



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Vukica V. Đorđević

**UTICAJ BIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA VIRUSA
I POLIMORFIZMA GENA FAKTORA NEKROZE
TUMORA-ALFA NA KLINIČKE MANIFESTACIJE
HRONIČNE HEPATITIS C VIRUSNE INFEKCIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2024.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Vukica V. Dorđević

**IMPACT OF BIOLOGICAL VIRUS CHARACTERISTICS AND
TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA GENE POLYMORPHISM
ON THE CLINICAL MANIFESTATIONS OF CHRONIC
HEPATITIS C VIRUS INFECTION**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2024

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Biljana Miljković Selimović, specijalista Mikrobiologije sa parazitologijom, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
Naslov:	UTICAJ BIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA VIRUSA I POLIMORFIZMA GENA FAKTORA NEKROZE TUMORA-ALFA NA KLINIČKE MANIFESTACIJE HRONIČNE HEPATITIS C VIRUSNE INFEKCIJE
Rezime:	<p>HCV infekcija predstavlja ozbiljan zdravstveni problem zbog toga što, nakon akutne infekcije, kod 70% bolesnika virus uspostavlja perzistentnu infekciju. Perzistentna HCV infekcija klinički se manifestuje hroničnim oboljenjem jetre, koje često ima progresivni tok. Osnovni cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi uticaj bioloških karakteristika HCV-a (genotipa/suptipa i nivoa viremije) i genotipova TNF alfa-308 na kliničke manifestacije hronične HCV infekcije, kao i odnos markera oksidativnog stresa i antioksidativnog odbrambenog sistema organizma kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom. Distribucija genotipova/suptipova, nivo viremije, vrednosti transaminaza i distribucija TNF alfa-308 genotipova komparativno su analizirani u grupi pacijenata sa fibrozom stadijuma \geq F2 i grupi pacijenata sa stadijumom F0-F1. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da HCV genotipovi 1b i 3, više vrednosti AST-a i ALT-a i genotipovi TNF alfa-308 sa alelom A (GA i AA) značajno koreliraju sa stadijumom fibroze \geq F2. Verovatnoća za razvoj značajne fibroze povećana je kod bolesnika inficiranih HCV genotipom 3, a kod bolesnika sa HCV genotipom 1a i GG genotipom TNF alfa-308 postoji smanjena verovatnoća za razvoj značajne fibroze. Multivarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da genotip GG TNF alfa-308 ima prediktivni značaj, kao parametar bolje prognoze bolesti. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su postojanje disbalansa između markera oksidativnog stresa (TBARS-a i AOPP-a) i antioksidativnog odbrambenog sistema organizma (katalaze), odnosno povezanost oksidativnog stresa i HCV infekcije. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da HCV genotipovi 1b i 3, povišene vrednosti ALT-a i AST-a, kao i genotip TNF alfa-308 mogu da budu parametri progresije hroničnog oboljenja jetre kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom. Pošto je HCV infekcija povezana sa oksidativnim stresom, ispitivanje markera oksidativnog stresa može biti od značaja u kliničkoj praksi u cilju boljeg sagledavanja kliničkog toka i ishoda bolesti.</p>
Naučna oblast:	Medicina
Naučna disciplina:	Mikrobiologija
Ključne reči:	Hepatitis C virus, TNF alfa, oksidativni stres

UDK: 616.36-002:579:577.1(043.3)

CERIF
klasifikacija:

B 230 Mikrobiologija, bakteriologija, virusologija, mikologija

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Prof. dr Biljana Miljković Selimović, Specialist of Microbiology with parasitology, Faculty of Medicine, University of Niš
Title:	IMPACT OF BIOLOGICAL VIRUS CHARACTERISTICS AND TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA GENE POLYMORPHISM ON THE CLINICAL MANIFESTATIONS OF CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION
Abstract:	<p>HCV infection represents a major health problem due to the fact that after an acute infection the virus produces persistent infection in 70% of patients. Persistent HCV infection manifests clinically with chronic liver disease, often with a progressive course. The primary aim of this research was to establish the impact of biological HCV characteristics (genotype/subtype and level of viremia) and TNF-alpha-308 genotypes on the clinical manifestations of chronic HCV infection, as well as the relationship between oxidative stress markers and antioxidative defense system of the body in patients with chronic HCV infection. Distribution of genotypes/subtypes, level of viremia, values of transaminases and distribution of TNF-alpha-308 genotypes were comparatively analysed in a group of patients with stage \geqF2 fibrosis and a group of patients with stage F0-F1 fibrosis. The results of this research demonstrated that HCV genotypes 1b and 3, higher values of AST and ALT and TNF-alpha-308 genotypes with allele A (GA and AA) correlated significantly with \geqF2 stage of fibrosis. The probability of development of significant fibrosis was increased in patients infected with HCV genotype 3, while in patients infected with HCV genotype 1a and with GG genotype of TNF-alpha-308 there was a decreased probability of development of significant fibrosis. Multivariate logistic regression analysis demonstrated that GG genotype of TNF-alpha-308 was of predictive significance as a parameter of better disease prognosis. The results of this research confirmed an imbalance between oxidative stress markers (TBARS and AOPP) and antioxidative defense system of the body (catalase), i.e. the association of oxidative stress with HCV infection. The results of this research indicated that HCV genotypes 1b and 3, elevated values of ALT and AST, as well as TNF-alpha-308 genotype, can be the parameters of progression of chronic liver disease in patients with chronic HCV infection. Since HCV infection is associated with oxidative stress, assessment of oxidative stress markers can be valuable in clinical practice, providing a better view of the clinical course and outcome of the disease.</p>
Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Microbiology
Key Words:	Hepatitis C virus, TNF-alpha, oksidative stress

UDC: 616.36-002:579:577.1(043.3)

CERIF
Classification:

B 230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

SADRŽAJ

1. STRUKTURA I BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE HEPATITIS C VIRUSA.....	9
2. REPLIKACIJA HEPATITIS C VIRUSA	12
3. IMUNSKI ODGOVOR I PATOGENEZA HCV INFEKCIJE	15
3.1. IMUNSKI ODGOVOR NA HCV INFEKCIJU	15
3.1.1. Urođeni imunski odgovor	15
3.1.2. Stečeni imunski odgovor u HCV infekciji	18
3.2. MEHANIZMI ODGOVORNI ZA USPOSTAVLJANJE PERZISTENTNE HCV INFEKCIJE.....	19
3.3. TNF ALFA I HCV INFEKCIJA	23
3.4. OKSIDATIVNI STRES	25
4. KLINIČKA ISPOLJAVANJA HCV INFEKCIJE	27
5. EPIDEMIOLOGIJA	28
6. VIRUSOLOŠKA DIJAGNOSTIKA HCV INFEKCIJE.....	30
6.1. DETEKCIJA ANTI HCV ANTITELA	30
6.2. DETEKCIJA HCV CORE ANTIGENA (HCVAG)	31
6.3. DETEKCIJA HCV RNK.....	31
7. NAUČNA HIPOTEZA.....	33
8. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34
9. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA.....	35
9.1. PACIJENTI I METODE ISTRAŽIVANJA	35
9.1.1. Virusološka ispitivanja	35
9.1.2. Genotipizacija TNF alfa-308	35
9.1.3. Kliničko ispitivanje.....	37
9.1.4. Ispitivanje markera oksidativnog stresa i antioksidativnog sistema.....	39
9.2. STATISTIČKA ANALIZA	40
10. REZULTATI.....	41

11. DISKUSIJA.....	63
12. ZAKLJUČAK.....	73
13. LITERATURA	75
14. BIOGRAFIJA AUTORA	95

1. STRUKTURA I BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE HEPATITIS C VIRUSA

Hepatitis C virus (HCV) pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Hepacivirus*. HCV je mali virus (55–65 nm), ikozaedarne simetrije kapsida, sa omotačem. Genom virusa je pozitivna jednolančana RNK sa oko 9600 nukleotida (slika 1). Virusna RNK sastoji se od dva nekodirajuća regiona na 5' i 3' krajevima (eng. *untranslated regions* – UTR) i otvorenog rama čitanja (eng. *open reading frame* – ORF) u sredini (1). UTR na 5' kraju genoma posreduje u translaciji virusnih proteina, a UTR na 3' kraju u replikaciji virusne RNK (2).

ORF obuhvata gene koji kodiraju sintezu strukturnih protein (C, E1 i E2 gen), p gen i gene odgovorne za sintezu nestrukturnih virusnih proteina (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B gen). C gen kodira sintezu proteina kapsida ili core proteina, a E1 i E2 geni glikoproteine omotača (E1 i E2 proteine) (1). P gen kodira sintezu malog integralnog transmembranskog proteina, koji formira jonski kanal. Ovaj protein vrši neutralizaciju kiselih komponenti na sekretornom putu i štiti virusnu partikulu od izlaganja niskom pH za vreme sazrevanja i izlaska virusa iz inficirane ćelije (3). Nestrukturni geni kodiraju sintezu istoimenih nestrukturnih virusnih proteina koji učestvuju u procesu replikacije virusa (slika 2) (1).

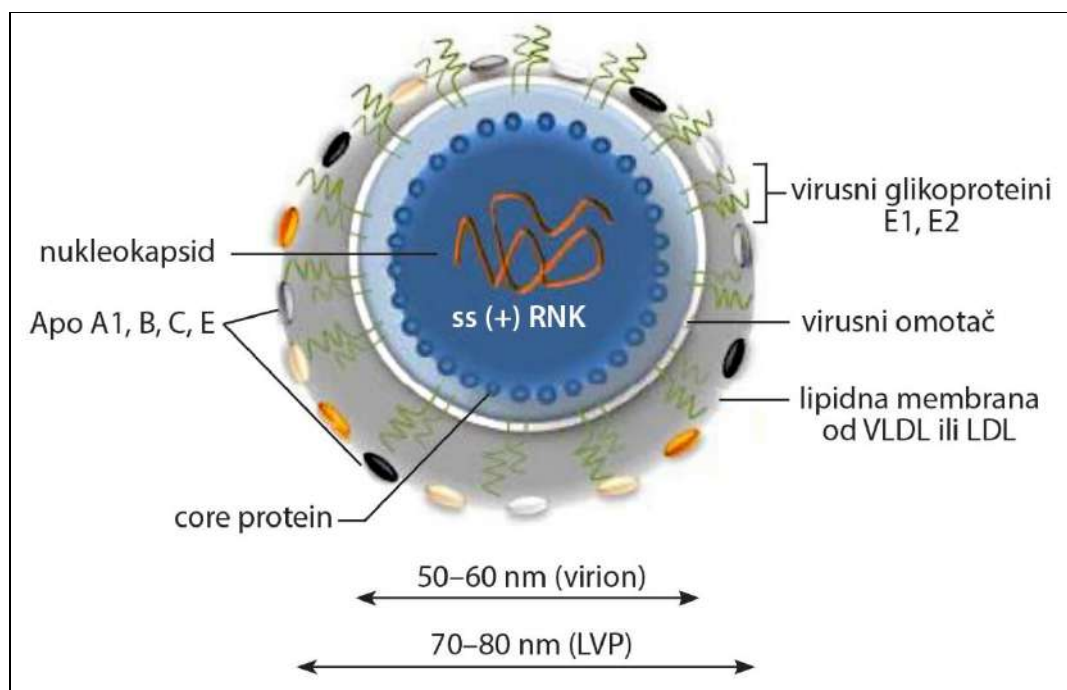
Na osnovu razlika u nukleotidnim sekvencama virusnog genoma, Internacionalni komitet za taksonomiju virusa klasifikovao je HCV izolate u 7 genotipova (1–7). Svaki genotip virusa obuhvata više suptipova (a, b, c...) (4). Do danas je identifikovano 67 suptipova, a identifikacija 20 suptipova je u toku (5).

Virusni genotipovi se razlikuju u stepenu varijacija nukleotidnih sekvenci. Komparativnom analizom nukleotidnih sekvenci virusnog genoma otkriveno je da postoji 30–50% varijacija među nukleotidnim sekvencama virusnih genotipova, a 15–30% varijacija među suptipovima istog genotipa. UTR i core gen pokazuju visok stepen homologije, a E2 gen nizak stepen homologije nukleotidnih sekvenci među različitim genotipovima (6). Pored toga, značajna biološka karakteristika HCV-a je varijabilnost E2 gena (u njegovim hipervarijabilnim regionima HVR1, HVR2 i HVR3) gde dolazi do čestih spontanih mutacija u toku replikacije virusa u inficiranoj ćeliji i pojave mutanata (kvazispecijesa). Mutacijama u hipervarijabilnim regionima E2 proteina, koji predstavljaju epitope za neutrališuća antitela, virus izbegava

eliminaciju od strane humoralnog imunskog odgovora, što predstavlja jedan od mehanizama uspostavljanja perzistentne infekcije (5, 7).

Genotipovi 1-3 rasprostranjeni su u celom svetu. U Evropi i SAD najčešće su infekcije izazvane genotipovima 1a i 1b, a zatim genotipovima 2 i 3 (8). Ostali genotipovi su retki i otkriveni su u određenim geografskim regionima, kao što su Bliski istok, Severna i Centralna Afrika (genotip 4), Južna Afrika (genotip 5), Istočna i Jugoistočna Azija (genotip 6). Novi genotip, koji je identifikovan kod kanadskog imigranta iz Konga, klasifikovan je kao 7a (4).

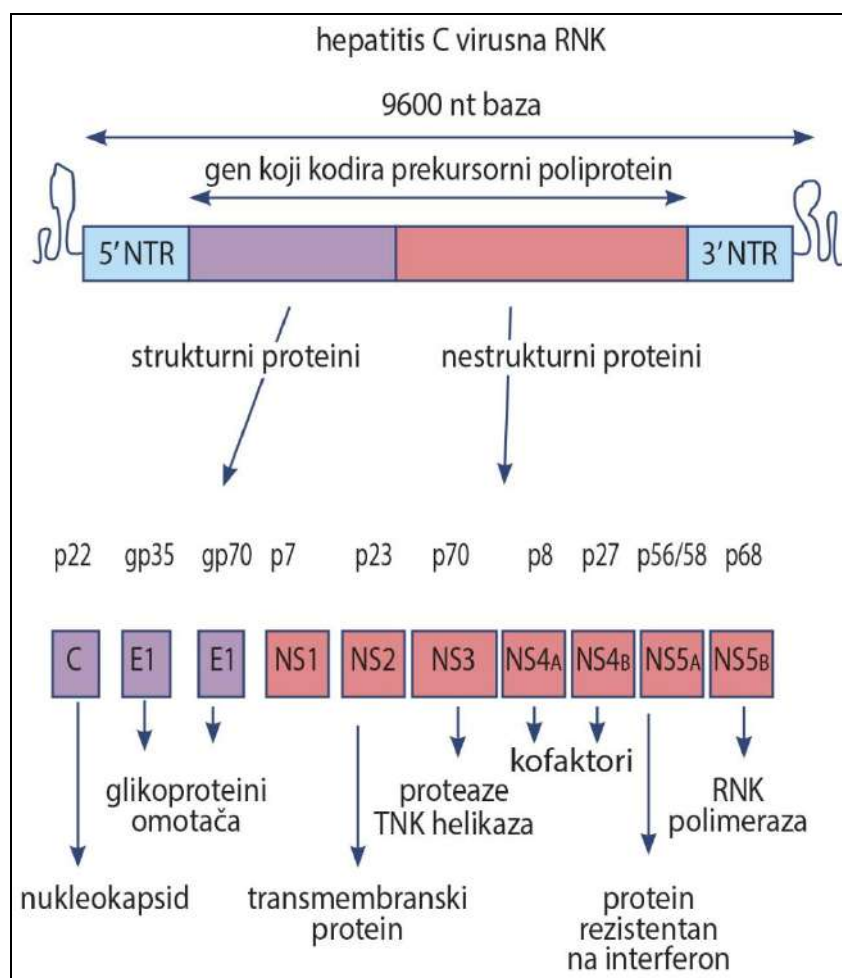
Različiti genotipovi i suptipovi imaju različite biološke karakteristike i pokazuju različit odgovor na antivirusnu terapiju (4, 9). Zbog toga je genotipizacija virusa izuzetno značajna u virusološkoj dijagnostici HCV infekcije.



