију. То може имати и штетан утицај због повећања продукције антителијела и стварања имунских комплекса и следственог системског васкулитиса. Серолошки налаз анти HCV антителијела је значајан за дијагностику али нам не говори о активности вируса. Опште је познато да је IL-4 један од кључних цитокина за развој хуморалног имунског одговора (243). Наши резултати су показали да нема разлике у концентрацији IL-4 у серуму ESRD⁺ HCV⁺ и HCV⁺ болесника. Штавише, нисмо пронашли разлику ни у серумској концентрацији анти-HCV антителијела између ESRD⁺ HCV⁺ и HCV⁺ болесника. Овај феномен су у складу са резултатима друге студије у којој је откривено да нема разлика у серумском нивоу IgG, IgM и IgA код ESRD⁺ болесника у поређењу са здравим контролним субјектима, што указује на то да ESRD није утицала на хуморалну компоненту антивирусног имунског одговора. Неке студије су пак показале да бубрежна инсуфицијенција утиче на компоненте ћелијског имунског одговора (250), а ипак ми нисмо пронашли разлику у системским нивоима цитокина укључених у ћелијску имуност код ESRD⁺ HCV⁺ и HCV⁺ болесника. Пошто нисмо пронашли значајне разлике у параметрима ћелијског и хуморалног имунског одговора, вјерујемо да су неки други механизми одговорни за мање оштећење јетре код ESRD⁺ HCV⁺ болесника.

Да би открили могући механизам за смањено оштећење јетре код ESRD⁺

болесника, измјерили смо системски ниво IL-6 код свих група испитаника. IL-6 је плејотропни цитокин који секретују стромалне ћелије и ћелије имунског система током инфламације (96). IL-6 је познат као хепатопротективни цитокин који игра значајну улогу у стимулацији пролиферације хепатоцита као и непаренхимских ћелија у јетри (244). Према литералним подацима, постоји неколико биолошких функција IL-6 у јетри. Током урођеног имунског одговора, Купферове ћелије производе IL-6 који игра главну улогу у индуковању производње протеина акутне фазе у јетри (245). Као додатак томе, након везивања за свој рецептор, IL-6 путем JAK1/STAT3 сигналног пута и MAP киназног пута индукује експресију многих „протективних“ гена у хепатоцитима, стимулишући на тај начин пролиферацију и преживљавање хепатоцита (246, 247).

Улога IL-6 у биологији HCV инфекција још увијек није разјашњена. Иако постоје студије који показују да, у зависности од врсте обољења, IL-6 може дјеловати као проинфламацијски или антиинфламацијски цитокин (248), ми сматрамо да IL-6 игра протективну улогу код ESRD⁺ HCV⁺ болесника. Наиме, открили смо знатно веће системске вредности IL-6 код ESRD⁺ HCV⁺ у поређењу са HCV⁺ болесницима. Такође, измерили смо веће серумске концентрације IL-6 код ESRD⁺ болесника у поређењу са групом здравих контролних субјеката, што указује на то да је повећање IL-6 код ESRD⁺ HCV⁺ болесника вјероватно посљедица бубрежне дисфункције. Многе студије су показале да ESRD у старту има повећане вредности цитокина прије свега проинфламацијских али оне као такве нису доказ појачаног имунског одговора већ су последица смањене филтрације кроз бубреге и зато се дуже задржавају у циркулацији. Да би избјегли ове лажно позитивне резултате ми смо се фокусирали на односе системских вредности контрарегулаторних цитокина и поредили нпр. проинфламацијске и антиинфламацијске, односно хепатопротективне цитокине. Однос IL-6/IL-1 β био је знатно виши код ESRD⁺ HCV⁺ у поређењу са HCV⁺ болесницима. У складу са претходно описаним механизмима дјеловања, вјерујемо да повишени системски ниво IL-6 код ESRD⁺ HCV⁺ испитаника штити јетру од вирусне деструкције следствено смањујући системски AST и ALT и стимулише регенерацију јетре. Штавише, повећани IL-6/IL-1 β однос код ESRD⁺ HCV⁺ болесника указује на то да хепатопротективна улога IL-6 надвладава проинфламацијску улогу IL-1 β код ових испитаника.

Како су претходне студије показале потенцијалне механизме деловања Gal-3 као антиинфламаторног маркера и протективног маркера за ткива, наше истраживање је усмерено на испитивање Gal-3 код коморбидитета ESRD и HCV инфекције. Пронашли смо повећану серумску концентрацију Gal-3 у групи ESRD⁺ HCV⁺ у поређењу са HCV⁺ болесницима, као и код ESRD болесника у поређењу са здравом контролом. Штавише, ESRD⁺ HCV⁺ болесници имали су знатно веће односе Gal-3/IL-1 β , Gal-3/IL-4 и Gal-3/IL-23 у поређењу са HCV⁺ болесницима. Такође смо покушали одредити потенцијалну корелацију између серумског нивоа Gal-3 и маркера оштећења јетре, попут ALT и AST. У групи ESRD HCV⁺ болесника показали смо негативну корелацију између Gal-3 и AST и ALT.

Опште је познато да се током оксидативног стреса, реактивне врсте кисеоника, као и други токсични продукти, акумулирају у ћелији и индукују стварање разградних продуката гликације (енгл. advanced glycation end products- AGEs) (249). AGEs, липиди и протеини који постају гликолизирани као резултат излагања оксидативним радикалима синтетишу се током различитих обољења као што су дијабетес, атеросклероза, хронично обољење бубрега и везују се за рецептор (RAGE) стимулишући оксидативни стрес у ћелији и локалну инфламацију (250). Gal-3 инхибира AGE-RAGE сигнални пут компетитивним инхибирањем везивања AGE за RAGE или блокирањем „утишавањем“ експресије RAGE гена и следствено супримира RAGE-индуковану инфламацију у ткиву (251). Други могући механизам дјеловања Gal-3 је директна инхибиција ћелијског имунског одговора инхибирањем интеракције између Т лимфоцита и антиген-презентујућих ћелија (APC) (186).

Иако се показало да галектини функционишу екстрацелуларно, гдје су преодминантно њихови лиганди гликани, све више је доказа који указују на њихове интрацелуларне функције (252, 253). Раније је показано да галектин-3 регулише фагоцитозу макрофага и производњу медијатора у мастоцитима преко својих интрацелуларних акција (187). Овај протеин локализован на цитоплазматској страни имунске синапсе испољава свој инхибиторни ефекат у Т лимфоцитима, дјелујући такође интраћелијски.

Студије које су се бавиле испитивањем интеракције Т-лимфоцита и APC указују да експресија Gal-3 у Т лимфоцитима индукује слабо везивање ових ћелија за APC, што објашњава његову инхибиторну улогу у активацији Т-лимфоцита. Овај феномен

потврђују већи степен миграције Т лимфоцита даље од APC и нижи степен везивања Т лимфоцита за APC, код повећане експресије Gal-3.

Као још један од разлога слабије повезаности CD4⁺ Т лимфоцита и APC наводи се смањена експресија Т ћелијског рецептора (TCR-а) на лимфоцитима посредована галектином-3 (186). Осим тога, Gal-3 негативно утиче на адхеренцију CD4⁺ Т лимфоцита и APC, на нивоу имунске синапсе. У процесу интеракције CD4⁺ Т-лимфоцита и APC, експресија Gal-3 у Т лимфоцитима је у негативној корелацији са снагом интеракције, али у позитивној корелацији са стопом дисоцијације конјугованих ћелија, што указује да Gal-3 дестабилизује синапсу (186).

Током HCV инфекције, вирусом кодирани структурни као и неструктурни протеини индукују апоптозу хепатоцита и следствено оштећење јетре (254). Антиапоптотска улога Gal-3 добро је дефинисана. Показано је да Gal-3 штити интегритет митохондријалне мембране, инхибира ослобађање цитохрома С и стога штити ћелију од програмиране смрти (255). Ова протективна улога је карактеристика интраћелијског Gal-3. Ова функција Gal-3 у вези са његовом тенденцијом за транслокацијом у унутарћелијске мембранске структуре. Скорија студија описала је преузимање екстраћелијског Gal-3 и акумулацију у цитоплазми (256). Описана је транслокација Gal-3 у митохондрије, у ћелијама третираним стимулаторима апоптозе (257), као и на фагозомима у макрофагима током фагоцитозе (187), и акумулација у липидном дијелу на мембрани дендритских ћелија (258). Узимајући све наведено у обзир, Gal-3 би могао проћи мембрану хепатоцита и интрацелуларно стабилизovati митохондријалну мембрану, и тако инхибира активацију каспаза и спречава апоптозу и оштећење јетре (259).

На основу ових налаза, сматрамо да Gal-3 дјелује хепатопротективно код ESRD⁺ HCV⁺ болесника на најмање два начина: инхибицијом локалне инфламације и следствене деструкције хепатоцита и путем инхибиције апоптозе. Ови феномени се осликавају у нижим серумским вредностима AST и ALT и негативној корелацији Gal-3 и AST и ALT.

ESRD⁺ HCV⁺ болесници имали су знатно веће односе Gal-3/IL-1 β , Gal-3/IL-4 и Gal-3/IL-23 у поређењу са HCV⁺ болесницима. За разлику од студија о улози галектина-3 и Th1 / Th2 поларизацији, оскудни су литературни подаци о улози галектина-3 у Th17

поларизацији. Недавно су, Radosavljević и сар, детектовали висок ниво IFN- γ и IL-17 код Gal3^{-/-} мишева оболелих од меланома. Иако улога IL-17 у промоторском и антитуморском одговору остаје контроверзна, њихови налази указују на то да галактин-3 може негативно регулисати Th1 и Th17 одговор код туморских модела.

У наставку студије испитивана је улога IL-33/ST2 сигналног пута. IL-33 је идентификован, када су Schmitz и сарадници анализирајући чланове IL-1 фамилије открили лиганд за ST2L (260). IL-33 је конститутивни производ ћелија ткива пре него активираних леукоцита који су класичан извор проинфламаторних цитокина (261, 262). Различите ћелије могу бити стимулисане да произведу и ослободе IL-33, као и да су активирани леукоцити значајан извор IL-33 (261). Како би ослободиле IL-33, ћелије имунског система морају бити стимулисане активацијом TLR рецептора или дејством проинфламаторних цитокина (261). Локализован у једру, IL-33 се пасивно ослобађа након оштећења ћелија због чега је нуклеарни IL-33 попут HMGB1 и IL-1 α означен као алармин или молекулски образац повезан са оштећењем (DAMP) (262, 263). Серумске вредности цитокина IL-33 као и sST2 који представља рецептор мамац за IL-33 одређиване су у свим групама испитаника. Детектоване серумске концентрације IL-33 нису се значајно разликовале између група, с тим што су забиљежене нешто веће вриједности у ESRD⁺ HCV⁺ као и у ESRD⁺ групи. Показано је и да су HCV⁺ ESRD⁺ болесници имали повећан ниво sST2 у поређењу са HCV⁺ болесницима. Мјерен је и однос серумске концентрације sST2 са проинфламацијским и имуносупресивним цитокинима. Анализом односа показано је да су односи sST2/IL-1 β , sST2/IL-4 и sST2/IL-23 значајно већи у ESRD⁺ HCV⁺ групи болесника у односу на HCV⁺ групу. Ови резултати указују на преминацију sST2 над проинфламацијским цитокинима одговорним за развој потентног антивирусног одговора и следственог оштећења ткива. Ранија истраживања су показала да се sST2 везује за површину макрофага и узрокује да они значајно смање продукцију проинфламацијских цитокина, TNF- α , IL-6, IL-12, као и експресију TLR1 и TLR4. Истовремено sST2 не утиче на продукцију антиинфламацијских медијатора: IL-10, TGF- β , као и на продукцију NO, у истом моделу стимулације са LPS-ом (264). Један од прихватљивих модела антиинфламаторне улоге солубилног sST2 је: продукти микроорганизама подстичу ћелије урођене имуности на каскадну продукцију проинфламацијских цитокина IL-1 α , IL-6, IL-12, IL-18 и TNF- α као и адхезионих молекула и других медијатора запаљења (265). PAMPs активирају

макрофаге, фибробласте и друге типове ћелија да продукују sST2. Тада се sST2 везује директно за ћелије урођене имуности и инхибира проинфламацијски одговор негативном повратном спрегом, највероватније инактивацијом TLRs (266). Дакле, sST2 функционише као значајан учесник негативне повратне спреге за спречавање неконтролисане запаљенске реакције.

Базални ниво HCV RNA и генотип су параметри за започињање антивирусне терапије и праћење њеног ефекта. Лијечење се одвија према дефинисаним терапијским протоколима биолошке антивирусне терапије код пацијената на хемодијализи са хроничном бубрежном болести и HCV инфекцијом. За развој хроничних компликација и утврђивања оптималног тренутка за увођење терапије, сви болесници са HCV су потенцијални кандидати за антивирусно лијечење у циљу спречавања компликација, те их треба континуирано пратити и контролисати вредности HCV RNA у серуму/плазми молекуларним методама (PCR). Рано откривање хроничне HCV инфекције, постављање егзактне дијагнозе, одговарајуће лијечење дају реалну наду за излечење. Други део истраживања фокусиран је на HCV⁺ болеснике којима је детектована HCV RNA и који су подељени на RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ и RNA⁺ HCV⁺ групу. RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници имали су повишене серумске концентрације урее и креатинина али ниже концентрације ALT и AST, у поређењу са RNA⁺ HCV⁺ пацијентима. RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници имали су веће вредности серумског TNF- α и односа TNF- α /IL-33, IL-23/IL-4, Gal-3/IL-4, sST2/IL-1 β , sST2/IL-4, sST2/IL-6, sST2/ TGF- β . Терминална бубрежна инсуфицијенција је праћена преминацијом sST2 над проинфламацијским цитокинима одговорним за развој потентног антивирусног одговора и следственог оштећења ткива код RNA⁺ HCV⁺ болесника.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Резултати приказани у овом раду по први пут указују на мање оштећење јетре код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима. Повећане системске вредности IL-6 и Gal-3 код ESRD⁺ HCV⁺ болесника могу представљати механизам заустављања и ограничавања проинфламацијског процеса и спречити вирусом посредовано оштећење ткива јетре, указујући на до сада непрепознату улогу Gal-3 у биологији HCV инфекције код ESRD⁺ болесника.

Закључак је изведен на основу следећих доказа:

1. Смањен ниво ALT, AST и LDH код ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима;
2. Нема разлике у концентрацијама IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-17, IL-23, TGF- β , IL-33, sST2 и анти-HCV антитијела међу дефинисаним групама (ESRD⁺ HCV⁺ vs. HCV⁺);
3. Већа системска вредност IL-6 као и однос IL-6/IL-1 β детектована је код ESRD⁺ HCV⁺ испитаника, у поређењу са HCV⁺ као и код ESRD⁺ у поређењу са здравом контролом;
4. Односи sST2/IL-1 β , sST2/IL-4 и sST2/IL-23 значајно су већи у ESRD⁺ HCV⁺ групи болесника у односу на HCV⁺ групу;
5. Gal-3 је знатно повишен у серумима ESRD⁺ HCV⁺ болесника у поређењу са HCV⁺ болесницима.
6. ESRD⁺ HCV⁺ болесници имали су знатно веће односе Gal-3/IL-1 β , Gal-3/IL-23 и Gal-3/IL-4 у поређењу са HCV⁺ болесницима. Исти тренд забележен је код ESRD⁺ болесника у поређењу са контролом;
7. Серумска концентрација Gal-3 негативно корелира са вредностима AST и ALT у серуму, код ESRD⁺ HCV⁺ болесника.
8. RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници имају повишене серумске концентрације урее и креатинина али ниже концентрације ALT и AST, у поређењу са RNA⁺ HCV⁺ болесницима;
9. RNA⁺ HCV⁺ ESRD⁺ болесници имају веће вредности серумског TNF- α и однос TNF- α /IL-33, IL-23/IL-4, Gal-3/IL-4, sST2/IL-1 β , sST2/IL-4, sST2/IL-6, sST2/ TGF- β , у поређењу са RNA⁺ HCV⁺ болесницима.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