Slika 1. Struktura HCV-a.

Prezeto iz Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy.

World J Hepatol. 2018;10(2):186-212. (10)



Slika 2. Genom HCV-a

Prezeto iz Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy.

World J Hepatol. 2018;10(2):186-212. (10)

2. REPLIKACIJA HEPATITIS C VIRUSA

HCV pokazuje specifičan tropizam prema hepatocitima. Identifikovani su brojni ćelijski kofaktori koji učestvuju u virusnoj replikaciji i uspostavljanju virusne infekcije.

Nakon ulaska u organizam, dolazi do interakcije HCV-a i ćelijskih lipoproteina u krvi inficirane osobe, tako da virus egzistira kao lipovirusna partikula (LVP) (11). Istraživanja pokazuju da ovoj interakciji doprinosi E1 protein (12). LVP se sastoji od HCV partikule i lipoproteina veoma niske gustine (eng. *very low density lipoprotein* – VLDL) koji obuhvataju apolipoproteine Apo A, B i E (13).

Prvi korak u uspostavljanju produktivne infekcije je vezivanje virusa za receptore na osetljivoj ćeliji (adsorbicija). Ćelijski receptori za koje se vezuje HCV su: HSPG (heparan sulfat glikoprotein), LDL-R (eng. *low density lipoprotein receptor*), SR-BI (eng. *scavenger receptor class B type 1*), CD81, kludin 1 (CLDN1), okludin (OCLN) i epidermalni factor rasta (eng. *epidermal growth factor receptor-EGFR*) (14).

HCV se vezuje za hepatocyte pomoću aipoproteina, posebno ApoE, i pomoću E1 i E2 glikoproteina. HCV se prvo vezuje za HSPG, LDL-R i SR-BI, koji se nalaze na površini hepatocita, pomoću ApoE koji se nalazi na LVP, kada dolazi do nagomilavanja virusnih partikula na površini ćelije (2). Vezivanje virusa za ove receptore dovodi do konformacionih promena u E1 i E2 glikoproteinima, čiji je ishod otkrivanje E2 glikoproteina (15), kao i do premeštanja LVP u neposrednu blizinu CD81 (u čemu dominantnu ulogu ima interakcija SR-BI i ApoE na površini LVP) (16). Nakon toga, dolazi do vezivanja SR-BI za HVR1 E2 glikoproteina, što dovodi do otkrivanja CD81 vezujućeg mesta, omogućavajući interakciju CD81 i E2 (17, 18). Smatra se da je interakcija između E2 i CD81 presudna za ulazak virusa u ćeliju. Istraživanja pokazuju da je ulazak virusa direktno proporcionalan ekspresiji CD81 na površini ćelije. Vezivanje virusa, E2 glikoproteina za CD81, aktivira EGFR signalni put, čiji je ishod formiranje CD81-CLDN1 kompleksa. Ovaj receptorski kompleks ima centralnu ulogu u ulasku virusa u ćeliju. Virus-receptorski kompleks (SR-BI, CD81 i CLDN1) zatim interreaguje sa OCLN i TfR1 u kasnoj fazi ulaska virusa u ćeliju. Uloga ovih receptora nije u potpunosti razjašnjena (2).

Virus ulazi u ćeliju procesom endocitoze posredovane klatrinom. Nakon oslobađanja virusne RNK nastupa faza translacije na endoplazmatskom retikulumu (ER) (na ribozomima). IRES na 5' kraju UTR omogućava translaciju uz pomoć ćelijskih proteina koji olakšavaju interakciju između IRES-a i ribozoma (15). Identifikovano je 26 ćelijskih proteina koji se vezuju za IRES na 5' kraju virusne RNK, ali se njihova precizna uloga još uvek ne zna (19). Istraživanja su pokazala da je mikro RNK miR-122, specifična za jetru, presudan ćelijski faktor u HCV replikaciji u ćelijskoj kulturi i *in vivo*. Ona stimuliše translaciju virusnog genoma (20) i štiti ga od degradacije izazvane egzonukleazama (21).

Translacijom virusne RNK nastaje prekusorni poliprotein koji se ko- i posttranslacionalno iseca na 10 pojedinačnih proteina pomoću ćelijskih i virusnih proteaza. Core, E1, E2 i p protein isecaju se pomoću ćelijskih signal peptidaza, koje se nalaze u ER. C terminalni domen NS2 zajedno sa N terminalnim domenom NS3 ima enzimsku aktivnost (NS2/3 cink zavisna metaloproteinaza) i iseca poliprotein između NS2 i NS3. Ostali nestrukturani protein isecaju se pomoću NS3/4A proteinaze (15).

Core i NS2 protein su primarno uključeni u formiranje virusa (morfogenezu), a nestrukturani virusni protein, od NS3 do NS5B, neophodni su za replikaciju virusne RNK.

Nestrukturani virusni proteini, od NS3 do NS5B, zajedno sa ćelijskim proteinima, indukuju formiranje komplikovane citoplazmatske strukture sa brojnim vezikulama označene kao *membranous web* (MW). Vezikule potiču od ER i predstavljaju evaginaciju membrane ER (22). MW obuhvata vezikule sa jednom (SMV), dve (DMV) i više lipidnih membrana (MMV) (23). Istraživanja pokazuju da su u DMV skoncentrisani nestrukturani virusni proteini, koji formiraju replikacioni kompleks, i novosintetisane virusne RNK. Ovi rezultati ukazuju na to da se RNK replikacija najverovatnije odvija u DMV. DMV su verovatno povezane sa citosolom pomoću proteinskih kanala koje formiraju virusni i ćelijski protein, ili preko pora na DMV (22).

Nestrukturani virusni proteini, od NS3 do NS5B, zajedno sa faktorima ćelije domaćina, formiraju replikacioni kompleks neophodan za replikaciju virusne RNK. NS5B je RNK zavisna RNK polimeraza, koja ima centralnu ulogu u replikaciji virusne RNK. RNK polimeraza sa genomske (+) RNK prepisuje komplementarnu (-) RNK, na kojoj dalje sintetiše pozitivne RNK transkripte, koji funkcionišu kao genomska RNK za nove virione (23).

Morfogeneza virusa započinje vezivanjem i akumulacijom core proteina na površini lipidnih organela (eng. *lipid droplet* – LD) smeštenih u citoplazmi, a koje se nalaze u neposrednoj blizini DMV, u kojima se odvija replikacija virusne RNK. Precizna uloga LD u morfogenezi virusa još uvek nije razjašnjena. Core protein se, nakon sinteze u ER, prenosi do LD

pomoću ćelijskih i virusnih nestrukturnih proteina, a posebno NS5A (15). Rezultati nekoliko istraživanja ukazuju na to da NS5A obezbeđuje vezu između mesta replikacije virusne RNK i mesta formiranja virusne partikule (kapsida) (24, 25).

DMV ostvaruju konekciju sa citosolom verovatno preko proteinskih kanala ili pora, omogućavajući transport virusnih proteina i genoma između ER (mesta sinteze proteina), DMV (mesta replikacije RNK) i mesta morfogeneze (22).

Novosintetisani RNK genom, nakon replikacije u DMV, sa core proteinom formira kapsid na površini LD uz pomoć ćelijskih i virusnih proteina (14). Nakon formiranja kapsida, virioni pupljenjem ulaze u lumen ER. Glikoproteini omotača (E1 i E2) formiraju kompleks-heterodimer koji se ugrađuje u membranu ER. Ovi procesi (ulazak virusa u lumen ER i integracija E1 i E2 u membranu), kao i morfogeneza virusa na membrani ER povezani su sa sintezom ćelijskih lipoproteina, a apolipoproteini, posebno ApoE, uključeni su u morfogenezu virusa (15).

Zbog toga što je morfogeneza virusa povezana sa sintezom ćelijskih lipoproteina, nameće se pitanje da li se virusne partikule udružuju sa lipoproteinima pre izlaska iz ćelije, ili interaguju sa serumskim lipoproteinima formirajući LVP. Rezultati dosadašnjih istraživanja sugerišu da se ApoB inkorporiše samo tokom procesa morfogeneze virusa, a da virioni verovatno i naknadno stiču lipoproteine (prvenstveno ApoE) nakon izlaska iz ćelije, u ekstracelularnoj sredini (2).

Virus napušta ćeliju procesom egzocitoze, a prilikom izlaska stiče omotač od membrane ER.

3. IMUNSKI ODGOVOR I PATOGENEZA HCV INFEKCIJE

3.1. IMUNSKI ODGOVOR NA HCV INFEKCIJU

Interakcija između HCV-a i hepatocita pokreće urođeni i stečeni imunski odgovor.

3.1.1. Urođeni imunski odgovor

HCV je relativno snažan induktor urođenog imunskog odgovora zbog toga što je njegov genetički materijal izložen u citoplazmi. Glavnu ulogu u urođenom imunskom odgovoru imaju interferoni tipa I (interferon alfa i interferon beta) i interferon tipa III (interferon landa), interferonom stimulisani geni (ISG), NK ćelije i profesionalne antigen prezentujuće ćelije (dendritske ćelije – DC i makrofagi) (26).

Nakon dekapidacije HCV-a, receptori TLR3, RLR (eng. *retinoic acid-inducible gene-1* RIG1 like receptor) i MDA5 (eng. *melanoma differentiation-associated gene 5*), koji se nalaze na inficiranim hepatocitima, prepoznaju dsRNK replikativni intermedijarni produkt i ssRNK. Interakcija između dsRNK replikativnog produkta i ssRNK sa RIG1 i MDA5 aktivira TIR (Toll/IL-1R) i MAVS (eng. *mitochondria antiviral signaling protein*) koji fosforilišu IRF3 (eng. *IFN regulatory factor3*) i IRF7. Fosforilisani IRF3 i IRF 7 indukuju sintezu IFN tipa I i III (27, 28). Pored toga, TLR3 intereaguje sa dsRNK i aktivira TIR, koji fosforiliše IRF3 (29).

Interferoni ne pokazuju antivirusnu aktivnost u ćeliji u kojoj su sintetisani. Da bi ispoljio svoje antivirusno dejstvo, sintetisani interferon treba da bude izlučen iz ćelije u kojoj je sintetisan i da se veže za receptor na ćelijskoj membrani drugih ćelija iste biološke vrste. Molekuli IFN alfa i beta vezuju se za receptor, koji se sastoji od lanaca IFNAR1 i IFNAR2, a koji je prisutan na većini tipova ćelija, dok se interferon landa vezuje za receptor kojeg čine IL10R1 i IL10R2 lanci. Vezivanje molekula interferona za receptore dovodi do aktivacije signalnog puta koji obuhvata aktivaciju tirozin kinaze 2 (Tyk2 protein) i janus kinaze 1 (Jak 1 protein). Ovi enzimi učestvuju u fosforilaciji i aktivaciji STAT1 i STAT 2 proteina (eng. *Signal Transducer and Activator of Transcription*) koji, sa drugim signalnim molekulama, formiraju transkripcioni kompleks, koji se naziva IFN-stimulisani genski faktor 3 (ISGF3). ISGF3 odlazi u jedro ćelije i vezuju se za ciljna promotorska mesta na genima koje stimulišu interferoni (IFN stimulisani responzivni geni – ISG). Aktivacijom, odnosno ekspresijom ISG gena dolazi do

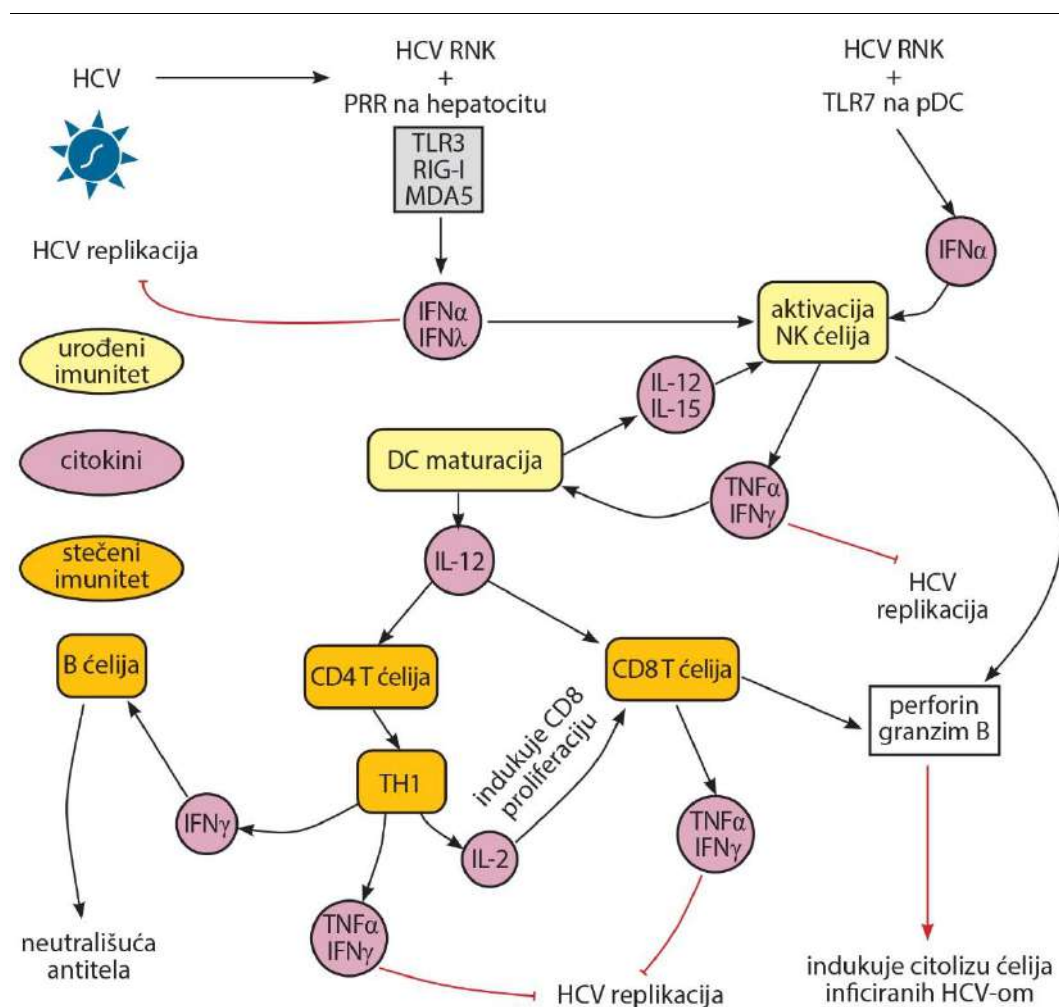
sinteze i aktivacije proteina koji posreduju u inhibiciji sinteze proteina u inficiranoj ćeliji, što dovodi do prestanka virusne replikacije (30).

Osim što dovode do inhibicije virusne replikacije, IFN tipa I i III aktiviraju NK ćelije (26).