ALT	аланин-аминотрансфераза
AST	аспартат-аминотрансфераза
BD	(Becton Dickinson Company –BD)
CTL	цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T Lymphocytes)
DAA	(engl. direct acting antivirals)
DNA	(енгл. Deoxyribonucleic acid)
RBC	број еритроцита
EDTA	(етилен-диамино-тетрасирћетна киселина)
ELISA	(енгл. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ELFA	(енгл. Enzyme Linked Fluorescent Assay)
ESRD	фази бубрежна болест у завршној
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
GCP	(енгл. Good Clinical Practice).
GGT	гама-глутамилтрансфераза
GLDH	глутамат дехидрогеназа
HCV	Хепатитис С вирус
HCL	хлороводонична киселина
HVR	хиперваријабилни регион
IL	интерлеукин (енгл. Interleukins)
IFN-γ	интерферон гама (енгл. Interferon-gama)
IFN	интерферон (енгл. Interferon)
IkBα	инхибитор транскрипционог фактора НК- κ B- α (енгл. Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)
ICSH	(Internacional Council for Standardiyation in Haematology).
iNKT	инваријантне НКТ хелије (енгл. Invariant natural killer T)
IMCs	незреле мијелоидне хелије (енгл. Immature myeloid cells)
IFCC	(енгл. International Federation for Clinical Chemistry and laboratory Medicine)
KDIGO	(engl. Kidney Disease: Improving Global Outcomes)
LDH	лактат-дехидрогеназа
MHD	(engl. maintenance hemodialysis)

MUP	(енгл. Methyl-umbelliferyl fosfat)
NADH	никотин-амид динуклеотид
NF-κB	нуклеарнифакторраста(енгл. Nuclearfactorκappa-light-chain-enhancer of activatedBcells)
NGF	(енгл. Nervegrowth factor),
NK ћелије	урођенеубилачкећелије(енгл. NaturalKillerCells)
NKG2D	активационицецептор (енгл. NaturalKillerGroup 2, MemberD)
NKT	(енгл. NaturalkillerTcell)
NS	неструктурни протеин
NTR	(некодирајући региони)
ORF	(отворени оквир читанја)
PCR	(енгл. Polimerasis complex.....)
PI	protease inhibitors
RNK	рибонуклеинскакиселина
ROS	(енгл. Reactive Oxygen Species)
RT- PCR	(реверзна транскриптаза PCR)
RFV	референтна вредност
STAT	(енгл. SignalTransducerandActivationof transcription)
SPR	Solid Phase Receptacle
ТБИ	терминална бубрежна инсуфицијенција
ТК	тимидин киназа
Th ћелије	помагачкиТлимфоцити (енгл. Thelpercells)
TLR	(енгл. Tolllikereceptor)
TIR	(енгл. Toll-IL-1рецептор) Treg регулаторни Тлимфоцити
TNF	факторнекрозетумора(енгл. Tumornecrosisfactor)
TGF-β	трансформишућифакторрастабета(енгл. Transforminggrowth factor β)
TV	тест вредност
RFV	референтна вредност
WBC	број леукоцита

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol. Infect.* 2011;17:107–115.
2. Tait JM, Wang H, Stephens BP, Miller M, McIntyre PG, Cleary S, Dillon JF. Multidisciplinary managed care networks-Life-saving interventions for hepatitis C patients. *J Viral Hepat.* 2017;24:207-215.
3. Hoshida Y, Fuchs BC, Bardeesy N, Baumert TF, Chung RT. Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2014;61:S79-90.
4. Yu JC, Wang Y, He CL, Wang MR, Wang YM. Management of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *World J Hepatol.* 2014;6:419–425.
5. Da Silva NM, Germano FN, Mendoza-Sassi RA, Seuánez HN, Soares MA, de Martinez AM. Evidence of association between hepatitis C virus genotype 2b and nosocomial transmissions in hemodialysis centers from southern Brazil. *Viol J.* 2013;29:10:167.
6. Pozzetto B, Memmi M, Garraud O, Roblin X, Berthelot P. Health care-associated hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2014;20:17265-17278.
7. Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, et al. Flaviviridae. In Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV.* 2005;979-996.
8. Rinonce HT, Yano Y, Utsumi T, Heriyanto DS, Anggorowati N, Widasari Di, Lusida MI, Soetjipo, Prasanto H, Hotta H, Hayashi Y. Hepatitis B and C virus infection among hemodialysis patients in Yogyakarta, Indonesia: Prevalence and molecular evidence for nosocomial transmission. *J Med Virol.* 2013;85:1348-1361.
9. Jawetz, Melnick, Adelberg's. *Medical Microbiology.* In: Geo FB, Karen, CC, Janet S. B, Stephen AM. 23rd Int. edition Pp.466-486 McGraw Hill publisher. 2004.
10. Meier V, Ramadori G. Hepatitis C virus virology and new treatment targets. *Expert Review Antiviral Infect Ther.* 2009;7:329-350.

11. Jovanović T, Marković Lj. *Virusologija, Medicinski fakultet. Valjevo print, Beograd.* 2008;264:943-949.
12. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, Hoegh AM, Bukh J. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: Role of CD81 and scavenger receptor class b type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology.* 2009;49:364-377.
13. Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Boil.* 2009;510:33-53.
14. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 2005;436:933–938.
15. Bartenschlager R, Cosset FL, Lohmann V. Hepatitis C virus replication cycle. *J. Hepatology.* 2010;53:583–585.
16. Lohmann V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:167–198.
17. Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol.* 1994;68:5063-5073.
18. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;242:55-84.
19. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:482–496.
20. Penin F. Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2003;7:1-21.
21. Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A. The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 2001;7:661-670.
22. Liu M, Ding H, Zhao P, Qin ZL, Gao J, Cao MM, Luan J, Wu WB, Qi ZT: RNA interference effectively inhibits mRNA accumulation and protein expression of hepatitis

- C virus core and E2 genes in human cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:2049-2055.
23. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:87–112.
 24. Khan A.G, Whidby J, Miller M.T, Scarborough H, Zatorski A.V, Cygan A, Price AA, Yost SA, Bohannon CD, Jacob J, Grakoui A, Marcotrigiano J. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature.* 2014;509:381–384.
 25. Carrere-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, Belouzard S, Penin F, Dubuisson J. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem.* 2004; 279:41384-41392.
 26. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo, QL, Houghton M et al. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology.* 1991;180:842-8.
 27. Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol.* 2007;81:8374–8383.
 28. Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel A.H, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 2007;3,e103.
 29. Shindo M, Hamada K, Koya S, Arai K, Sokawa Y, Okuno T. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology.* 1996;24:1018-1023.
 30. Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 2003;77:3181–3190.
 31. Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V. Membrane association of the RNA- dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 2004;78:13278-13284.

32. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Male P.J, Mentha G, Spahr L, Zarski JP, Borisch B, Hadengue A, Negro F. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol.* 2000;33:106–115.
33. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol.* 2009;50:1142–1154.
34. Lee MH, Yang HI, Lu SN, Jen CL, Yeh SH, Liu CJ, Chen PJ, You SL, Wang LY, Chen WJ, Chen CJ. Hepatitis C virus seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: long-term predictors from a community-based cohort study. *J Clin Oncol.* 2010;28:4587–4593.
35. Ishiguro S, Inoue M, Tanaka Y, Mizokami M, Iwasaki M, and Tsugane S. Impact of viral load of hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based cohort study (JPHC Study). *Cancer Lett.* 2011;300:173–179.
36. Nešković G, Jovanović-Ćupić S, Živković J, Spasojević-Tišma VD. Molekularna biologija hepatitis C virusa. *Acta infectologica Iugoslavica.* 2003;8:5-11.
37. Shuklla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequence and sequence of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol.* 1995;140:1747-1761.
38. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology.* 1995;21:570-583.
39. Simmonds P, Holmes E. C, Cha T.-A, Chan S.-W, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap P. L, Kolberg J and Urdea M. S. 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.
40. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005;42:962-973.
41. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol.* 2004;85:3173-3188.

42. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV):gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 2005;5:129–151.
43. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Shimotohno K, Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Comm.* 1991;175:220-228.
44. Miyasaka Y, Enomoto N, Kurosaki M, Sakamoto N, Kanazawa N, Kohashi T, Ueda E, Maekawa S, Watanabe H, Izumi N, Sato C, Watanabe M. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits tumornecrosis factor-alpha-mediated apoptosis in Huh 7 cells. *J Infect Dis.* 2003;188:1537-1544.
45. Mc Lauchlan J. Propertis of hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat.* 2000;7:2-14.
46. Deliћ D, Nikoliћ P, Božić M. Virusni hepatitisi, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd. 1998;148-183.
47. Deliћ D, Simonović J, Švirtlih N, Korać M, Urošević A, et al. Epidemiološke karakteristike hepatitis C infekcije u Srbiji, *Medicinska istraživanja*, 2008;(42) /sveska 2/
48. Rosen HR. "Clinical practice. Chronic hepatitis C infection". *The New England Journal of Medicine.* 2011;364:2429–2438.
49. Nožić D. Imunopatogeneza hronične hepatitis C virusne infekcije. *Acta infectologica Iugoslavica.* 2003;8:25-29.
50. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2003;7:89-105.
51. Jesse Civan MD, Hie-Won Hann MD. Hepatitis C Virus Mediated Hepatocellular Carcinoma: A Focused Review for a Time of Changing Therapeutic Options. *N A J Med Sci.* 2014;7:8-16.
52. Lazarević I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. *WorldJ . Gastroenterol.* 2014;20:653-7664.

53. Chan C, Wang Y, Chow PK, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. Altered binding site selection of p53 transcription cassettes by hepatitis B virus X protein. *Mol Cell Biol.* 2013;33:485-497.
54. Sung WK, Zheng H, Li S, Chen R, Liu X, Li Y et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44:765-769.
55. Nakayama E, Akiba T, Marumo F, Sato C. Prognosis of anti-hepatitis C virus antibody-positive patients on regular hemodialysis therapy. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1896-1902.
56. Slaviček J, Puretić Z, Ostojić R, Glavaš-Boras S, Bubić-Filipi Lj, Šmalcelj R, Mihaljević I, Grahovac B, Barišić I, Šešo-Šimić Đ. Liječenje hepatitisa C alfa interferonom u bolesnika na kroničnoj hemodijalizi. *Acta Med Croatica* 2001;55(Supl.4):111-112.
57. NIH Consensus development Conference Statement: Management of hepatitis C: *Hepatology* 2002;36(suppl 1):3-20.
58. Dumeaux D, Marcellin P, Lerebours E, Treatment of hepatitis C. The 2002 French Consensus. *Gut* 2003; 52:1784-1787.
59. Gupta E, Bajpai M, Aashish Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci.* 2014;8:19–25.
60. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of Immune Dysfunction in End-stage Renal Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1526–1533.
61. Wasley A, Alter MJ, Epidemiology of Hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* 2000;20:1-16.
62. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13:2436-2441.
63. Perez RM, Ferraz ML, Figueiredo MS, Contado D, Koide S, Ferreira AP, Cendoroglo Neto M, Medina Pestana JO, Silva AE. Unexpected distribution of hepatitis C virus

- genotypes in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. *J Med Virol* 2003;69:489-494.
64. Selcuk H, Kanbay M, Korkmaz M, Gur G, Akcay A, Arslan H, Ozdemir N, Yilmaz U, Boyacioglu S. Distribution of HCV genotypes in patients with end-stage renal disease according to type of dialysis treatment. *Dig Dis Sci*. 2006;51:1420-1425.
65. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:223–235.
66. Marinaki S, Boletis JN, Sakellariou S, Delladetsima IK. Hepatitis C in hemodialysis patients. *World J Hepatol*. 2015;7:548–558.
67. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. 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.
68. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:12766-12771.
69. Minuk GY. The influence of host factors on the natural history of chronic hepatitis C viral infections. *J of Viral Hepatitis*. 1999; 6:271-276.
70. Tseng, C.T. and Klimpel, G.R. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med*. 2002;195:43–49.
71. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest*. 2009;119:1745-1754.
72. Walker CM. Adaptive immunity to the hepatitis C virus. *Adv Virus Res*. 2010;78:43-86.
73. Thimme R, Chang KM, Pemberton J, Sette A, Chisari FV. Degenerate immunogenicity of an HLA-A2-restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51. *J Virol*. 2001;75:3984-3987.
74. Sabo MC, Luca VC, Prentoe J, Hopcraft SE, Blight KJ, Yi M, Lemon SM, Ball JK, Bukh J, Evans MJ, Fremont DH, Diamond MS. Neutralizing Monoclonal Antibodies

- against Hepatitis C Virus E2 Protein Bind Discontinuous Epitopes and Inhibit Infection at a Postattachment Step. *J Virol.* 2011;85:7005-7019.
75. Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, Emerson SU, Cosset FL & Purcell RH. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:14199-14204.
76. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM & McKeating JA. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10149-10154.
77. Netski DM, Mosbrugger T, Depla E, Maertens G, Ray SC, Hamilton RG, Roundtree S, Thomas DL, McKeating J & Cox A. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis.* 2005;41: 667-675.
78. Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, Valiga ME, Ikeda F, Aytaman A, Nunes FA, Lucey MR, Vance BA, Vonderheide RH, Reddy KR, McKeating JA, Chang KM. . Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 2007;132:654-666.
79. Zeisel MB, Cosset FL & Baumert TF. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2008;48:299-307.
80. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2003;77:68-76.
81. 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.
82. Ferrari C, Urbani S, Penna A, Cavalli A, Valli A, Lamonaca V, Bertoni R, Boni C, Barbieri K, Uggeri J, Fiaccadori F. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 1999;31:31-38.

83. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:15661-15668.
84. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T helper and a T- killer cell. *Nature*. 1998;393:474-478.
85. Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung RT, Walker BD. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol*. 2005;175:3603-3613.
86. Biron CA. Cytokines in the generation of immune response to, and resolution of, virus infection. *Curr Opin Immunol*. 1994; 6:530-538.
87. 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.
88. Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology*. 1996;23:909-916.
89. Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, Penna A, Levrero M, De carli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Natural variants of cytotoxic epitopes are Tcell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature*. 1994;369:407-410.
90. Chen CC, Yang SY, Liu CJ, Lin CL, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Chen PJ, Chen CJ, Yu MW. Association of cytokine and DNA repair gene polymorphisms with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Epidemiol*. 2005; 34:1310-1318.
91. Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis*. 1999;19:157-169.
92. Fan XG, Liu WE, Li CZ, Wang ZC, Luo LX, Tan DM, Hu GL, Zhang Z. Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. *Med Inflamm*. 1998;7:295-297.

93. Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW. Generation of polarized antigen- specific CD8 effector populations: Reciprocal action of interleukin (IL) – 4, and IL- 12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med.* 1994;180:1715-1728.
94. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Seventh edition, Elsevier 2012;225-243.
95. Liu ML, Xu G, Xue SR, Zhong XC, Chen GX, Chen ZJ. Plasma levels of Th1/Th2 type cytokine are associated with change of prolactin and GH/IGF-I in hemodialysis patients. *Int J Artif Organs.* 2008;31:303-8.
96. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015;16:448-457.
97. Moschen AR., Fritz T, Clouston AD, Rebhan I, Bauhofer O, Barrie HD et al. IL-32: A new proinflammatory cytokine involved in HCV-related liver inflammation and fibrosis. *Hepatology.* 2011;53:1819–1829.
98. Fuertes M.B, Woo S.R, Burnett B, Fu Y.X, and Gajewski T.F. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol.* 2013;34:67–73.
99. Pikarsky E, Porat R.M, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004;431:461–466.
100. Luedde T. and Schwabe R.F. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8:108–118.
101. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med.* 2006;45:183-91.
102. Falkowska E, Kajumo F, Garcia E, Reinus J, Dragic T. Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol.* 2007;81:8072-8079.

103. Helle F, Goffard A, Morel V, Duverlie G, McKeating J, Keck ZY, Fong S, Penin F, Dubuisson J, Voisset C. The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol.* 2007;81:8101-8111.
104. Zhang P, Wu CG, Mihalik K, Virata-Theimer ML, Yu MY, Alter HJ, Feinstone SM. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 8449-8454.
105. Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, Ciesek S, Friesland M, Herrmann E, Zeisel MB, Baumert TF, Keck ZY, Fong SK, Pécheur EI, Pietschmann T. Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol.* 2010;84:5751-5763.
106. Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology.* 2008;47:17-24.
107. Witteveldt J, Evans MJ, Bitzegeio J, Koutsoudakis G, Owsianka AM, Angus AG, Keck ZY, Fong SK, Pietschmann T, Rice CM, Patel AH. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol.* 2009;90:48-58.
108. Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, Timpe JM, Krieger SE, Baumert TF, Tellinghuisen TL, Wong-Staal F, Balfe P, McKeating JA. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol.* 2011;85:596-605.
109. Shapel H, Haeney M, Misbah S and Snowden N. Essentials of Clinical immunology, Gastrointestinal and Liver Diseases. WileyBlackwell. Sixtin edition. 2014;281-282.
110. Ramshaw IA, Ramsay AI, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, Ruby JC. Cytokines and immunity to viral infections. *Immunological Reviews.* 1997;159:119-135.
111. Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, INF γ). *Curr Opin Immunol.* 1997;9:17-23.