U urođenom imunskom odgovoru na HCV infekciju najvažniju ulogu imaju NK ćelije, koje čine oko 30–50% intrahepatičnih limfocita (31). Aktivirane NK ćelije od strane IFN tipa I i III, sekretuju IFN gama i TNF alfa koji indukuju DC maturaciju (i stimulišu makrofage) i inhibiraju HCV replikaciju. Osim toga, NK ćelije oslobađaju citolitičke enzime (perforin/granzim) koji liziraju ćelije inficirane HCV-om. Tako NK ćelije dovode do inicijalne redukcije sistemske viremije (26).

Natural killer T (NKT) ćelije su druga grupa ćelija urođenog imunskog odgovora, koje čine 26% intrahepatičnih limfocita (32, 33). One sekretuju IFN gama, IFN alfa i IL-2 (33). Iako je njihova precizna uloga u hroničnoj HCV infekciji još uvek nejasna, *Swain* navodi da NKT ćelije mogu da utiču na ravnotežu između Th1 i Th2 odgovora na HCV infekciju (34). *Lucas* i saradnici navode da je broj NKT ćelija u jetri pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom povećan (35), dok istraživanja drugih autora ukazuju da je broj ovih ćelija smanjen (36).

U imunski odgovor na HCV infekciju uključene su i dendritske ćelije (DC), koje obuhvataju različite subsetove. Mijeloidne DC (mDC) i plazmocitne DC (pDC) u odgovoru na HCV infekciju produkuju citokine. Nakon maturacije od strane aktiviranih NK ćelija, mDC produkuju IL-12 i IFN lamda, a pDC IFN alfa. Ovi citokini imaju imunostimulatorna svojstva (29). Mijeloidne DC prezentuju virusne antigenske peptide naivnim T helper-ćelijama u limfnim nodusima, usmeravajući njihovu diferencijaciju u Th1 ćelije (37). Klasične dendritske ćelije (cDC) su dominantan subset, čija je glavna funkcija da prenose antigene iz tkiva do lokalnih limfnih nodusa i indukuju antigen specifičan T-ćelijski imunitet ili tolerance (38, 39). Plazmocitne dendritske ćelije (pDC) produkuju visok nivo interferona alfa, nakon interakcije HCV RNK sa TLR7 na pDCs. Pored toga, DC se vezuju za Nkp30 receptor na NK ćelijama i produkuju IL-12 i IL-15 koji aktiviraju NK ćelije. Aktivirane NK ćelije sekretuju IFN gama i TNF alfa koji povećavaju maturaciju i antigensku prezentaciju dendritskih ćelija (40). IL-12 stimuliše diferencijaciju CD4⁺T-ćelija u Th1 ćelije, a CD8⁺T-ćelija u citotoksične T-ćelije. Aktivirane Th1 ćelije sekretuju IFN gama, koji povećava sposobnost DC ćelija da prezentuju antigen i IL-2, koji indukuje proliferaciju HCV specifičnih CD8⁺T-ćelija (41, 42).



Slika 3. Interakcija između HCV-a i hepatocita indukuje urođeni i stečeni imunski odgovor.

Za vreme HCV infekcije interakcija HCV RNK sa TLR3, RIG-I i MDA5 na inficiranim hepatocitima, kao i interakcija sa TLR7 na pDC, dovodi do indukcije sinteze tip I i III interferona.

Tip I i III interferoni inhibiraju replikaciju HCV-a i aktiviraju NK ćelije. Aktivirane NK ćelije proizvode IFN gama i TNF alfa, koji indukuju DC maturaciju i inhibiraju HCV replikaciju. Zrele DC proizvode IL-12, koji indukuje diferencijaciju CD4 $^{+}$ T-ćelija u Th1 ćelije i CD8 $^{+}$ T-ćelija u citotoksične T-ćelije (CTL). Pored toga, IL-12 i IL-15, koje sekretuju DC ćelije, aktiviraju NK ćelije. Th1 ćelije sekretuju IL-2, IFN gama i TNF alfa. IL-2 indukuje proliferaciju CD8 $^{+}$ T-ćelija, dok IFN gama i TNF alfa inhibiraju HCV replikaciju bez citolize inficirane ćelije. Dalje, IFN gama, koji proizvode Th1 ćelije, indukuje diferencijaciju B-ćelija u plazma ćelije, koje proizvode neutrališuća antitela. Na kraju, perforin i granzim B, koje proizvode CTL i aktivirane NK ćelije, indukuju citolizu ćelija inficiranih HCV-om.

Preuzeto iz Chigbu DI, Loonawat R, Sehgal M, Patel D, Jain P. Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells*. 2019;8(4):376. (26)

MDSC (eng. *Myeloid-derived suppressor cells*) je subset mijeloidnih ćelija sa imunosupresivnim dejstvom, koje ostvaruju putem različitih mehanizama. Ove ćelije mogu efikasno da suprimiraju T-ćelijski odgovor produkcijom NO i ROS, koji sprečavaju T-ćelijsku aktivaciju i indukuju apoptozu T-ćelija. MDSC takođe sekretuju arginazu 1, koja smanjuje nivo L arginina, a koji je potreban za ekspresiju TCR receptora na CD8⁺T-limfocitima, samim tim i za proliferaciju T-ćelija. Pored toga, ove ćelije mogu da produkuju imunosupresivne citokine, kao što su IL-10 i TGF beta (43, 44). U istraživanju Ren i saradnika dokazana je ekspanzija MDSC u perifernoj krvi pacijenata sa HCV infekcijom (45). Mehanizam pomoću kojeg HCV indukuje ekspresiju MDSC još uvek nije sasvim razjašnjen.

3.1.2. Stečeni imunski odgovor u HCV infekciji

Adekvatan NK ćelijski odgovor i zrele DC imaju ključnu ulogu u indukovanju efikasnog HCV stečenog imunskog odgovora. Zrele DC produkuju IL-12 koji stimuliše diferencijaciju CD4⁺T-ćelija u Th1 ćelije, a CD8⁺T-ćelija u citotoksične T-ćelije. Aktivirane Th1 ćelije sekretuju IFN gama, TNF alfa i IL-2. IL-2 indukuje proliferaciju CD4⁺ i CD8⁺T-ćelija, a IFN gama i TNF alfa inhibiraju HCV replikaciju bez citolize inficirane ćelije. Pored toga, IFN gama indukuje diferencijaciju B-ćelija u plazma ćelije, koje produkuju neutrališuća antitela (26) (slika 3).

Neutrališuća antitela na HCV pojavljuju se u periodu od 8–12 nedelja od infekcije. Neutrališuća antitela, osim što inhibiraju vezivanje virusa za receptore na ćeliji domaćina (29, 46), inhibiraju virusne i ćelijske faktore koji omogućavaju ulazak HCV-a u ćeliju (47). Zbog hipervarijabilnih regiona u E1 i E2 glikoproteinima, koji su target za neutrališuća antitela, i visokog procenta mutacija, humoralni imunski odgovor je nedovoljno efikasan i ima manju ulogu u kontroli HCV infekcije.

HCV specifični CD4⁺T-ćelijski odgovor u akutnoj fazi HCV infekcije ima značajnu ulogu u kontroli virusne replikacije i eliminaciji virusa. HCV-om inficirane osobe, koje su eliminisale virus u akutnoj fazi, pokazuju prisustvo značajnog nivoa specifičnih CD4⁺T-ćelija. Slab CD4⁺T-ćelijski odgovor uzrokuje perzistentu infekciju sa aktivnom virusnom replikacijom i viremijom (48, 49).

CD8⁺T-ćelijski odgovor je pojačan u akutnoj HCV infekciji. HCV specifične CD8⁺T-ćelije eliminišu virus preko mehanizma citolize inficirane ćelije i bez citolize ćelije (necitolitička aktivnost). HCV specifične CD8⁺T-ćelije napuštaju limfne noduse i odlaze do jetre gde prepoznaju kompleks HCV peptid – MHC molekul I klase na površini hepatocita, što dovodi

do njihove aktivacije (41). Citolitički mehanizam eliminacije virusa ostvaruje se aktivnošću perforina, granzima, Fas ligand/Fas receptor sistema i liganda koji uzrokuje apoptozu povezanu sa TNF alfa (TRAIL). Perforin i granzim B, koje otpuštaju aktivirane CD8⁺T-ćelije, indukuju apoptozu hepatocita preko pro-kaspaze, koja se iseca iz granzima B (50, 51). Apoptoza posredovana Fas-om ostvaruje se aktivacijom kaspaze-8 i kaspaze 9 i naknadnom aktivacijom kaspaza -3, -6 i -7, koje uzrokuju ćelijsku smrt (52). CD8⁺T-ćelijama indukovani Fas ligand-Fas receptor signalni put može da uzrokuje citolizu i inficiranih i neinficiranih ćelija (51).

Necitolitična eliminacija virusa, bez ubijanja inficiranih ćelija, posredovana je IFN gama i TNF alfa, koje proizvode CD8⁺T-ćelije, a koji inhibiraju virusnu replikaciju (49). Otkriveno je da HCV specifičan T-ćelijski odgovor i sekrecija IFN gama koreliraju sa smanjenjem viremije (53, 54). Nasuprot tome, suboptimalni CTL imunski odgovor korelira sa perzistencijom virusa (55, 56). Istraživanja su pokazala da HCV specifične CD8⁺T-ćelije, koje su izložene visokoj viremiji u hroničnoj infekciji, pokazuju smanjenu sposobnost da proliferišu i proizvode IFN gama (49).

Prema tome, hepatitis C je imunopatološko oboljenje u kojem CTL (sekrecijom perforina i granzima ili preko Fas ligand-Fas receptor signanog puta) i aktivirane NK ćelije (sintezom perforina i granzima) indukuju citolizu hepatocita inficiranih HCV-om.

3.2. MEHANIZMI ODGOVORNI ZA USPOSTAVLJANJE PERZISTENTNE HCV INFEKCIJE

Snažan imunski odgovor kod bolesnika sa HCV infekcijom može da dovede do eliminacije virusa. Ipak, virus se spontano eliminiše kod malog broja bolesnika, dok se kod 60–80% obolelih uspostavlja perzistentna HCV infekcija (57). Perzistentna HCV infekcija je glavni faktor rizika za razvoj ciroze i HCC-a. Uslov za razvoj perzistentne HCV infekcije je izbegavanje imunskog odgovora domaćina. Mehanizmi kojima virus izbegava eliminaciju od strane imunskog odgovora su: 1. Genetske varijacije (mutacije) u genima odgovornim za sintezu proteina (epitopa) koje prepoznaju ćelije imunskog odgovora; 2. Supresija imunskog odgovora HCV proteinima; 3. Inhibicija urođenog imunskog odgovora u hroničnoj HCV infekciji; 4. Disfunkcija T-limfocita; 5. Učešće regulatornih T-ćelija (Tregs) u hroničnoj infekciji. Ovi mehanizmi oslabljuju ili menjaju imunski odgovor na HCV infekciju (26).

Mutacije u genima odgovornim za sintezu proteina (epitopa) koje prepoznaju ćelije imunskog odgovora je glavni mehanizam kojim virus izbegava eliminaciju od strane imunskog sistema. HVR1, mali fragment od 27 amino kiselina, E2 regiona je visoko varijabilan. Mutaci-

jama u ovoj sekvenci E2 gena, HCV izbegava eliminaciju od strane neutrališućih antitela (41). Mutacije u NS3 i NS5 genima, čije proteine prepoznaju CD4⁺T-limfociti, dovode do izbegavanja HCV specifičnog CD4⁺T-ćelijskog odgovora (58). Pored toga, mutacije u epitopima koje prepoznaju CD8⁺T-limfociti smanjuju prepoznavanje mutiranih peptida od strane TCR receptora na CD8⁺T-limfocitima i umanjuju afinitet vezivanja epitopa za MHC molekule I klase, čime utiču na efikasnost CD8⁺T-ćelijskog odgovora (59, 60).

Mutacije u CD81, na mestu za koje se vezuje E2, mogu da dovedu do izbegavanja imunskog odgovora koji je posredovan neutrališućim antitelima (46).

Takođe, zbog direktnog prenošenja virusa iz ćelije u ćeliju, virus često izbegava neutrališući efekat antitela (61).

HCV proteini imaju važnu ulogu u uspostavljanju hronične HCV infekcije jer ispoljavaju immunosupresivni efekat na IFN, DC, NK i T-ćelije. Virusni proteini mogu da inhibiraju sintezu i efektorne mehanizme interferona. Istraživanja su pokazala da NS3/4 A protein (serin proteaza) interferira sa RIG-I i TLR3 signalnim putevima, a time i sa produkcijom interferona (62, 63). HCV core protein interreaguje sa STAT1 i time inhibira njegovu aktivaciju (64, 65). Ovaj protein, takođe, inhibira ekspresiju faktora 3 i time onemogućava njegovo vezivanje za IRES u promotornim regionima ISG-a (66, 67).

Zrele DC imaju važnu ulogu u inicijaciji stečenog imunskog odgovora na virus. Međutim, kod bolesnika sa HCV infekcijom broj mDC i pDC je smanjen (68, 69). HCV core i E1 protein inhibiraju maturaciju DC i time umanjuju sposobnost DC da aktiviraju T-ćelije (70). Rezultati istraživanja, objavljeni u literaturi, ukazuju na to da HCV NS5 protein smanjuje sposobnost pDC da produkuju IFN alfa (68, 71, 72). Dalje, studije su pokazale da mDC kod bolesnika sa HCV infekcijom pokazuju smanjenu ekspresiju kostimulatornih molekula (CD83 i CD86) i smanjenu sposobnost da sekretuju IL-12, što dovodi do smanjene sposobnosti mDC da prezentuju antigen T-ćelijama (73, 74). Pored toga, core protein interreaguje sa C1q receptorom na DC i suprimira produkciju IL-12, glavnog citokina za TH1 diferencijaciju (75). Kao posledica inhibicije produkcije IL-12 dolazi do skretanja T-ćelijskog odgovora ka T-ćelijama koje produkuju IL-4 i IL-10, koji inhibiraju aktivaciju dendritskih ćelija i suprimiraju imunski odgovor posredovan Th1 limfocitima (76). Isto tako, core protein, reagujući sa ovim receptorom na mDC, smanjuje ekspresiju IL-2, a time inhibira proliferaciju T-ćelija (77). Takođe, supresija produkcije IL-2 od strane core proteina može da dovede do smanjene diferencijacije memorijskih HCV specifičnih CD8⁺T-ćelija u efektorne HCV specifične CD8⁺T-ćelije (52, 78). HCV core protein, takođe, smanjuje ekspresiju MHC molekula I klase i kostimulatornih molekula na DC što dovodi do smanjene sposobnosti ovih ćelija da učestvuju u

indukovanju HCV specifičnog CD4⁺ i CD8⁺T-ćelijskog odgovora (79). Pored toga, interakcija core protein sa gCqR na makrofagima indukuje ekspresiju A20, koji predstavlja negativan regulator u makrofagima. Posledica ove interakcije je smanjena sekrecija IL-1 i IL-6 (80). Interakcija core protein sa ovim receptorom na mDC dovodi do inhibicije produkcije IL-12 (koja se odvija posredstvom TLR) i smanjenja produkcije IFN gama od strane allogenihi CD4⁺T-ćelija, što ugrožava TH1 diferencijaciju CD4⁺T-limfocita (75). Pored toga, HCV-om inficirane DC indukuju imunsku tolerancu jer sekretuju značajnu količinu IL-10 (68, 81), što uzrokuje supresiju T-ćelijskog odgovora.

Pored zrelih denritskih, NK ćelije imaju ključnu ulogu u indukciji efikasnog stečenog imunskog odgovora na HCV infekciju. Međutim, rezultati istraživanja pokazuju da je kod bolesnika sa HCV infekcijom smanjen broj NK ćelija u perifernoj krvi i jetri, kao i njihova citotoksičnost. Pored toga, kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom uočena je povećana ekspresija inhibitornih receptora na NK ćelijama (CD94/NKG2A), a smanjena ekspresija citotoksičnih receptora (NKp30 i NKp46) (82, 83). Zbog smanjenog citotoksičnog kapaciteta, NK ćelije sekretuju značajnu količinu IL-10 i TGF beta koji dovode do smanjene funkcije DC (82, 84). Rezultati objavljeni u literaturi sugerišu da je vezivanje HCV E2 proteina za CD81 na NK ćelijama udruženo sa smanjenom citolitičkom funkcijom NK ćelija i smanjenom produkcijom IFN gama (85). Međutim, *Yoon* i saradnici odbacuju ovu tezu, pošto su pokazali da se HCV E2 protein ne vezuje za CD81 na NK ćelijama (86). *Nattermann* i saradnici su otkrili da core protein može da blokira NK posredovanu citolizu hepatocita (87). Core protein takođe povećava ekspresiju MHC molekula I klase na inficiranoj ćeliji, što dovodi do rezistencije ćelije na citotoksičnost NK ćelija (88). Nasuprot tome, HCV NS4 A/B protein može da blokira ekspresiju MHC molekula I klase na površini inficirane ćelije, zbog čega je smanjeno prepoznavanje inficiranih hepatocita od strane HCV specifičnih CD8⁺T-ćelija (89).

Za vreme hronične HCV infekcije dolazi do disfunkcije T-ćelija. Zbog nesposobnosti imunskog sistema da kontroliše viremiju za vreme hronične infekcije, T-ćelije su perzistentno izložene virusu, što dovodi do iscrpljenosti T-ćelija (90). Iscrpljene T-ćelije imaju smanjen kapacitet da produkuju proinflamatorne citokine, smanjenu citolitičku funkciju i smanjenu sposobnost proliferacije (91, 92). Rezultati brojnih istraživanja ukazuju na to da HCV specifični CD8⁺T-limfociti kod bolesnika sa hroničnom infekcijom pokazuju smanjenu produkciju IFN gama, smanjenu proliferaciju i citotoksičnost (93, 94). Ovi limfociti takođe podležu masivnoj apoptozi u jetri za vreme hronične HCV infekcije (95). Tako, smanjena funkcija CD4⁺ i CD8⁺T-limfocita korelira sa perzistencijom virusa (48).

Prva fenotipska osobina iscrpljenih T-ćelija, uglavnom CD8⁺T-ćelija, je da u hroničnoj HCV infekciji, odnosno viremiji, eksprimira višak koinhibitornih molekula, kao što su PD-1, CTLA-4, LAG-3, 2B4, CD160 i Tim-3 (92, 96, 97). Pojedini autori smatraju da visok nivo PD-1 na HCV specifičnim T-ćelijama u akutnoj infekciji može da bude marker progresije u perzistentnu infekciju (98, 99). Druga fenotipska karakteristika iscrpljenih CD8⁺T-limfocita, u poređenju sa memorijskim CD8⁺T-limfocitima, je niža ekspresija IL-7R alfa (CD127), receptora za citokin IL-7 i IL-2R beta (CD122), receptora za citokin IL-15 (100, 101). *Radziewicz* i saradnici su otkrili intrahepatične iscrpljene HCV specifične CD8⁺T-limfocite sa visokim nivoom ekspresije PD-1 i niskim nivoom ekspresije CD127. Ovaj rezultat sugerije da HCV infekcija može imati uticaj na razvoj memorijskih CD8⁺T-ćelija (102).

IL-10, kojeg proizvode makrofagi, DC, regulatorne T-ćelije i Th2 ćelije, može da suprimira funkcije CD4⁺ i CD8⁺T-ćelija (103). Povećana sekrecija IL-10 prisutna je u hroničnoj HCV infekciji (104, 105).

Regulatorne T-ćelije, Treg ćelije (CD4⁺CD25⁺T-limfociti) imaju značajnu ulogu u perzistenciji HCV-a. Poslednjih godina studije su bile fokusirane na ispitivanje uloge ovih ćelija u razvoju perzistentne HCV infekcije. *Cabrera* i saradnici objavili su rezultate koji govore da je kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom broj CD4⁺CD25⁺ regulatornih T-limfocita (T-ćelija) visok (106) i da ove ćelije mogu da suprimiraju specifične CD8⁺T-ćelije putem sekrecije immunosupresivnih citokina. Deplecija CD4⁺CD25⁺ Treg ćelija iz periferne krvi bolesnika sa HCV infekcijom dovodi do obnavljanja proliferacije i produkcije peptid specifičnog IFN gama od strane HCV specifičnih CD8⁺T-ćelija (107). Međutim, pošto ove ćelije suprimiraju specifične CD8⁺T-ćelije, osim što doprinose uspostavljanju perzistentne infekcije, mogu da doprinesu smanjenju oštećenja tkiva jetre.

HCV, osim hepatocita, može da inficira i T- i B-limfocite interakcijom sa CD81 i da se u njima replikuje (108). *Sarhan* i saradnici su objavili da koekspresija CD5 i CD81 povećava tropizam HCV-a za T-ćelije (109). HCV infekcija i replikacija u T-ćelijama udružena je sa smanjenjem sekrecije IFN zbog inhibicije STAT1 aktivacije (110). Inficirane periferne B-ćelije predstavljaju rezervoar HCV-a (111).

Perzistentna HCV infekcija uzrokuje hronično oštećenje jetre, posredovano imunskim odgovorom, koje može da ima progresivni tok, do razvoja fibroze, ciroze i eventualno HCC-a (9).

3.3. TNF ALFA I HCV INFEKCIJA

Oštećenje jetre, kao posledica različitih etioloških faktora među kojima je i HCV, pokreće inflamatorni odgovor domaćina putem aktivacije Kupferovih ćelija (makrofaga). Aktivirane Kupferove ćelije sekretuju niz citokina, kao to su: TNF alfa, transformišući faktor rasta-beta (TGF beta), trombocitni faktor rasta i drugi. Ovi citokini aktiviraju zvezdaste ćelije jetre, lokalizovane u parasinusoidalnom prostoru, koje zatim sintetišu komponente ekstracelularnog matriksa (112, 113, 114).

Citokini su glikoproteini, imunomodulatorni proteini, koje sekretuju brojne ćelije, a među njima: imunske ćelije (makrofagi, T- i B-limfociti, mastociti), endotelijalne ćelije, fibroblasti i stromalne ćelije (115). Citokini se dele na: monokine (koje proizvode monocitne loze) i limfokine (koje proizvode limfocitne loze). Na osnovu svoje funkcije mogu biti klasifikovani na tip 1, gde spadaju proinflamatorni citokini (npr. TNF alfa, IF gama, IL-2 i IL-12) i tip 2 koji obuhvata antiinflamatorne citokine (TGF beta 1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13) (116). Citokini tipa 1 pojačavaju ćelijski imunski odgovor, a tipa 2 produkciju antitela. Međutim, neki citokini, kao što je IL-6, pokazuju i proinflamatorne i antiinflamatorne efekte (117).

Disregulacija proinflamatornih i antiinflamatornih citokina može biti odgovorna za razvoj i klinički ishod mnogih infekcija, autoimunskih i malignih oboljenja (118). Pojačana ekspresija citokina tipa 1 može da dovede do brojnih inflamatornih reakcija sa ozbiljnim posledicama (117).

Kapacitet produkcije citokina je individualan i genetski je determinisan.

Razlike u profilima citokina i nivoima njihove ekspresije među osobama mogu biti posledica polimorfizma alela u regulatornim ili u kodirajućim regionima citokinskog gena. Mutacije u kodirajućem regionu mogu da dovedu do gubitka ili promene funkcije eksprimiranog proteina, dok polimorfizam u 5' i 3' regulatornim sekvencama ili intronima može da utiče na nivo transkripcije (119).

Rezultati brojnih studija ukazuju na to da postoji korelacija između genetskog polimorfizma u okviru određenog gena (što može da utiče na nivo ekspresije citokina) i kliničkih manifestacija, sa aspekta osetljivosti na infekciju ili progresije bolesti (117).

TNF alfa je prototip proinflamatornog citokina sa brojnim aktivnostima. TNF alfa je multifunkcionalni medijator imunskog i inflamatornog odgovora domaćina kojeg proizvode različite ćelije, posebno aktivirani makrofagi i T-ćelije. TNF alfa je uključen u brojne fiziološke i patološke procese u organizmu. kao što su: inhibicija virusne replikacije, aktivacija makrofaga

i NK ćelija, kao i brojni T-ćelijski zavisni imunski procesi (indukcija apoptoze, usmeravanje T-ćelijskog odgovora prema razvoju Th1 ili Th2 fenotipa i regulacija proliferacije) (120).

Gen koji kodira sintezu TNF alfa lokalizovan je na hromozomu 6 u klasi III regiona glavnog histokompatibilnog kompleksa, između HLA-B i HLA-DR (121).

U okviru TNF alfa gena opisano je nekoliko polimorfizama (eng. *single nucleotide polymorphism* – *SNP*). Od posebnog značaja su dva bialelijska SNP, na -238 ili -308 poziciji u promotornom regionu. SNP na poziciji -308 ima dve varijante alela: TNF308.1 alel (prisustvo guanine – G) i TNF308.2 alel (prisustvo adenine – A). TNF308.1 je češći alel nego TNF308.2 (122). Istraživanja su pokazala da je TNF308.2 alel snažniji transkripcioni aktivator nego alel TNF308.1 (123), a da je veća produkcija TNF alfa povezana sa višim stepenom inflamacije (124). TNF308.2 alel dovodi do povećane ekspresije i konstitutivnog i inducibilnog TNF alfa (123). SNP sa alelom TNF308.2 povezan je sa nekoliko inflamatornih, autoimunih, infektivnih i malignih oboljenja (125).

Prisustvo alela SNP na poziciji -308 definiše tri genotipa TNF alfa: GG, GA i AA.

TNF alfa je važan citokin u HCV infekciji jer ga sekretuju CTL u jetri. Kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom otkriven je povišen nivo TNF alfa u serumu i jetri (126). Povišen nivo TNF alfa korelira sa stepenom hepatične inflamacije i progresijom hroničnog oboljenja jetre u fibrozu (127).

TNF alfa ima glavnu ulogu u oštećenju tkiva jetre i razvoju fibroze. On posreduje u procesu apoptoze i stimuliše aktivaciju i proliferaciju zvezdastih ćelija jetre koje, stimulisane posredstvom TNF alfa, sekretuju komponente ekstracelularnog matriksa. TNF alfa aktivira Kupferove ćelije, rezidentalne makrofage jetre, što dovodi do naknadne ekspresije TGF beta. Ekspresija TGF beta korelira sa histološkim gradusom i lobularnom nekrozom u hroničnoj HCV infekciji (112, 114).

Pored toga, proinflamatorni citokini, TNF alfa i TNF beta, koji se nalaze jedan do drugog na hromozomu 6, aktiviraju transkripcioni faktor NF-kappa B koji stimuliše proinflamatorne gene (120). Istraživanja su pokazala da TNF alfa može da stimuliše produkciju drugih inflamatornih citokina, kao što su IL-1, IL-6, IL-8 i IL-10, koji mogu da uzrokuju teži stepen oštećenja jetre (123, 125).

CTL, koji infiltrišu jetru, sekretuje TNF alfa. Pored toga, HCV infekcija indukuje produkciju TNF alfa u hepatocitima. Pošto HCV core protein interreaguje sa odgovarajućim proteinom, članom TNF2 superfamilije, ova interakcija može da redukuje ili poveća apoptozu po-

sredovanu putem TNF alfa. Tako, efikasnost procesa apoptoze, koja je posredovana putem TNF alfa, može da bude izmenjena u hroničnoj HCV infekciji (120).

Postoji dilemma da li stepen oštećenja jetre korelira sa funkcionalnom aktivnošću HCV specifičnih CTL. Istraživanja su pokazala da HCV specifični CTL, posredstvom Fas ligand/Fas receptor i produkcijom TNF alfa ubijaju i neinficirane hepatocite (51). *Kinnman* i saradnici su, imunohistohemijskim istraživanjima, dokazali prisustvo TNF alfa u mononuklearnim ćelijama koje infiltriraju jetru kod bolesnika sa HCV infekcijom. U ovom istraživanju otkriveno je manje od 2% HCV specifičnih CD8⁺T-ćelija koje infiltriraju jetru, što ukazuje na to da CTL aktivnost može biti samo delimično odgovorna za oštećenje jetre, a da IFN gama i TNF alfa, koji potiču iz nespecifičnih citotoksičnih ćelija, imaju ključni značaj kao medijatori lokalnih patoloških promena (128).

TNF alfa, poreklom iz aktiviranih Kupfferovih ćelija, produkuje slobodne radikale i druge vrste reaktivnog kiseonika. Ove komponente su važni medijatori hepatične fibrogeneze (129).

3.4. OKSIDATIVNI STRES

Hronična HCV infekcija povezana je sa povećanim intenzitetom oksidativnog stresa u tkivu jetre. Literaturni podaci ukazuju na to da intenzitet oksidativnog stresa utiče na stepen inflamacije i da može biti značajan parametar u proceni težine oboljenja jetre kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom (130, 131, 132).

Termin reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species* – ROS) obuhvata slobodne radikale koje odlikuje visoka hemijska nestabilnost. Među njima najznačajni su: superoksidni anjon radikal (O₂^{•-}), hidroksilni radikal (HO[•]) i hidrogen peroksid (H₂O₂). Slobodni radikali normalno se stvaraju u metabolizmu, posebno u mitohondrijima, endoplazmatskom retikulumu, peroksizomima, ali i citoplazmi tokom katabolizma purinskih baza. Enzimi odgovorni za produkciju slobodnih radikala su ksantin oksidaza, citohrom P450 oksidaze, ciklo-oksigenaze, lipoksigenaze i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH)-oksidaze. Oksidativni stres predstavlja stanje poremećene ravnoteže između prooksidativnog i antioksidativnog sistema u ćeliji, nastalo usled pojačanog stvaranja slobodnih radikala u odnosu na kapacitet sistema antioksidativne odbrane da neutrališe slobodne radikale (133, 134).

U tkivu jetre, ćelije odgovorne za produkciju slobodnih radikala i njihovo oslobađanje su: hepatociti, neparenhimske ćelije jetre (npr. Kupferove ćelije – rezidentni makrofagi), inflamatorne ćelije, zvezdaste ćelije jetre i druge imunske efektorske ćelije (135). Uloga slobodnih radikala u razvoju hepatocelularnog oštećenja može biti direktna ili indirektna. Slobodni

radikali indukuju ćelijsko oštećenje putem direktne interakcije sa različitim biološkim molekulima, kao što su nezasićene masne kiseline, proteini i nukleinske kiseline. Nastali slobodni radikali mogu oštetiti nezasićene masne kiseline ćelijskih membrana i intraćelijskih organela, pre svega mitohondrija i ER, gde dovode do lipidne peroksidacije. Narušavanje njihovih strukturalnih svojstava odražava se na funkciju i integritet ćelija. Oksidativna modifikacija proteina dovodi do promene strukture i funkcije proteina, usled oksidativne modifikacije određenih amino kiselina, ali i agregacije i degradacije proteina i remećenja njihove tercijarne strukture. Pored toga, slobodni radikali u višku ispoljavaju i „klastogeni efekat“, koji podrazumeva oštećenje hromozoma i mutacije protoonkogeni i strukturalnih gena, što može pokrenuti proces kancerogeneze (136, 137).