112. Hoare JM, Forton DM. Current concepts in viral hepatitis. *J R Coll Physicians Lond.* 2000;34:481-484.
113. Osna N, Silonova G, Vilgert N, Hagina E, Kuse B, Giedraitis B, Zvirbliene A, Mauricas M, Sochnev A. Chronic hepatitis C : T-helper 1/ T-helper 2 imbalance could cause virus persistence in peripheral blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 1997;57:703-710. (113)
114. Woitas RP, Lechmann M, Jung G, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U. CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol.* 1997;159:1012-1018.
115. Chang MK, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loidis J, McHutchison JG, Alter HJ, Chisari FV. Differential CD4+ i CD8+ T cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2001; 33:267-276.
116. Abayli B, Canataroglu A, Akkiz H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Turk J Gastroenteroi.* 2003;14:7-11.
117. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today.* 1996;17:138-146.
118. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012; 380:2095-2128.
119. Haroun MK, Jaar BG, Hoffman SC, Comstock GW, Klag MJ, Coresh J. Risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2934-2941.
120. Ojo A. Addressing the global burden of chronic kidney disease through clinical and translational research. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2014; 125:229-243.

121. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;1:e0158765.
122. Kalantar-Zadeh K, Kilpatrick RD, McAllister CJ, Miller LG, Daar ES, Gjertson DW, Kopple JD, Greenland S. Hepatitis C virus and death risk in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1584–1593.
123. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49:1335–1374.
124. Li Cavoli G, Zagarrigo C, Schillaci O, Servillo F, Tralongo A, Coglitore M, Spadaro F, Scimeca C, Li Destri N, Rotolo U. Hepatitis C virus core antigen test in monitoring of dialysis patients. *Hepat Res Treat*. 2012;2012:832021.
125. Fabrizi F, Fred Poordad and Paul Martin². Hepatitis C Infection and the Patient With End-Stage Renal Disease. *Hepatology*. 2002;36:3-10.
126. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Brezina M, Cole MJ, Gerosa S, Vinson S, Mousa M, Gittnick G. Acquisition of hepatitis C virus in hemodialysis patients: a prospective study by branched DNA signal amplification assay. *Am J Kidney Dis*. 1998;31:647-654.
127. Alavian SM. A shield against a monster: Hepatitis C in hemodialysis patients. *World J Gastroenterol*. 2009;15:641–646.
128. Agarwal SK, Dash SC, Gupta S, Pandey RM. Hepatitis C virus infection in haemodialysis: the 'no-isolation' policy should not be generalized. *Nephron Clin Pract*. 2009;111:133-140.
129. De Jesus Rodrigues de Freitas M, Fecury AA, de Almeida MK, Freitas AS, de Souza Guimarães V, da Silva AM, da Costa YF et al. Prevalence of hepatitis C virus infection and genotypes in patient with chronic kidney disease undergoing hemodialysis. *J Med Virol*. 2013;85:1741-17455.
130. Natov SN¹, Pereira BJ. Hepatitis C virus in chronic dialysis patients. *Minerva Urol Nefrol*. 2005;57:175-197.

131. Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH, Miller RH, and The Copenhagen Dialysis HCV Study Group. High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. *J Infect Dis.* 1993;168:1343-1348.
132. Okuda K, Hayashi H, Kobayashi S, Irie Y. Mode of hepatitis C infection not associated with blood transfusions among chronic hemodialysis patients. *J Hepatol.* 1995;23:28-31.
133. Rahnavardi M, Hosseini Moghaddam SM, Alavian SM. Hepatitis C in hemodialysis patients: current global magnitude, natural history, diagnostic difficulties, and preventive measures. *Am J Nephrol.* 2008;28:628–640.
134. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hepatitis C virus transmission at an outpatient hemodialysis unit--New York, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58:189–194.
135. Sypsa V, Psychogiou M, Katsoulidou A, Skoutelis G, Moutafis S, Hadjiconstantinou V, Kakavas J, Kalapothaki V, Boletis J, Hatzakis A. Incidence and patterns of hepatitis C virus seroconversion in a cohort of hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005;45:334–343.
136. El-Amin HH, Osman EM, Mekki MO, Abdelraheem MB, Ismail MO, Yousif ME, Abass AM, El-haj HS, Ammar HK. Hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Sudan: two centers' report. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2007;18:101–106.
137. Moini M, Ziyaeyan M, Aghaei S, Sagheb MM, Taghavi SA, Moeini M, Jamalidoust M, Hamidpour L. Hepatitis C virus (HCV) Infection Rate among Seronegative Hemodialysis Patients Screened by Two Methods; HCV Core Antigen and Polymerase Chain Reaction. *Hepat Mon.* 2013;13:e9147.
138. Fabrizi F, Martin P. Health care-associated transmission of hepatitis B and C viruses in hemodialysis units. *Clin Liver Dis.* 2010;14:49-60.
139. Vacher-Coponat H, Brunet C, Lyonnet L, Bonnet E, Loundou A, Sampol J, Moal V, Dussol B, Brunet P, Berland Y, Dignat-George F, Paul P. . Natural killer cell

- alterations correlate with loss of renal function and dialysis duration in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:1406-1414.
140. Knerr K, Fu'th R, Hensen P, Mohne W, Heinig A, Keophas W, Scherbaum W A, and Martin S. Chronic inflammation and hemodialysis reduce immune competence peripheral blood leucocytes in end-stage renal failure patients. *Cytokine*. 2005;30:132-138.
141. Betjes MG. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9:255-265.
142. Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N, Metivier F, Randoux C, Kossari N, Guérin A, Geffroy S, Delavaud G, Marin-Esteban V, Glotz D, Charron D, Toubert A.. Oxidative Stress Mediates a Reduced Expression of the Activating Receptor NKG2D in NK Cells from End-Stage Renal Disease Patients. *J Immunol*. 2009;182:1696-1705.
143. Ruiz P, Gomez F and Schreiber A D. Impaired function of macrophage Fc receptor in end-stage renal disease. *N Engl J Med*. 1990;322:717-722.
144. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Diestag J, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J of Immunology*. 1992;149:3339-3344.
145. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal, Grakoui A, Rice CM, Choo QL, Houghton M, Walker BD. HLA Class I-restricted T lymphocytes specific for hepatitis C virus. *J. Clin Invest* 1995; 96:2311-2321.
146. Zaoui P, Green W, Hakim RM. Hemodialysis with cuprophane membrane modulates interleukin-2 receptor expression. *Kidney Int*. 1991;39:1020-1026.
147. Hakim RM. Clinical implications of hemodialysis membrane biocompatibility. *Kidney Int*. 1993;44:484-49.
148. Descamps-Latscha B, Jungers P, Witko-Sarsat V. Immune system dysregulation in uremia: Role of oxydative stress. *Blood Purif*. 2002;20:481-484.

149. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I. Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients. *Semin Dial.* 2007;20:440-451.
150. Ringoir S. An update on uremic toxins. *Kidney Int Suppl.* 1997;62:S2-S4.
151. Vanholder R, Van Loo A, Dhondt A M, Glorieux G, De Smet R and Ringoar S. Second symposium on uraemic toxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10:414-418.
152. Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, Peterson RA, Weihs KL, Alleyne S, Cruz I, Yanovski JA, Veis JH: Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1998;54:236–244.
153. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M: IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005;67:1216–1233.
154. Satomura A, Endo M, Ohi H, Sudo S, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M, Fujita T: Significant elevations in serum mannose-binding lectin levels in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 2002;92:702–704.
155. Satomura A, Endo M, Fujita T, Ohi H, Ohsawa I, Fuke Y, Matsumoto K, Sudo S, Matsushita M, Fujita T: Serum mannose-binding lectin levels in maintenance hemodialysis patients: impact on all-cause mortality. *Nephron Clin Pract.* 2006;102: 93–99.
156. Ando M, Lundkvist I, Bergstrom J, Lindholm B: Enhanced scavenger receptor expression in monocyte-macrophages in dialysis patients. *Kidney Int.* 1996;49:773–780.
157. Ando M, Gafvels M, Bergstrom J, Lindholm B, Lundkvist I: Uremic serum enhances scavenger receptor expression and activity in the human monocytic cell line U937. *Kidney Int.* 1997;51:785–792.
158. Chmielewski M, Bryl E, Marzec L, Aleksandrowicz E, Witkowski JM, Rutkowski B: Expression of scavenger receptor CD36 in chronic renal failure patients. *Artif Organs.* 2005;29:608–614.

159. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of immune Dysfunction in End-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:1526-1533.
160. Reherman B, Chang KM, McHutchison J, Кокка R, Houghton M, Rice CM, Chisari FV. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J. Vrol*. 1996;70:7092-7102.
161. Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filho R, Lindholm B: Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6? *Kidney Int Suppl*. 2002; 80:103–108.
162. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, Stenvinkel P: Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis*. 2003;41:1212–1218.
163. Diepolder HM, Zachoval RZ, Hoffman RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving Tlymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006-1007.
164. Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science*. 1998;280:248-153.
165. Chatenoud L, Dugas B, Beaurain G, Touam M, Druke T, Vasquez A, Galanaud B et al. Presence of preactivated T cells in hemodialyzed patients: their possible role in altered immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:7457-7461
166. Sester U, Sester M, Hauk M, Kaul H, Kohler H and Grindt M. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:1217-1223.
167. Steinwinkel P. Malnutrition and chronic inflammation as risk factors for cardiovascular disease in chronic renal failure. *Blood Purif*. 2001;19:143-151.
168. Girndt M. Humoral immune responses in uremia and the role of IL-10. *Blood Purif*. 2002;20:485-488.

169. Fernandez-Fresnedo G, Ramos MA, Gonzalez-Pardo MC, de Francisco AL, Lopez-Hoyos M, Arias M: B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15: 502–510.
170. Descamps-Latscha B. The immune system in end-stage renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 1993;2:883-891.
171. Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr*. 2012;22:149-156.
172. Kim KW, Chung BH, Jeon EJ, Kim BM, Choi BS, Park CW, Kim YS, Cho SG, Cho ML, Yang CW. B cell-associated immune profiles in patients with end-stage renal disease (ESRD) *Exp Mol Med*. 2012;44:465–472.
173. Pahl MV, Gollapudi S, Sepassi L, Gollapudi P, Elahimehr R, Vaziri ND. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:205–212.
174. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:29–41.
175. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, et al. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun*. 2007; 75:5148-5157.
176. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: Structure, function, and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e17.
177. Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;136:385–400.
178. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: A small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006;16:137–157.
179. Garner OB, Baum LG. Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem Soc Trans*. 2008;36:1472–1477.

180. van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2008;9:593–601.
181. Ahmad N, Gabius HJ, André S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R et al. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem.* 2004;279:10841-7.
182. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N et al. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28:451-462.
183. Viguiier M, Advedissian T, Delacour D, Poirier F, Deshayes F. Galectins in epithelial functions. *Tissue Barriers.* 2014; 2:e29103.
184. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis.* 2005;10:267–275.
185. Hsu DK, Hammes SR, Kuwabara I, Greene WC, Liu FT. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. *Am J Pathol.* 1996;148:1661–1670.
186. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:14496-14501.
187. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest.* 2003;112:389–397.
188. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, Sethi T. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol.* 2008;180:2650–2658.
189. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2001;69:555–564.

190. Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, Baum LG. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol.* 2006;176:778–789.
191. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 2003;63:8302–8311.
192. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:6737–6742.
193. Dustin ML. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol Rev.* 2008;221:77–89.
194. Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Kobayashi W, Hiroshima M, Hashimoto-Tane A, Tokunaga M, Dustin ML, Saito T. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol.* 2005;6:1253–1262.
195. Campi G, Varma R, Dustin ML. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med.* 2005;202:1031–1036.
196. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 1998;395:82–86.
197. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science.* 1999;285:221–227.
198. Freiberg BA, Kupfer H, Maslanik W, Delli J, Kappler J, Zaller DM, Kupfer A. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol.* 2002;3:911–917.
199. Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity.* 2006;25:117–127.

200. Kaizuka Y, Douglass AD, Varma R, Dustin ML, Vale RD. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:20296–20301.
201. Ulu M, Alacacioglu A, Yuksel E, Pamukk BO, Bozkaya G, Ari A, Yuksel A, Sop G, Alacacioglu I. Prognostic significance of serum galectin-3 levels in patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. *Saudi J Gastroenterol*. 2015;21:47-50.
202. Desmedt V, Desmedt S, Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Galectin-3 in Renal Pathology: More Than Just an Innocent Bystander. *Am J Nephrol*. 2016;43:305-317.
203. Covic A, Abramowicz D, Bruchfeld A, Leroux-Roels G, Samuel D, van Biesen W, Zoccali C, Zoulim F, Vanholder R. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) hepatitis C guidelines: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:719–727.
204. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2008;(109):S1–99.
205. Hadziyannis SJ. Prognostic factors determining the outcome of treatment in chronic hepatitis C. *Acta Gastroenterol Belg*. 2000;63:207-209.
206. Deutsch M, Hadziyannis SJ, Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update. *J Viral Hepat*. 2008;15:2-11.
207. Božić M, Fabri M, Nožić D, Bojović K, Milošević I, Terapija hroničnog hepatitisa C : Peginterferon alfa – 2a(Pegasys) + Ribavirin (Copegus) – rani virusološki odgovor. *Acta infectologivca Iugoslavica*. 2003;8:41-48.
208. Teoh NC, Farrell GC, Chan HL. Individualisation of antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25:1206-1216.
209. Zopf S, Kremer AE, Neurath MF, Sieber J. Advances in hepatitis C therapy:What is the current state-what comes next? *World J hepatol*. 2016;8:139-147.

210. Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, Schultz M, Davis MN, Kayali Z, Reddy KR, Jacobson IM, Kowdley KV, Nyberg L, Subramanian GM, Hyland RH, Arterburn S, Jiang D, McNally J, Brainard D, Symonds WT, McHutchison JG, Sheikh AM, Younossi Z, Gane EJ. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2013; 368:1878-1887.
211. Pockros PJ, Reddy KR, Mantry PS, Cohen E, Bennett M, Sulkowski MS, Bernstein D, Podsadecki T, Cohen D, Shulman NS, Wang D, Khatri A, Abunimeh M, Lawitz E. L01: Safety of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir Plus Dasabuvir for Treating Hcv Gt1 Infection in Patients with Severe Renal Impairment or End- Stage Renal Disease: The Ruby-I Study. *J hepatol.* 2015; 62: S257-S257.
212. Lenz O, Verbinnen T, Fevery B, Tambuyzer L, Vijgen L, Peeters M, Buelens A, Ceulemans H, Beumont M, Picchio G, De Meyer S. Virology analyses of HCV isolates from genotype 1-infected patients treated with simeprevir plus peginterferon/ribavirin in Phase IIb/III studies. *J Hepatol.* 2015;62:1008-1014.
213. Karino Y, Toyota J, Ikeda K, Suzuki F, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hernandez D, Yu F, McPhee F, Kumada H. Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol.* 2013;58:646-654.
214. Afdhal N, Reddy KR, Nelson DR, Lawitz E, Gordon SC, Schiff E, Nahass R, Ghalib R, Gitlin N, Herring R, Lalezari J, Younes ZH, Pockros PJ, Di Bisceglie AM, Arora S, Subramanian GM, Zhu Y, Dvory-Sobol H, Yang JC, Pang PS, Symonds WT, McHutchison JG, Muir AJ, Sulkowski M, Kwo P. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2014;370:1483-1493.
215. Zimmer-Rapuch S, Janus N, Deray G, Launay-Vacher V. New therapies for hepatitis C: considerations in patients with renal impairment. *Drugs.* 2014;74:1307–1313.
216. Lee LY, Tong CY, Wong T, Wilkinson M. New therapies for chronic hepatitis C infection: a systematic review of evidence from clinical trials. *Int J Clin Pract.* 2012;66:342–355.