Indirektna uloga slobodnih radikala u oštećenju hepatocita odvija se preko redoks-senzitivnog transkripcionog faktora NF- κ B. Slobodni radikali aktiviraju redoks-senzitivni transkripcioni faktor NF- κ B, koji odlazi do jedra gde indukuje sintezu inflamatornih citokina (138).

Kao i druge eukariotke ćelije, i hepatociti poseduju specifične neenzimske i enzimске, vitaminske i nevitaminske sisteme odbrane od oksidativnog stresa. Među enzimima antioksidativne zaštite značajni su katalaza, superoksid dizmutaza, glutation reduktaza i glutation transferaza. Regulacija biosinteze ovih enzima vrši se transkripcionim faktorom Nrf2, koji preko svog promotora prepoznaje takozvani antioksidativni element odgovora (ARE). Ravnoteža između aktivnosti sistema koji oslobađaju slobodne radikale i sistema antioksidativne zaštite Nrf2/ARE determiniše ćelijsku reakciju na povećane vrednosti slobodnih radikala (139, 140, 141).

Oštećenje hepatocita može dovesti do niza reakcija kratkoročne adaptacije, pre svega putem indukovane regeneracije jetre, koja može biti značajan faktor remisije bolesti. Ukoliko infekcija perzistira, vrlo brzo dolazi do iscrpljivanja adaptivnih mehanizama, a ishod može biti genomska nestabilnost koja može dovesti do karcinogeneze, ili ćelijska smrt, odnosno apoptoza (142). Apoptoza ćelija je u bliskoj vezi sa fibrozom, jer funkcionalni jetrin parenhim biva zamenjen fibroznim tkivom (143).

4. KLINIČKA ISPOLJAVANJA HCV INFEKCIJE

HCV je uzročnik akutnog hepatitis sa visokom učestalošću progresije bolesti u hronično oboljenje jetre.

Inkubacioni period hepatitisa C iznosi 1–16 nedelja, najčešće 7 nedelja (5). Akutna HCV infekcija je asimptomatska kod 15–30% bolesnika i otkriva se na osnovu povišenih vrednosti enzima jetre (9). U akutnoj fazi infekcije javljaju se simptomi karakteristični za hepatitis: malaksalost, gubitak apetita, tamna boja urina, svetla boja stolice i žutica. Vrednosti serumske alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) dostižu preko 10 puta više vrednosti od normalnih (144). Anti-HCV antitela dostižu merljivi nivo najčešće u periodu 8–12 nedelja (a moguće i do 9 meseci) (5), a HCV RNK 1–2 nedelje od infekcije (9, 145). Nivo HCV RNK kod bolesnika sa akutnim hepatitisom C pokazuje oscilacije, a u toku fluktuacije može se dobiti i negativan nalaz. Kod oko 30% bolesnika sa akutnim hepatitisom C dolazi do spontane eliminacije virusa u toku 6 meseci od infekcije (145).

Nakon akutne faze infekcije, kod oko 70% bolesnika virus uspostavlja perzistentu infekciju (26). Prisustvo HCV RNK u krvi bolesnika duže od 6 meseci od infekcije upućuje na perzistentnu infekciju (9). Faktori rizika za uspostavljanje perzistentne HCV infekcije su: godine starosti, muški pol, kompromitovan imunski sistem, koinfekcija sa HIV-om, asimptomatska akutna faza bolesti, mutacije virusa i genetski faktori domaćina (146). Hronična HCV infekcija obično je praćena visokim nivoima viremije (HCV RNK u krvi), fluktuirajućim vrednostima transaminaza i markera inflamacije (5). Međutim, istraživanja pokazuju da pacijenti sa hroničnim hepatitisom C mogu da imaju permanentno normalne vrednosti transaminaza (9).

Perzistentna HCV infekcija uzrokuje hronično oboljenje jetre sa progresivnim tokom, od hroničnog hepatitisa preko ciroze jetre do hepatocelularnog karcinoma. Kod oko 20–30% bolesnika sa hroničnim hepatitisom C razvija se ciroza jetre nakon 25 godina, a HCC kod 1–4% bolesnika godišnje (9).

Hronična infekcija je često praćena metaboličkim poremećajima, kao što su insulinska rezistencija, dijabetes tip 2 i steatoza. Ekstrahepatične manifestacije hronične HCV infekcije su: purpurna ospa, bolovi u zglobovima, vaskulitis i glomerulonefritis (5).

5. EPIDEMIOLOGIJA

HCV infekcija predstavlja ozbiljan globalni zdravstveni problem. Većina podataka, koji se odnose na rasprostranjenost ove infekcije u svetu, zasniva se na ispitivanju seroprevalence, odnosno prisustvu anti-HCV antitela.

Anti-HCV antitela, kao marker prethodne infekcije, otkrivena su kod 115 miliona ljudi (1,6% svetske populacije), a 75 miliona ima hroničnu HCV infekciju (1,1%) (147).

Međutim, postoje značajne razlike u prevalenci anti-HCV antitela u odnosu na regione. Visoka prevalenca anti-HCV antitela (viša od 3,5%) otkrivena je u Centralnoj i Istočnoj Aziji, Severnoj Africi i Srednjem Istoku. Srednja prevalenca anti-HCV antitela (1,5–3,5%) registrovana je u Južnoj i Jugoistočnoj Aziji, subsaharskoj Africi, Centralnoj i Južnoj Latinskoj Americi, Okeaniji i Evropi, a niska prevalenca (manje od 1,5%) na pacifičkoj obali Azije, u tropskoj Latinskoj Americi i Severnoj Americi (147).

Messina i saradnici, koji su u svom izveštaju obuhvatili 90% svetske populacije u period od 1989. do 2013. godine, iznose podatke da je genotip 1 dijagnostikovao kod 46% pacijenata, genotip 3 kod 30%, genotip 2 kod 9%, genotip 4 kod 8%, genotip 6 kod 2%, a genotip 5 kod 1% ispitanika. Udružena infekcija sa različitim genotipovima virusa otkrivena je kod 3% od ukupnog broja bolesnika sa HCV infekcijom (148).

Mortalitet kod bolesnika sa HCV infekcijom raste poslednjih decenija. Prema dostupnim podacima, od 2000. godine mortalitet je porastao za 22%, a oko 700.000 ljudi godišnje umre zbog oboljenja izazvanih ovim virusom (5).

HCV se prenosi parenteralnim putem (transfuzijom krvi i krvih produkata, i putem kontaminiranih, nesterilnih instrumenata), vertikalno sa majke na dete i seksualnim putem.

Transfuzija krvi bila je glavni put prenošenja virusa u prošlosti. Iako se virus najefikasnije prenosi na ovaj način, u zemljama gde se sprovodi skrining krvi donora na prisustvo HCV infekcije adekvatnim metodama, mogućnost prenošenja virusa ovim putem je značajno smanjena.

Međutim, dostupni podaci iz najsiromašnih zemalja sveta govore o tome da se u 39 zemalja ne sprovodi rutinski skrining krvi donora, a da se u pojedinim siromašnim okruzima 47% krvnih uzoraka ne testira odgovarajućom dijagnostičkom procedurom. Zbog toga je u ovim zemljama transfuzija krvi još uvek dominantan put prenošenja virusa.

Prenošenje virusa preko nesterilisanih igli danas je najčešći put prenošenja infekcije u razvijenim zemljama, a grupa sa najvećom učestalošću infekcije je grupa intravenskih narkomana. U SAD 68% novih slučajeva hepatitisa C potiče iz grupe intravenskih narkomana. I u razvijenim zemljama Evrope (Italiji, Francuskoj, Velikoj Britaniji i Norveškoj) ovo je dominantan put prenošenja virusa. Analize govore da je oko 10 miliona intravenskih narkomana širom sveta anti-HCV pozitivno. I u zemljama u razvoju ovo je vrlo značajan put prenošenja virusa (147).

Rizik za prenošenje virusa preko nesterilnih igli postoji i pri tetoviranju, akupunkturi, pirsingu i drugim paramedicinskim procedurama. *Pybus* i saradnici iznose hipotezu da se HCV može preneti ubodom artropoda, koji mogu da prenose virus sa čoveka na čoveka (149). Medicinski radnici su rizična grupa za infekciju ovim virusom zbog mogućih slučajnih perkutanih povreda na radu.

Vertikalna transmisija HCV-a je ređa nego vertikalna transmisija HBV-a. Ona je registrovana kod oko 5% HCV pozitivnih majki. Faktori koji utiču na vertikalnu transmisiju su: visok nivo virusne replikacije kod majke, genotip virusa i stanje imunskog sistema majke.

HCV se prenosi i seksualnim putem, ali je učestalost ovog puta prenošenja niža nego kod HBV infekcije. HCV se može naći u spermi inficirane osobe. Faktori rizika za prenošenje virusa seksualnim putem su: homoseksualni odnosi, promiskuitetno ponašanje i intravensko konzumiranje droga (147).

6. VIRUSOLOŠKA DIJAGNOSTIKA HCV INFEKCIJE

Virusološka dijagnostika HCV infekcije obuhvata dve kategorije laboratorijskih testova: indirektna i direktna laboratorijske testove. U indirektna testove spadaju serološki testovi za detekciju antitela na HCV (anti-HCV antitela ili antitela na pojedinačne virusne antigene), a u direktna testove oni kojima se detektuju komponente virusa (core antigen i virusna RNK).

6.1. DETEKCIJA ANTI HCV ANTITELA

Testovi za detekciju anti-HCV antitela imaju funkciju skrining testova. Za detekciju anti-HCV antitela koristi se ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) test treće generacije. ELISA testovi treće generacije sadrže rekonfigurisani core antigen (c22p), NS3 antigen (c33c), NS4 antigene (c100-3 i 5-1-1p) i antigen NS5 regiona. Senzitivnost ovih testova iznosi oko 99%, a specifičnost 100% (150).

Najnoviji dostupan ELISA test četvrte generacije istovremeno detektuje core antigen i antitela prema core, NS3, NS4 i NS5 antigenima. Međutim, istraživanja pokazuju da ovaj test ima ograničanu specifičnost (150, 151).

Antitela na HCV antigene otkrivaju se najčešće u periodu 8–12 nedelja (145), ali mogu da dostignu merljivi nivo i kasnije, u periodu do 9 meseci nakon infekcije (period prozora) (5).

Nedostatak ELISA testova za detekciju anti-HCV antitela ogleda se u tome što nalaz može biti lažno negativan i lažno pozitivan. Lažno negativan nalaz može se dobiti ako je uzorak krvi uzet u vreme perioda prozora i kod imunokompromitovanih bolesnika (bolesnika sa HIV infekcijom, transplantacijom organa i bolesnika na hemodijalizi). ELISA test može biti lažno pozitivan (anti-HCV pozitivan u odsustvu aktivne infekcije) kod bolesnika koji su eliminisali virus (zbog toga što antitela ostaju u serumu godinama posle eliminacije virusa), kod onih koji boluju od lupusa ili reumatoidnog artritisa, kao i kod beba anti-HCV pozitivnih majki (zbog toga što se antitela klase IgG prenose transplacentarno). Istraživanja pokazuju da 1 od 5 anti-HCV pozitivnih osoba nema HCV infekciju (152).

Pošto je ELISA test pozitivan i ako su u serumu prisutna samo antitela na jedan virusni antigen, kao potvrdni test koristi se Rekombinantni imunoblot test (RIBA test). RIBA testom

detektuju se antitela na pojedinačne virusne antigene, a test je pozitivan ako su u serumu prisutna antitela na bar dva strukturna virusna protein.

Osnovi nedostatak seroloških testova je u tome što oni nemaju značaja u diferencijalnoj dijagnozi aktivne infekcije i prethodne infekcije čiji je ishod bila eliminacija virusa, jer antitela mogu da perzistiraju u serumu godinama nakon eliminacije virusa (153).

6.2. DETEKCIJA HCV CORE ANTIGENA (HCVAG)

Testovi za detekciju core antigena, ELISA i CLIA (*chemiluminescence immunoassay*), pojavili su se u prethodnih deset godina, kao zamena za testove za detekciju virusne RNK, jer molekularna dijagnostika nije svuda dostupna. Rezultati pojedinih istraživanja pokazali su da se ovim testom detektuje HCV infekcija jednako uspešno kao i sa testovima pomoću kojih se detektuje virusna RNK, i to ranije nego sa serološkim testovima treće generacije. Nivoi HCV core antigena prate nivoe viremije (HCV RNK u krvi) i mogu da se koriste u praćenju efikasnosti terapije, nezavisno od genotipa virusa (154). Istraživanja pokazuju da nova generacija CLIO kvantitativnog testa (Abbot, Germany) ima senzitivnost komparabilnu sa onom kod PCR-a, ali manju od senzitivnosti RT-PCR-a (155).

6.3. DETEKCIJA HCV RNK

Molekularne virusološke tehnike imaju ključnu ulogu u dijagnostici HCV infekcije i predstavljaju zlatni standard za detekciju aktivne infekcije.

Postoje kvalitativni i kvantitativni testovi za detekciju virusne RNK.

Kvalitativni testovi se standardno koriste kao potvrđni testovi u dijagnostici HCV infekcije, a u upotrebi je pre svega RT-PCR (5). Ovom metodom virusna RNK može se detektovati najranije u prvoj nedelji, a najkasnije nakon 2 nedelje od infekcije (156).

Lažno negativan nalaz je veoma redak, ali je moguć ako bolesnik ima još uvek veoma mali broj virusa u krvi.

Pozitivan nalaz ukazuje na aktivnu infekciju. Lažno pozitivan nalaz se retko javlja, a može biti posledica kontaminacije uzorka bolesničkog materijala (152).

Detekcija HCV RNK kvalitativnim testom neophodna je:

- za dijagnozu akutne HCV infekcije
- u diferencijalnoj dijagnostici aktivne infekcije i eliminacije virusa
- kod novorođenčadi anti- HCV pozitivnih majki.

Kvantitativni test se koristi za određivanje nivoa viremije. U upotrebi je RT-PCR sa reverznom transkripcijom (rRT-PCR) (5). Određivanje nivoa viremije neophodno je za praćenje efikasnosti antivirusne terapije. Za praćenje efikasnosti terapije treba koristiti uvek isti komercijalni test (157).

Genotipizacija virusa je neophodna jer različiti genotipovi pokazuju različita klinička ispoljavanja i odgovor na terapiju. Najčešće se koriste PCR testovi sa reverznom hibridizacijom ili sekvencioniranje C i NS5B regiona virusnog genoma (5).

7. NAUČNA HIPOTEZA

Rezultati dosadašnjih istraživanja posvećenih identifikaciji faktora koji potiču od virusa (genotip/suptip i nivo viremije), a koji imaju uticaj na progresiju hroničnog oboljenja jetre kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom su kontradiktorni.

Novija istraživanja posvećena su uticaju genetskih faktora na klinički tok HCV infekcije i progresiju hroničnog oboljenja jetre, a posebno uticaju polimorfizma TNF alfa, citokina sa brojnim inflamatornim aktivnostima, kao i ulozi oksidativnog stresa u patogenezi oštećenja hepatocita.

Na osnovu dosadašnjih saznanja i dostupnih literaturnih podataka o povezanosti faktora koji potiču od virusa (genotip/suptip i nivo viremije) i genetskih faktora (polimorfizam TNF alfa-308) sa kliničkim manifestacijama hronične HCV infekcije, kao i o značaju oksidativnog stresa u patogenezi hronične HCV infekcije, postavljena je sledeća radna hipoteza:

1. HCV genotip/suptip i viremija mogu imati uticaj na kliničke manifestacije hronične HCV infekcije;
2. Genotip TNF alfa-308 ima uticaj na kliničke manifestacije hronične HCV infekcije;
3. Kod bolesnika sa HCV infekcijom postoji disbalans između markera oksidativnog stresa i antioksidativnog odbranog sistema organizma.

8. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi uticaj bioloških karakteristika HCV-a (genotipa/suptipa i nivoa viremije) i genotipova TNF alfa-308 na kliničke manifestacije hronične HCV infekcije, kao i odnos markera oksidativnog stresa i antioksidativnog odbrambenog sistema kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom.

Pojedinačni ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi distribuciju HCV genotipova kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom;
2. Ispitati korelaciju nivoa viremije (broj IU HCV RNK) i HCV genotipova/suptipova virusa;
3. Ispitati povezanost nivoa serumskih transaminaza (AST i ALT) i HCV genotipova/suptipova;
4. Ispitati povezanost HCV genotipova/suptipova, nivoa viremije i nivoa serumskih transaminaza sa kliničkim manifestacijama hronične HCV infekcije;
5. Utvrditi povezanost TNF alfa-308 genotipova (GG, GA i AA) i kliničkih manifestacija hronične HCV infekcije;
6. Ispitati nivo markera oksidativnog stresa i antioksidativnog odbrambenog sistema kod bolesnika sa HCV infekcijom;
7. Ispitati povezanost HCV genotipova/suptipova i viremije sa nivoom markera oksidativnog stresa.

9. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je sprovedeno u Centru za mikrobiologiju, na Odeljenju za virusologiju, Instituta za javno zdravlje u Nišu i u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

9.1. PACIJENTI I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanjem je obuhvaćena grupa od 98 bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom (anti-HCV i HCV RNK pozitivni duže od 1 godine), starosti od 24 do 81 godine. Kod svih ispitanika isključena je infekcija ostalim hepatotropnim virusima, HIV-om, kao i oboljenja jetre nevirusne etiologije.

9.1.1. Virusološka ispitivanja

Anti-HCV antitela detektovana su Version 4.0 ELISA testom (DIA. PRO, Diagnostic Bioprobes Srl, Italy).

Za izolaciju i detekciju HCV RNK, određivanje broja IU HCV RNK (broj IU/mL plazme) i genotipizaciju virusa korišćena je Real-time PCR metoda i to:

- Ribo-virus Sacace kit za izolaciju HCV RNK;
- REAL-TM QUAL new version Sacace za detekciju HCV RNK;
- HCV REAL-TM QUANT new version Sacace za određivanje broja IU HCV RNK (IU/mL plazme);
- HCV Genotype PLUS REAL-TN Sacace za genotipizaciju virusa.

Sve dijagnostičke procedure sprovedene su po preporukama proizvođača testova.

9.1.2. Genotipizacija TNF alfa-308

Genotipizacija TNF alfa-308 (TNF α -308) vršena je kod svih pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom i u kontrolnoj grupi. Kontrolnu grupu činilo je 168 zdravih osoba (dobrovoljnih davalaca krvi), čiji su rezultati ispitivanja polimorfizma gena TNF α -308 korišćeni iz baze podataka Laboratorije za funkcionalnu genomiku i proteomiku Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu. Za genotipizaciju TNF α -308 korišćena je PCR metoda.

Izolacija DNK iz pune krvi izvedena je korišćenjem komercijalnog seta za izolaciju Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, Made in USA - Read SDS).

Lančanom reakcijom polimerizacije umnožavani su segmenati DNK u okviru kojih se nalazi SNP ispitivanog gena TNF alfa-308 (rs1800629). Za izvođenje lančane reakcije korišćen je QIAGEN kit. Sastav smeše za ukupnu zapreminu od 25 μ l činili su: voda / varijabilno, HotStarTaq DNA Polymerase (5U/ μ l) 0,125 μ l, 10X PCR Buffer 2,5 μ l, dNTP (10mM od svakog) 0,5 μ l, F prajmer (10 μ M) 0,5 μ l, R prajmer (10 μ M) 0,5 μ l i DNK 25 ng.

Sekvence prajmera korišćene za određivanje genskog polimorfizma TNF alfa-308 (rs1800629) bile su: F: 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGGGCCAT-3' i R: 5'-ACA CTC CCC ATC CTC CCT GCT-3'.

Za izvođenje lančane reakcije polimerizacije korišćen je PCR aparat Eppendorf Mastercycler ep Gradient S. Uslovi odvijanja PCR reakcije bili su: 95°C – 15 min, 94°C – 30s, 56°C – 30 min, 72°C – 1min, 72°C – 10 min, 34 ciklusa. Uspešnost PCR amplifikacije proveravana je metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Za pripremanje 2% agaroznog gela korišćeni su 1,2 g agaroze (Serva, Nemačka) i 60 ml 1X TBE pufera sledećeg sastava: 0,89 M Tris-HCl, 0,89 M borna kiselina, 0,5 M EDTA pH 8,0. Elektroforeza se odvijala u istom puferu u trajanju od 1h, pri struji jačine 100 mA i naponu 100 V. Nakon završene elektroforeze, gel je bojen u rastvoru etidijum bromida u trajanju od 30 minuta, a zatim je izvršena vizuelizacija pod UV svetlošću transiluminatora (MacroVue UVis-20 Transilluminator, Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Za određivanje veličine PCR produkata korišćen je marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka).

Nakon verifikacije PCR produkata na agaroznom gelu (117 bp), izvršena je restrikciona digestija primenom odgovarajuće Fast Digest (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka) restrikcione endonukleaze, enzima koji prepoznaje specifičnu palindromsku sekvencu i hidrolizom fosfodiestarskih veza DNK daje fragmente odgovarajuće dužine. Reakcionu smešu za reakciju restrikcione digestije činili su: 2 μ l 10X Fast Digest pufera, 0,5 μ l odgovarajućeg restrikcionog enzima (NcoI), 5 μ l PCR produkta i voda do ukupne zapremine od 20 μ l. Reakcija se odvijala u vodenom kupatilu 20 minuta na temperaturi od 37 °C.

Restrikcioni enzim palindromske sekvence za TNF alfa-308 (rs1800629) bio je NcoI 5'...C↓C A T G G...3' 3'...G G T A C↑C...

Identifikacija dobijenih restrikcionihih fragmenata izvršena je na 8% poliakrilamidnom gelu (PAGE). Poliakrilamidni gel se dobija polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida uz primenu odgovarajućih katalizatora. Proces polimerizacije u reakcionoj smeši odvijao se

istovremenim dodavanjem 10% amonijum persulfata (APS) i N,N,N',N'- tetrametiletilendi-
amina (TEMED) u 30% rastvor akrilamida (29:1 akrilamid: N'N'- -metilenbisakrilamid u
vodi).

Elektroforeza se odvijala u 1X TBE puferu u trajanju od 60 minuta pri struji jačine 20 mA
i naponu 120 V. Nakon završene elektroforeze, gel je bojen u rastvoru etidijum bromida u
trajanju od 5 minuta, a zatim je izvršena vizuelizacija pod UV svetlošću transiluminatora
(MacroVue UVis-20 Transilluminator, Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Za određivanje
veličine PCR produkata korišćen je marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fisher Scientific
GmbH, Schwerte, Nemačka).

Homozigotni, normalni (divlji, engl. *Wild Type*) genotip GG predstavljen je prisustvom
dva fragmenta veličine 97 bp i 20 bp, dok prisustvo dva polimorfna alela predstavlja AA
genotip, koji se na agaroznom gelu vidi kao jedinstveni fragment veličine 117 bp. Prisustvo
sva tri fragmenta (117 bp, 97 bp i 20 bp) odgovara heterozigotnom GA genotipu.

9.1.3. Kliničko ispitivanje

Parametri kliničkog ispitivanja (parametri kliničke procene patoloških promena u jetri i
vrednosti AST-a i ALT-a) dobijeni su iz medicinske dokumentacije pacijenata lečenih na
Klinici za infektivne bolesti Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu.

Klinička procena patoloških promena u jetri izvršena je kod 87 pacijenata sa hroničnom
HCV infekcijom za koje su bili dostupni klinički parametri za definisanje stadijuma fibroze
(parametri fibroskena i/ili indeks fibroze FIB-4). FIB-4 indeks se izračunava na osnovu 4
parametara (godine starosti, AST, ALT i broj trombocita), pomoću sledeće formule:

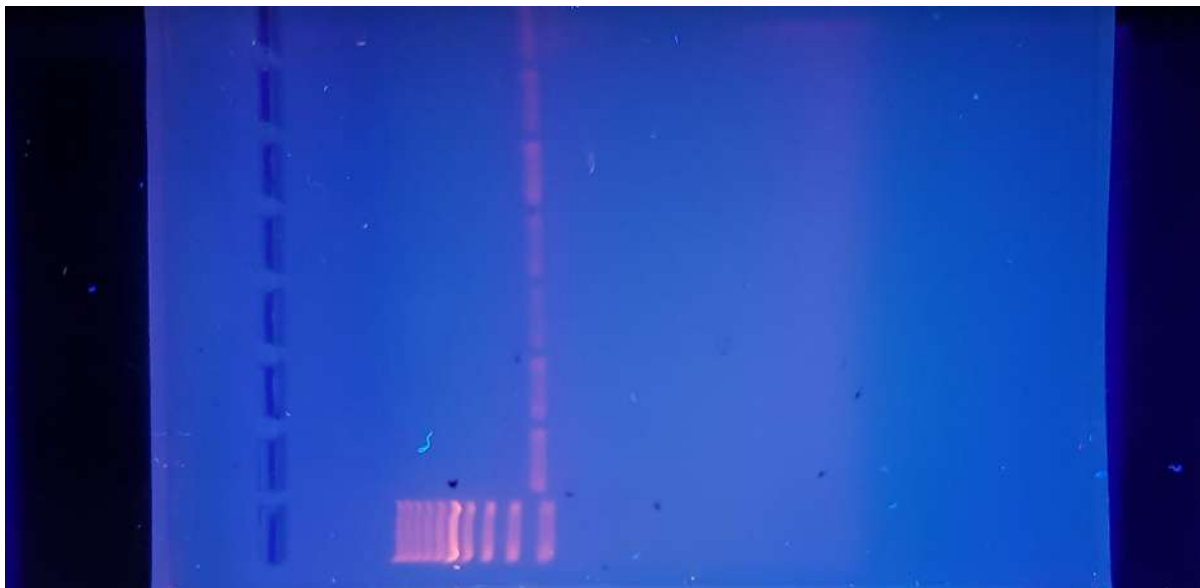
$$FIB - 4 = \frac{god * AST (U/L)}{br. trombocita (10^9/L) * \sqrt{ALT(U/L)}}$$

Na osnovu Vodiča Svetske zdravstvene organizacije (*Guidelines for the care and
treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection*) iz 2018. godine, cut-
off vrednost skora od 3,25 smatrana je relevantnom za značajnu fibrozu (portnu fibrozu sa
septama-stadijuma \geq F2 prema METAVIR scoring sistemu) (158). Pacijenti sa cut-off vrednošću
manja od 3,25 svrstani su u grupu bez fibroze ili sa blagom fibrozom (METAVIR skor F0-F1).

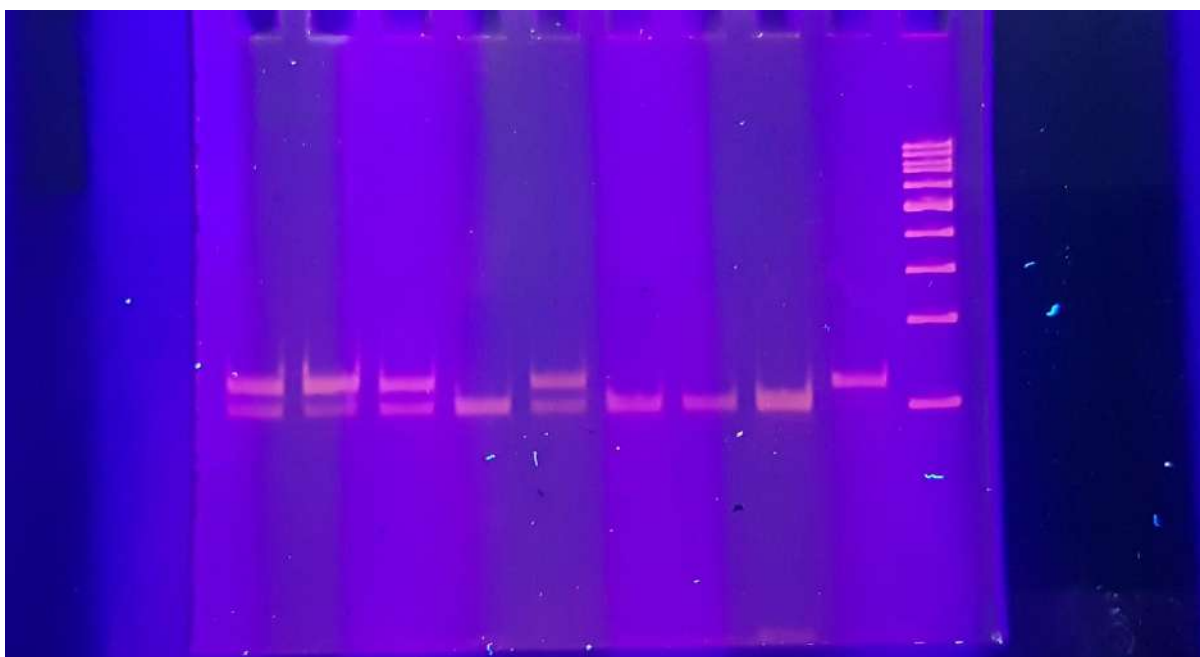
Na osnovu FIB-4 skora, pacijenti su podeljeni u dve grupe: pacijenti sa fibrozom stadi-
juma \geq F2 i pacijenti sa stadijumom F0-F1.

Krv za genotipizaciju virusa i određivanje nivoa viremije uzorkovana je istovremeno i
to u vreme analize biohemijskih markera, kao faktora za dobijanje FIB-4 skora.

Distribucija genotipova/suptipova, nivo viremije, vrednosti transaminaza i distribucija TNF alfa-308 genotipova komparativno su analizirani u grupi pacijenata sa fibrozom stadijuma \geq F2 i grupi pacijenata sa stadijumom F0-F1.



Slika 4. Provera uspešnosti amplifikacije TNF alfa-308 polimorfizma metodom elektroforeze na 2%-agarnom gelu.



Slika 5. Poliakrilamidni gel elektroforeza za TNF alfa-308, rs 1800629 polimorfizam. Kolona 1 – marker (ladder), kolona 2 – AA-genotip, kolone 3, 4, 5, 7 – GG genotip, kolone 6, 8, 9, 10 – GA genotip.

9.1.4. Ispitivanje markera oksidativnog stresa i antioksidativnog sistema

Ispitivanje markera oksidativnog stresa (TBARS i AOPP) i antioksidativnog enzima (katalaze) obavljeno je kod 52 bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom i 50 zdravih osoba, dobrovoljnih davalaca krvi, kao kontrolne grupe.