217. Honegger JR, Zhou Y, Walker CM. Will there be a vaccine to prevent HCV infection? *Semin Liver Dis.* 2014;34:79-88.
218. Okuda K, Hayashi J, Yokozeki K, Irie Y. Destruction of hepatitis C virus particles by hemodialysis. *Lancet.* 1996;347:909-910.
219. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Brezina M, Cole MJ, Vinson S, Mousa M, Gitnick G. Biological dynamics of viral load in hemodialysis patients with hepatitis C virus. *Am J Kidney Dis.* 2000;35:122–129.
220. Chavaliez C. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:116-121.
221. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moadpour D et Pawlotsky JM. Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology.* 2004;39:5-19.
222. Ozer Etik D, Ocal S, Boyacioglu AS. Hepatitis C infection in hemodialysis patients: A review. *World J Hepatol.* 2015;7:885-895.
223. Jasuja S, Gupta AK, Choudhary R, Kher V, Agarwal DK, Misra A, Agarwal M, Sarin A, Mishra MK, Raina V. Prevalence and association of hepatitis C viremia in hemodialysis patients at a tertiary care hospital. *Indian J Nephrol.* 2009;19:62-68.
224. Furusyo N, Hayashi J, Ariyama I, Sawayama Y, Etoh Y, Shigematsu M, Kashiwagi S. Maintenance hemodialysis decreases serum hepatitis C virus (HCV) RNA levels in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:490–496.
225. Badalamenti S, Catania A, Lunghi G, Covini G, Bredi E, Brancaccio D, Salvadori M, Como G, Ponticelli C, Graziani G. Changes in viremia and circulating interferon- alpha during hemodialysis in hepatitis C virus-positive patients: only coincidental phenomena? *Am J Kidney Dis.* 2003;42:143-150.
226. Sterling RK, Sanyal AJ, Luketic VA, Stravitz RT, King AL, Post AB, Mills AS, Contos MJ, Shiffman ML. Chronic hepatitis C infection in patients with end stage renal disease: characterization of liver histology and viral load in patients awaiting renal transplantation. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:3576–3582.

227. Cotler SJ, Diaz G, Gundlapalli S, Jakate S, Chawla A, Mital D, Jensik S, Jensen DM. Characteristics of hepatitis C in renal transplant candidates. *J Clin Gastroenterol.* 2002;35:191–195.
228. Azevedo HA, Villela-Nogueira CA, Perez RM, Segadas-Soares JA, Takahashi C, Gaburo N, Pessoa I, Coelho HS. Similar HCV viral load levels and genotype distribution among end-stage renal disease patients on hemodialysis and HCV-infected patients with normal renal function. *J Nephrol.* 2007;20:609–616.
229. Okuda K, Yokosuka O. Natural history of chronic hepatitis C in patients on hemodialysis: case control study with 4-23 years of follow-up. *World J Gastroenterol.* 2004;10:2209–2212.
230. Noiri E, Nakao A, Oya A, Fujita T, Kimura S. Hepatitis C virus in blood and dialysate in hemodialysis. *Am J Kidney Dis.* 2001;37:38–42.
231. Hayashi H, Okuda K, Yokosuka O, Kobayashi S, Yokozeki K, Ohtake Y, Irie Y. Adsorption of hepatitis C virus particles onto the dialyzer membrane. *Artif Organs.* 1997;21:1056–1059.
232. Angelini C, Badalamenti S, Lunghi G, Sampietro M, Finazzi S, Ponticelli C, Graziani G. Evidence against hepatitis C virus trapping in dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:317–318.
233. Bantel H, Schulze-Osthoff K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ.* 2003;10 Suppl 1:S48-58.
234. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:553-562.
235. Kaul V, FriedenberG FK, Braitman LE, Anis U, Zaeri N, Fazili J, Herrine SK, Rothstein HD. Development and validation of a model to diagnose cirrhosis in patients with hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2623-2628.
236. Tseng GY, Lin HJ, Fang CT, Cheng YT, Huang CH, Tseng GC, Wang PC, Hung TL, Deng YC, Tsai CC, Yang Ky. Hemodialysis reduces the viral load in uremic patients with chronic hepatitis B infection. *Ren Fail.* 2008;30:1000-1005.

237. Rampino T, Arbustini E, Gregorini M, Guallini P, Libetta C, Maggio M, Ranghino A, Silini E, Soccio G, Dal Calton A . Hemodialysis prevents liver disease caused by hepatitis C virus: role of hepatocyte growth factor. *Kidney Int.* 1999; 56:2286-2291.
238. Tompkins WA. Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19:817-828.
239. Assy N, Minuk GY. Serum aspartate but not alanine aminotransferase levels help to predict the histological features of chronic hepatitis C viral infections in adults. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:1545-1550
240. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Leivaditis K, Antoniadis G, Stefanidis I. Infections in hemodialysis: a concise review. Part II: blood transmitted viral infections. *Hippokratia.* 2011;15:120-126.
241. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:337-348.
242. Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:706-713.
243. Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A et al. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature.* 2000; 407:916-920.
244. Böhm F, Köhler UA, Speicher T, Werner S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med.* 2010;2:294-305.
245. Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27 Suppl 2:89-93.
246. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:836-847.
247. Teoh N, Field J, Farrell G. Interleukin-6 is a key mediator of the hepatoprotective and pro-proliferative effects of ischaemic preconditioning in mice. *J Hepatol.* 2006; 45:20-27.

248. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878-88.
249. Krane V, Wanner C. The metabolic burden of diabetes and dyslipidaemia in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 11:23-7.
250. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114:597-605.
251. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Fujimoto M, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol*. 2006;210:469-477.
252. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1572:263–273.
253. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1673:75–93.
254. Lim EJ, El Khobar K, Chin R, Earnest-Silveira L, Angus PW, Bock CT, Nachbur U, Silke J et Torresi J. Hepatitis C virus-induced hepatocyte cell death and protection by inhibition of apoptosis. *J Gen Virol*. 2014;95:2204-2215.
255. Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim HR. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis. *Am J Pathol*. 2001;159:1055-60.
256. Baptiste TA, James A, Saria M, Ochieng J. Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: implications in the extracellular functions of the lectin. *Exp Cell Res*. 2007;313:652-664
257. Yu F, Finley RL, Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem*. 2002;277:15819–15827. (257)

258. Hsu DK, Chernyavsky AI, Chen HY, Yu L, Grando SA, Liu FT. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2009;129:573–583. (258)
259. Lukic R, Gajovic N, Jovanovic I, Jurisevic M, Mijailovic Z, Maric V, Jovicic B, Arsenijevic N. Potential Hepatoprotective Role of Galectin 3 during HCV Infection in End-Stage Renal Disease Patients. *Dis Markers.* 2017;2017:6275987.
260. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005; 23: 479-490.
261. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol.* 2016;17:122-131.
262. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:103-110.
263. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, K uchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol.* 2009;30:227-33.
264. Sweet MJ, Leung BP, Kang G, Sogaard M, Schulz K, Trajkovi  V et al. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2001;166:6633-6639.
265. Trajkovic V, Sweet MJ, Xu D. T1/ST2—an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2004;15:87-95.
266. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T Cells. *J Exp Med.* 1998;187:787-794.