Nivo TBARS-a (eng. *Thiobarbituric acid reactive substances*-TBARS) izražava nivo malondialehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije. AOPP (eng. *Advanced oxidation protein products* – AOPP) su produkti uznapredovale oksidacije proteina. Katalaza predstavlja enzimski antioksidans, kao parametar antioksidativnog sistema.

Koncentracija TBARS-reaktivnih jedinjenja (MDA) određivana je po metodi koju su opisali *Sahreen* i saradnici (159). MDA reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom formirajući kompleks ružičaste boje. Reakciona mešavina sadržala je: 0,2 mL seruma, 0,2 mL askorbinske kiseline (100 mM), 0,58 mL kalijum fosfatnog pufera (0,1 M; pH=7,4) 0,02 mL gvožđe hlorida – FeCl₃ (100 mM), 1 mL CCl₃COOH (10%) i 1 mL TBA (0,67% rastvorene u 0,1 M NaOH), a zagrevana je 30 minuta u kipućoj vodi (100°C). Nakon centrifugiranja na 4000 rpm tokom 10 minuta, optička gustina (eng. *absorbance*) ružičaste boje očitavana je na 535 nm. Koncentracija TBARS bila je izražena u μmol/L MDA.

Koncentracija AOPP-a određivana je spektrofotometrijski, prema metodi koju su opisali *Witko-Sarsat* i saradnici (160). Količina od 200 μL seruma, razblaženog u PBS (1:5), odnosno hloramina -T u uzorku standardnog rastvora, postavljana je na mikrolejt sa 96 otvora. Dodato je 10 μL 1,16 M KJ i 20 μL anhidrozne CH₃COOH. Žuta boja je očitavana na 340 nm na mikrolejt-čitaču. Koncentracija AOPP-a izražena je u μmol/L hloramina-T.

Aktivnost katalaze u serumu određivana je spektrofotometrijskom metodom koju su opisali *Nabavi* i saradnici (161). Reakciona mešavina sadržala je: 0,5 mL 50 mM fosfatnog pufera (pH 5,0), 1,5 mL 5,9 mM H₂O₂, i 0,1 mL seruma. Inkubirana je 5 min, a nakon toga, reakcija je zaustavljena dodavanjem 0,1 mL 20% TCA i 1 mL 4% amonijum molibdata. Uzorci su centrifugirani, a promena optičke gustine izračunavana je na 240 nm, oduzimanjem od standardnog uzorka, gde je 0,1 mL destilovane vode bilo dodato umesto seruma. Aktivnost katalaze bila je definisana kao Kat/L, što je značilo promenu optičke gustine od 0,01 jedinice/min.

9.2. STATISTIČKA ANALIZA

Za upisivanje, rangiranje, grupisanje, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka korišćen je Excel program iz Microsoft Office 2010 programskog paketa. Proračuni su vršeni korišćenjem SPSS programa u verziji 18.0. U svim analizama je, kao granica statističke značajnosti, podrazumevana greška procene od 0,05 ili 5%.

Poređenje zastupljenosti pojedinih kategorija atributivnih obeležja između grupa vršeno je Hi kvadrat testom (*Chi square test*).

Šapiro-Vilkov (*Shapiro-Wilk*) test korišćen je za testiranje normalnosti raspodele numeričkih vrednosti. Poređenje vrednosti između dve grupe pacijenata vršeno je Man-Vitnijevim (*Mann-Whitney*) testom. Poređenje vrednosti između četiri grupe pacijenata sa različitim HCV genotipovima/suhtipovima vršeno je neparametrijskom analizom varijanse (Non-parametric ANOVA), odnosno Kraskal Valisovim (*Kruskal Wallis*) testom i naknadnim testiranjem Man-Vitnijevim testom.

Univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresionom analizom ispitivana je povezanost ispitivanih obeležja sa verovatnoćom nastanka značajne fibroze jetre. Izračunavane su vrednosti odnosa verovatnoća za nastanak i nenastanak značajne fibroze (odds ratio – OR) i granice njihovih 95% intervala poverenja (95% IP).

Univarijantnom i multivarijantnom linearnom regresionom analizom ispitivana je povezanost ispitivanih obeležja sa vrednostima FIB-4 skora, AST-a i ALT-a. Izračunavane su vrednosti koeficijenata linearne korelacije (B) i granice njihovih 95% intervala poverenja (95% IP).

U multivarijantnoj analizi, i kod logističke i kod linearne regresije, za formiranje konačnih modela primenjivan je enter metod, odnosno sve nezavisno promenljive su zadržavane u konačnom modelu, bez obzira da li su značajno povezane sa zavisno promenljivom ili nisu, kako bi se kontrolisao i njihov uticaj.

Međuzavisnost između viremije (broja IU HCV RNK u mL plazme), parametara oksidativnog stresa i aktivnosti katalaze ispitivana je izračunavanjem Pirsonovog koeficijenta korelacije (r) i odgovarajuće p vrednosti.

10. REZULTATI

Istraživanjem je obuhvaćeno 98 pacijenata, 70 (71.4%) muškaraca i 28 (28.6%) žena.

Prosečna starost pacijenata iznosila je 53.22 ± 11.24 godine, medijana 52.00, a starost se kretala od 24 do 81 godine.

Prosečan broj IU HCV RNK iznosio je $5.121.591.13 \pm 8.630.730.44$, medijana 1.941.500.00, a kretao se od 200 do 51.104.000 IU/ml.

Prosečna vrednost AST-a iznosila je 79.04 ± 94.89 U/L, medijana 56.50, a vrednosti su se kretale od 11 do 878 U/L.

Prosečna vrednost ALT-a iznosila je 92.45 ± 106.19 U/L, medijana 74.00, a vrednosti su se kretale od 5 do 950 U/L.

Prosečna vrednost FIB-4 skora iznosila je 3.35 ± 2.82 , medijana 2.56, a kretala se je od 0.37 do 18.84 (tabela 1).

Tabela 1. Karakteristike pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom

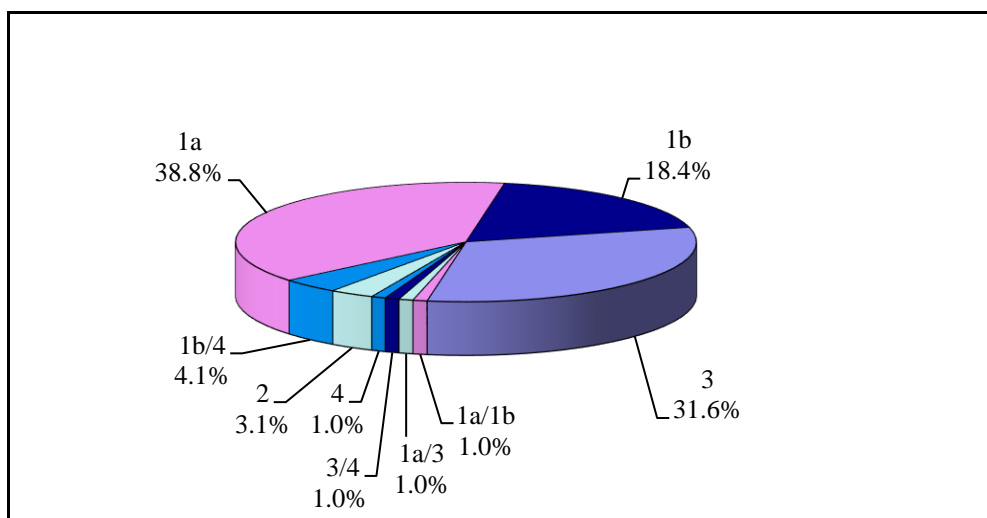
Karakteristika	Parametri
Pol	
Muškarci	70 (71.4%)
Žene	28 (28.6%)
Starost (godine)	53.22 ± 11.24 52.00 (24.00–81.00)
HCV RNK (IU/mL)	$5.121.591.13 \pm 8.630.730.44$ 1.941.500 (200–51.104.000)
AST (U/L)	79.04 ± 94.89 56.50 (11.00–878.00)
ALT (U/L)	92.45 ± 106.19 74.00 (5.00–950.00)
FIB-4 skor	3.35 ± 2.82 2.56 (0.37–18.84)

Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija i medijana (minimum–maksimum), kao i učestalost (procenat).

HCV genotip 1a otkriven je kod 38 (38.8%) pacijenata, 1b kod 18 (18.4%), genotip 2 kod 3 (3,1%), genotip 3 kod 31 (31.6%), genotip 4 kod jednog (1,0%) pacijenta, a kod 7 (7,1%) pacijenata otkrivena je mešovita infekcija i to: genotipovi 1a/1b kod jednog, 1b/4 kod 4, a genotipovi 1a/3 i 3/4 kod po jednog pacijenta (tabela 2, grafikon 1).

Tabela 2. Distribucija HCV genotipova kod pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom

HCV genotip	Broj(%)
1a	38 (38.8%)
1b	18 (18.4%)
3	31 (31.6%)
Ostali	11 (11.2%)



Grafikon 1. Distribucija HCV genotipova

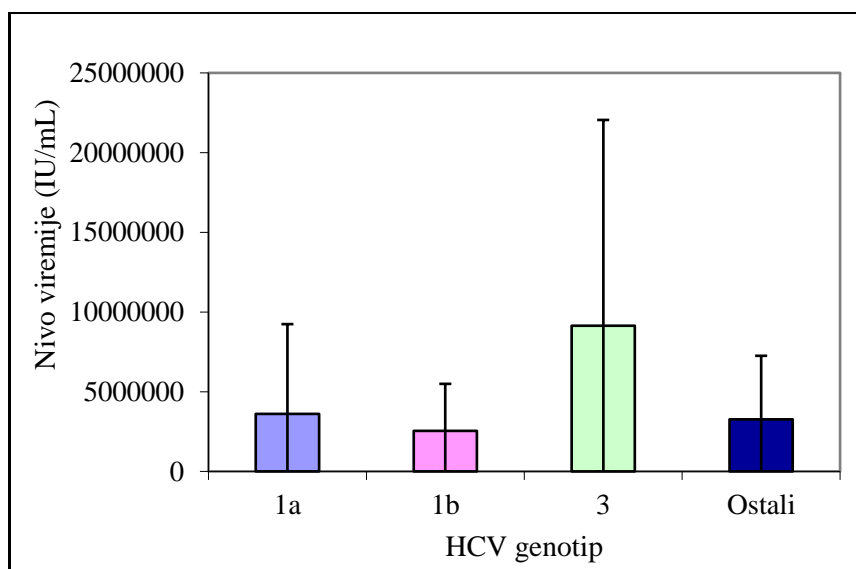
Prosečan broj IU HCV RNK kod pacijenata sa genotipom 1a iznosio je $3.602.018 \pm 5.638.592$, medijana 1.150.000, a kretao se od 200 do 27.000.000 IU/mL. Kod pacijenata sa 1b genotipom prosečan broj IU HCV RNK bio je manji i iznosio je $2.543.866 \pm 2.948.741$, medijana 1.820.000, a kretao se od 1.289 do 11.150.000 IU/mL. Kod pacijenata sa genotipom 3 prosečan broj IU HCV RNK bio je najveći i iznosio je $9.139.441 \pm 12.910.000$, medijana 5.002.552, a kretao se od 1.180 do 51.104.000 IU/mL. Kod pacijenata sa ostalim genotipovima prosečan broj IU HCV RNK iznosio je $3.266.091 \pm 3.987.300$, medijana 2.240.000, a kretao se od 140.000 do 13.500.000 IU/mL.

Neparametrijska analiza varijanse – ANOVA (*Kruskal Wallis test*) je pokazala da razlike u prosečnom broju IU HCV RNK između četiri ispitivane grupe nisu statistički značajne ($p=0.260$) (tabela 3, grafikon 2).

Tabela 3. Vrednosti HCV RNK (IU/mL) u odnosu na HCV genotip

HCV genotip	HCV RNK (IU/mL)
1a (n=38)	3.602.018±5.638.592 1.150.000 (200–27.000.000)
1b (n=18)	2.543.866±2.948.741 1.820.000 (1.289–11.150.000)
3 (n=31)	9.139.441±12.910.000 5.002.552 (1.180–51.104.000)
Ostali (n=11)	3.266.091±3.987.300 2.240.000 (140.000–13.500.000)
Poređenje	ANOVA: $p=0.260$

Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija, i kao medijana (minimum–maksimum)



Grafikon 2. Nivo viremije u odnosu na HCV genotip

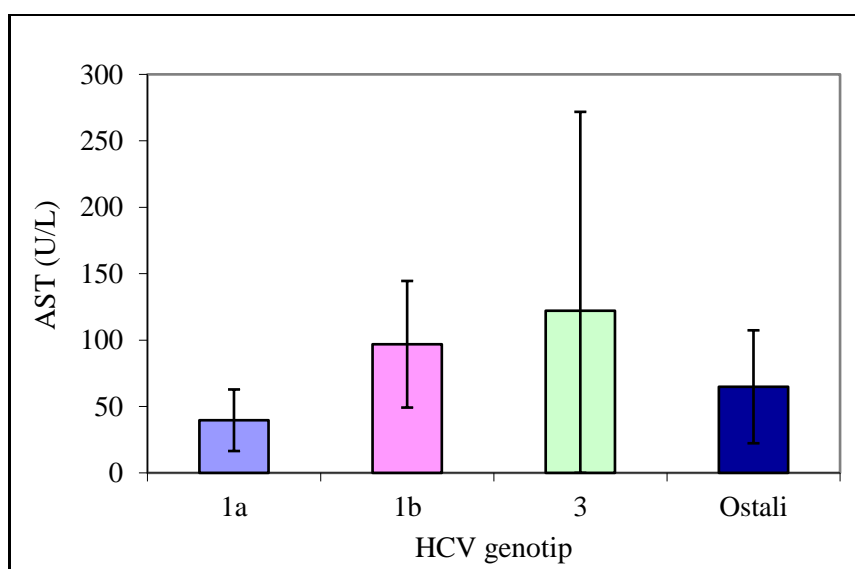
Prosečna vrednost AST-a kod pacijenata sa genotipom 1a iznosila je 39.63 ± 23.18 U/L, medijana 32.50, a vrednosti su se kretale od 11 do 98 U/L. U grupi pacijenata sa genotipom 1b prosečna vrednost AST-a bila je viša i iznosila je 96.83 ± 47.65 U/L, medijana 94.50, a vrednosti su se kretale od 48 do 250 U/L. U grupi pacijenata sa genotipom 3 prosečna vrednost AST-a bila je najviša i iznosila je 122.06 ± 149.73 U/L, medijana 90, a vrednosti su se kretale od 28 do 878 U/L. Kod pacijenata sa ostalim genotipovima prosečna vrednost AST-a iznosila je 64.82 ± 42.51 U/L, medijana 51, a vrednosti su se kretale od 33 do 166 U/L. Neparametrijska analiza varijanse (*Kruskal Wallis* test) i naknadno testiranje *Mann-Whitney* testom su pokazali da su razlike u prosečnim vrednostima AST-a između četiri ispitivane grupe statistički značajne (ANOVA: $p < 0.001$), i to: da su vrednosti AST-a u grupama pacijenata sa genotipom 1b i 3 značajno više nego kod pacijenata sa genotipom 1a (*Mann-Whitney* test: $p < 0.001$) i kod pacijenata sa ostalim genotipovima (*Mann-Whitney* test: $p = 0.021$ i $p = 0.047$).