9. ПРИЛОГ

9.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

Монографска публикација

ТД

Типзаписа:

Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада:

Докторска дисертација

ВР

Аутор:

Ружица В. Лукић

АУ

Ментор/коментор

Проф.др Иван П. Јовановић

Наслов рада:

Хепатитис С и параметри инфламацијског одговора код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом

Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језикизвода: ЈИ	Српски/енглески
Земља публикавања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Србија
Година: ГО	2017.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000 Крагујевац, Србија Светозара Марковића 69
Физички опис рада: ФО	Дисертација има 107 страна, 9 поглавља, 9 слика, 1 схему, 4 табеле, 21 фигуру и 266 референци
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Имунологија, инфекција и инфламација
Предметна одредница/кључне речи:	хепатитис С вирусна инфекција, терминална бубрежна инсуфицијенција, анти-вирусни имунски одговор, цитокини, галектин-3

УДК:

Чува се:

ЧУ

У Библиотеци Факултета медицинских
наука у Крагујевцу, 34000 Кагујевац Србија,
Светозара Марковића 69

Важна напомена:

МН

Извод:

ИД

Датум прихватања теме одстрaне ННВ: 26.10.2016.
ДП

Датум одбране:
ДО

Чланови комисије:
КО

Председник: **Проф.др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија

Ментор: **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Унивезитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија

Члан: **Проф. др Маја Ђупић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија

Члан: **Проф. др Жељко Мијаиловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести

Члан: **Проф. др Дејан Петровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина

Члан: **Проф. др Гордана Радосављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

9.2. KEYWORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Ruzica V. Lukic

Menthor/co-mentor:

MN

Prof. dr Ivan P. Jovanovic

Title:

TI

Hepatitis C and parameters of inflammatory
response in patients with end stage renal disease

Language of text:

LT

Serbian (Cyrillic)

Language of abstract:

Serbian/English

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication:

LP

Serbia

Publicationyear: 2017
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Serbia
PP Svetozara Markovica 69

Physicaldescription: Thesis contains 107 pages, 9 chapters, 9 pictures, 1 sheme, 4 tables, 21 figures and 266 citations

Scientificfield: Medicine
SF

Scientificdiscipline: Imunology, infection end inflammation
SD

Subject/key words: HCV infection, end stage renal disease,
SKW antiviral immune response, cytokines, galectin-3

UDC

Holdingsdata: Library of Faculty of medisal sciences Kragujevac
34000 Kragujevac, Serbia
Svetozara Markovica 69

Note: N

Accepted by the Scientific Board on: 26.10.2016.

ASB

Defended on:

DE

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

DB

President: **Prof. dr Nebojša Arsenijević**, Professor of Microbiology and Immunology and Oncology, Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac

Menthor: **Prof. dr Ivan Jovanović**, Associate professor of Microbiology and Immunology and Oncology, Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac

Member: **Prof. dr Maja Ćupić**, Professor of Mycrobiology, Faculty of Medicine, University of Belgrade

Member: **Prof. dr Željko Mijailović**, Associate professor of Infectious disease, Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac

Member: **Prof. Dr Dejan Petrović**, Associate Professor of Internal Medicine Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac

Member: **Prof. dr Gordana Radosavljević**, Associate professor of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac

9.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Ружица Лукић је рођена 25.02.1976. године у Фочи. Основну и средњу Просветно-културолошко преводиначку школу завршила је у Фочи. Медицински факултет у Фочи уписала је 1994/95. године, а дипломирала 2001. године, са просјечном оцјеном 7,75 (седам и 75/100) и тиме стекла звање доктора медицине. Након завршеног факултета запошљава се у Универзитетској болници у Фочи. Специјалистичке студије из области Микробиологија са паразитологијом уписала је школске 2004/05. године на Медицинском факултету у Београду, а специјалистички испит положила у јулу 2008. године, под менторством проф. др Милене Швабић. Од тада ради као специјалиста и шеф одсека за бактериологију у болници у Фочи. Од школске 2012/13. године ради и као асистент на Медицинском факултету у Фочи на Катедри за микробиологију и имунологију. Ужу специјализацију из Вирусологије уписала је на Медицинском факултету у Београду школске 2013/14. године, док је испит из уже специјализације положила пред Комисијом, у септембру 2015 год. такође на Медицинском факултету у Београду. Одбранила је рад из уже специјализације из Вирусологије под насловом „ЗНАЧАЈ МОЛЕКУЛАРНО БИОЛОШКИХ МЕТОДА КОД ПАЦИЈЕНАТА НА ХЕМОДИЈАЛИЗИ СА ХРОНИЧНОМ ХЕПАТИТИС Ц ИНФЕКЦИЈОМ“ 03.07.2017. године, на Медицинском факултету Универзитета у Београду, чији је ментор проф. др Маја Ђупић.

Специјалистичке академске студије из Клиничке и експерименталне микробиологије др Ружица Лукић је уписала упоредо са ужом специјализацијом школске 2013/14. године на Медицинском факултету у Београду и завршила са просјечном оцјеном 9,36. Одбранила је завршни рад из академске специјализације под насловом “МЕХАНИЗМИ УНУТАР ЋЕЛИЈСКОГ ПРЕЖИВЉАВАЊА ХЛАМИДИЈА“ 06.10.2014. године, под менторством проф. др Слободанке Ђукић. У октобру 2015 год. постаје главни руководилац микробиолошке лабораторије Универзитетске болнице у Фочи .

Докторске академске студије, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација, уписала је 2014. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, под менторством проф. др Ивана Јовановића. Усмени докторски испит је положила у јуну 2016. године са оцјеном 9 (девет). Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

BIOGRAPHY

Author Biography

Ruzica Lukic was born on February 25.1976. in Foca Municipality. She completed Primary School and Secondary School for Education and Cultural Interpretation in Foca. In 1994/95she enrolled the Faculty of Medicine in Foca. In 2001 she graduated with an average score of 7.75 (seven and 75/100). She got the title medical doctor. After the graduation, she started working at the University Hospital in Foca. She enrolled the Specialist Studies in the field of Microbiology and Parasitology in the academic year of 2004/05 at the Faculty of Medicine in Belgrade. She passed the Specialist Exam in July 2008, under the mentorship of Prof. Milena Svabic, MD, PhD. Since then, she has worked as a doctor specialist and Head of Bacteriology Department in Hospital Foca. She has worked as a Clinical Assistant at the Faculty of Medicine in Foca, Microbiology and Immunology Department since 2012/13. She enrolled Subspecialty in Virology at the Faculty of Belgrade in 2013/14. She passed Subspecialization exam on September 2015, at the Faculty of Medicine in Belgrade. On July 3.2017. she defended her final Subspecialization in Virology exam: "The importance of molecular biological methods in hemodialysis patients with chronic hepatitis C infection" was approved under the mentorship of Prof. Maja Cupic, MD, PhD at the Faculty of Belgrade.

Ruzica Lukic enrolled Postgraduate Studies in Clinical and Experimental Microbiology along with Subspecializationat the Faculty of Medicine in Belgrade in 2013/14. She ended up Studies with an average score of 9.36. On October 6.2014. she defended her final academic Specialization exam:"Mechanism of intracellular chlamydiae survival"under the mentorship of Prof. Slobodanka Djukic,MD,PhD. On October 2015, she becomes the Head of Microbiology Laboratory in the University Hospital Foca.

In 2014, she enrolled her Doctoral Studies at the Faculty of Medical Studies in Kragujevac (optional field Immunology, Infection and Inflammation), under the mentorship of Ivan Jovanovic, MD PhD. On June 2016, she passed her oral PhD exam (grade 9). She speaks English and knows to work on computer.

9.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Lukic R**, Lukovic B, Gajović N, Prljic S, Đukic S. Mechanism of intracellular chlamydiae survival Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (2): 145-151
2. Mladenovic V, Dimitrijevic Stojanovic M, Macut Dj, **Lukic R**, Đukic A. Glicoregulation during pregnancy. Ser J Exp Clin Res DOI: 10.1515/sjecr-2017-0009
3. **Lukic R**, Gajović N, Jovanovic I, Jurisevic M, Mijailovic Z, Maric V, Popovska Jovicic B and Arsenijevic N. Potential hepatoprotective role of galectin-3 during HCV infection in end-stage renal disease patients. Disease Markers doi.org/10.1155/2017/6275987

9.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

The published paper in extenso in international journals

1. **Lukic R**, Lukovic B, Gajović N, Prljic S, Đukic S. Mechanism of intracellular chlamydiae survival Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (2): 145-151
2. Mladenovic V, Dimitrijevic Stojanovic M, Macut Dj, **Lukic R**, Đukic A. Glicoregulation during pregnancy. Ser J Exp Clin Res DOI: 10.1515/sjecr-2017-0009
3. **Lukic R**, Gajović N, Jovanovic I, Jurisevic M, Mijailovic Z, Maric V, Popovska Jovicic B and Arsenijevic N. Potential hepatoprotective role of galectin-3 during HCV infection in end-stage renal disease patients. Disease Markers doi.org/10.1155/2017/6275987

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ружица Лукић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Хепатитис С и параметри инфламацијског одговора код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 18.7.2017. године,

потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ружица Лукић

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Хепатитис С и параметри инфламацијског одговора код пацијената са терминалном бубрежном инфламацијског

која је одбрањена на Факултету медицински наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 18.7.2017. године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>