Prosečna vrednost ALT-a kod pacijenata sa 1a genotipom iznosila je 47.34 ± 28.96 U/L, medijana 44.50, a vrednosti su se kretale od 5 do 119 U/L. U grupi pacijenata sa genotipom 1b prosečna vrednost ALT-a bila je viša i iznosila je 126.11 ± 75.47 U/L, medijana 108.00, a vrednosti su se kretale od 41 do 330 U/L. U grupi pacijenata sa genotipom 3 prosečna vrednost ALT-a bila je najviša i iznosila je 134.06 ± 161.57 U/L, medijana 97, a vrednosti su se kretale od 33 do 950 U/L. Kod pacijenata sa ostalim genotipovima prosečna vrednost ALT-a iznosila je 75.91 ± 53.23 U/L, medijana 62, a vrednosti su se kretale od 31 do 203 U/L. Neparametrijska analiza varijanse (*Kruskal Wallis* test) i naknadno testiranje *Mann-Whitney* testom su pokazali da su razlike u prosečnim vrednostima ALT-a između četiri ispitivane grupe statistički značajne (ANOVA: $p < 0.001$), odnosno da su vrednosti ALT-a u grupama pacijenata sa genotipom 1b i 3 značajno više nego kod pacijenata sa genotipom 1a (*Mann-Whitney* test: $p < 0.001$) i kod pacijenata sa ostalim genotipovima virusa (*Mann-Whitney* test: $p = 0.011$ i $p = 0.038$) (tabela 4, grafikoni 3 i 4).

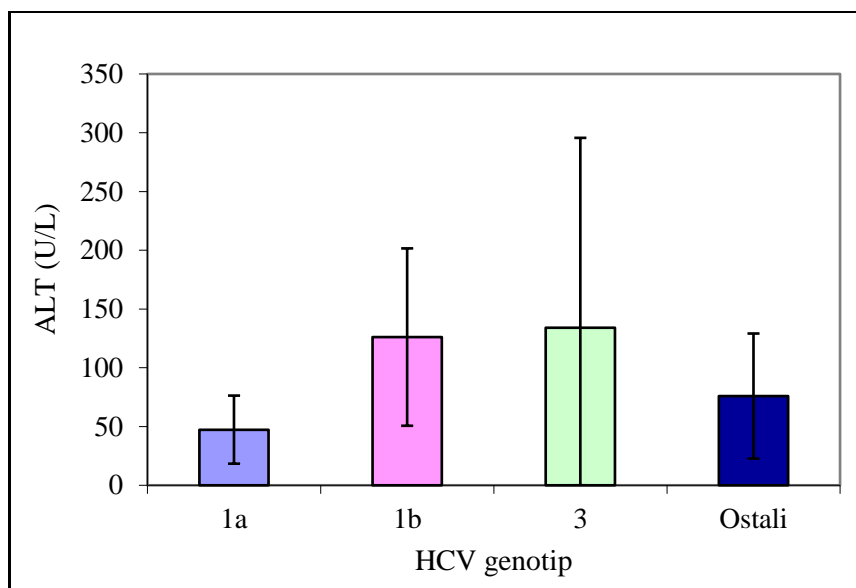
Tabela 4. Vrednosti AST-a i ALT-a (U/L) u odnosu na HCV genotip

HCV genotip	AST	ALT
1a (n=38)	39.63±23.18 32.50 (11–98)	47.34±28.96 44.50 (5–119)
1b (n=18)	96.83±47.65 94.50 (48–250)	126.11±75.47 108.00 (41–330)
3 (n=31)	122.06±149.73 90 (28–878)	134.06±161.57 97 (33–950)
Ostali (n=11)	64.82±42.51 51 (33–166)	75.91±53.23 62 (31–203)
Poređenje	ANOVA: p<0.001 Mann-Whitney test: 1a vs 1b: p<0.001 1a vs 3: p<0.001 1b vs Ostali: p=0.021 3 vs Ostali: p=0.047	ANOVA: p<0.001 Mann-Whitney test: 1a vs 1b: p<0.001 1a vs 3: p<0.001 1b vs Ostali: p=0.011 3 vs Ostali: p=0.038

Naopomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i kao medijana (minimum–maksimum).



Grafikon 3. Vrednosti AST-a u odnosu na HCV genotip

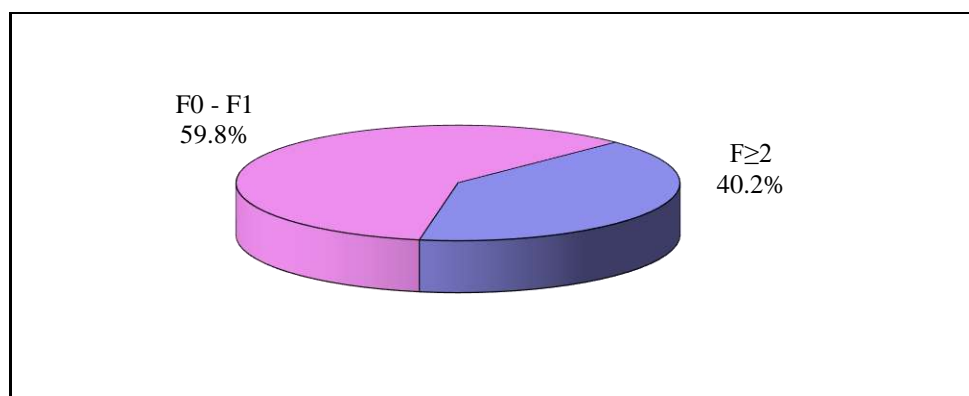


Grafikon 4. Vrednosti ALT-a u odnosu na HCV genotip

Kod 35 (40.2%) pacijenata evidentirana je fibroza stadijuma \geq F2, a kod 52 (59.8%) pacijenta stadijum F0-F1 (tabela 5, grafikon 5).

Tabela 5. Distribucija stadijuma fibroze kod pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom

Stadijum fibroze	Broj (%)
F0-F1	52 (59.8%)
\geq F2	35 (40.2%)



Grafikon 5. Distribucija stadijuma fibroze

U grupi od 52 pacijenta sa stadijumom F0-F1, genotip 1a bio je zastupljen kod 25 (48.1%), 1b kod 6 (11.5%), genotip 3 kod 13 (25.0%), a ostali genotipovi kod 8 (15.4%) pacijenata. Kod 35 pacijenata sa fibrozom stadijuma \geq F2, genotipovi 1a i 1b otkriveni su kod po 9 (25.7%) ispitanika, genotip 3 kod 16 (45.7%), a jedan (2.9%) ispitanik imao je mešanu infekciju izazvanu genotipovima 1b i 4. Hi kvadrat test je pokazao da je zastupljenost genotipa 3 značajno viša kod

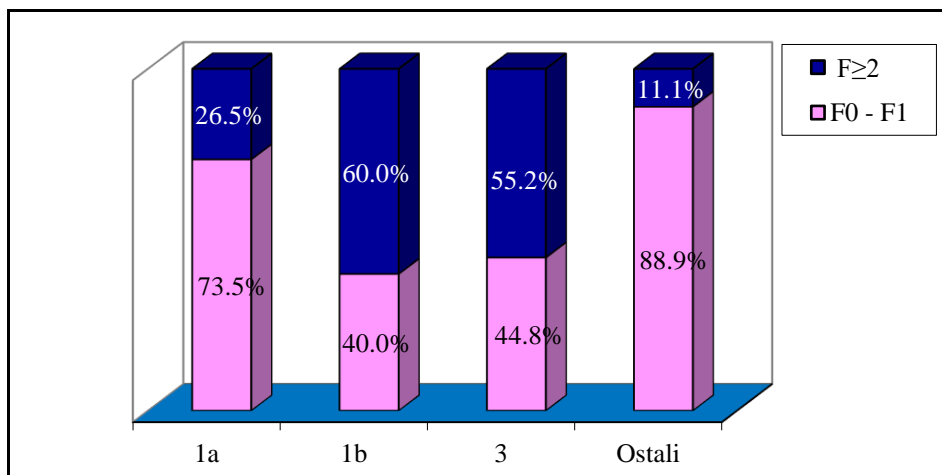
pacijenata sa fibrozom stadijuma \geq F2 ($p=0.044$), dok je zastupljenost genotipa 1a značajno viša kod pacijenata sa stadijumom F0-F1. ($p=0.036$). Zastupljenost genotipa 1b i ostalih genotipova nije se značajno razlikovala kod pacijenata sa stadijumima F0-F1 i \geq F2.

U grupi od 34 pacijenta sa genotipom 1a, stadijum fibroze \geq F2 bio je zastupljen kod 9 (26.5%) ispitanika. Kod 15 pacijenata sa genotipom 1b, stadijum fibroze \geq F2 evidentiran je kod 9 (60.0%) bolesnika. Kod 29 pacijenata sa genotipom 3, fibroza stadijuma \geq F2 bila je zastupljena kod 16 (55.2%) ispitanika. Od 9 pacijenata sa ostalim genotipovima virusa, fibroza stadijuma \geq F2 bila je zastupljena kod jednog (11.1%) bolesnika. Hi kvadrat test je pokazao da je zastupljenost fibroze stadijuma \geq F2 bila značajno viša kod pacijenata sa genotipovima 1b i 3 nego kod pacijenata sa 1a i ostalim genotipovima virusa (1a vs 1b: $p=0.025$; 1a vs 3: $p=0.020$; 1b vs ostali: $p=0.019$; 3 vs ostali: $p=0.020$) (tabela 6, grafikon 6).

Tabela 6. Zastupljenost stadijuma fibroze u odnosu na HCV genotipove, kao i zastupljenost HCV genotipova u odnosu na stadijum fibroze

HCV genotip	F0 i F1 (n=52)	F \geq 2 (n=35)	Poređenje izmeđustepena fibroze
1a (n=34)	25 (48.1%) (73.5%)	9 (25.7%) (26.5%)	p=0.036
1b (n=15)	6 (11.5%) (40.0%)	9 (25.7%) (60.0%)	p=0.086
3 (n=29)	13 (25.0%) (44.8%)	16 (45.7%) (55.2%)	p=0.044
Ostali (n=9)	8 (15.4%) (88.9%)	1 (2.9%) (11.1%)	p=0.060
Poređenje između genotipova (χ^2 test)	1a vs 1b: 1a vs 3: 1b vs Ostali: 3 vs Ostali:	p=0.025 p=0.020 p=0.019 p=0.020	

Napomena: Vrednosti su prikazane kao učestalost (procenat)



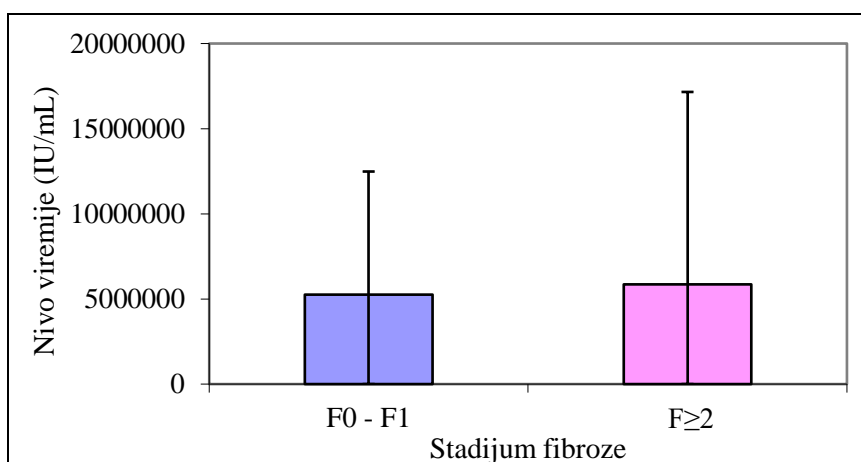
Grafikon 6. Stadijum fibroze u odnosu na HCV genotipove

Prosečan broj IU HCV RNK kod pacijenata sa sastadijumom F0-F1 iznosila 5.251.184, medijana 2.195.000, a kretao se od 200 do 30.000.000 IU/mL. U grupi pacijenata sa fibrozom stadijuma \geq F2 prosečan broj IU HCV RNK iznosio je 5.856.197, medijana 1.800.000, a kretao se od 1.289 do 51.104.000 IU/mL. *Mann-Whitney* test je pokazao da razlike u prosečnom broju IU HCV RNK između dve ispitivane grupe nisu statistički značajne ($p=0.802$) (tabela 7, grafikon 7).

Tabela 7. Vrednosti HCV RNA (IU/mL) u odnosu na stadijum fibroze

F0-F1 (n=52)	\geq F2 (n=35)	p
5.251.184 \pm 7231938 2.195.000 (200–30.000.000)	5.856.197 \pm 11.300.000 1.800.000 (1.289–51.104.000)	0.802

Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, i kao medijana (minimum–maksimum).



Grafikon 7. Nivo viremije u odnosu na stadijum fibroze

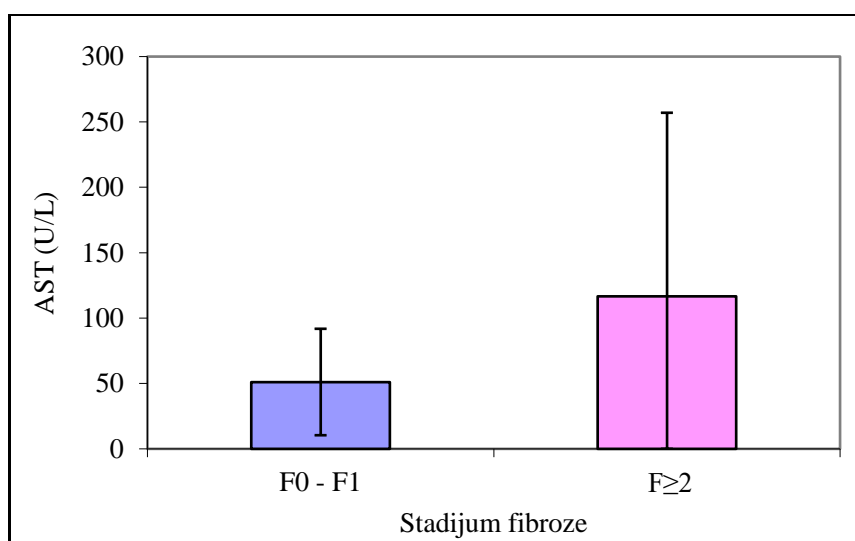
Prosečna vrednost AST-a kod pacijenata sa stadijumom F0-F1 iznosila je 51.12 ± 40.70 U/L, medijana 44, a vrednosti su se kretale od 11 do 250 U/L. Kod pacijenata sa stadijumom fibroze $\geq F2$ prosečna vrednost AST-a iznosila je 116.63 ± 140.39 U/L, medijana 90, a vrednosti su se kretale od 22 do 878 U/L. *Mann-Whitney* test je pokazao da su prosečne vrednosti AST-a kod pacijenata sa stadijumom fibroze $\geq F2$ bile značajno više nego kod pacijenata sa stadijumom F0-F1 ($p < 0.001$).

Prosečna vrednost ALT-a je kod pacijenata sa stadijumom F0-F1 iznosila 69.02 ± 53.39 U/L, medijana 59.50, a vrednosti su se kretale od 11 do 301 U/L. Kod pacijenata sa fibrozom stadijuma $\geq F2$ prosečna vrednost ALT-a iznosila je 122 ± 158.106 U/L, medijana 90, a vrednosti su se kretale od 5 do 950 U/L. *Mann-Whitney* test je pokazao da je prosečna vrednost ALT-a kod pacijenata sa fibrozom stadijuma $\geq F2$ bila značajno viša nego kod pacijenata sa stadijuma F0-F1 ($p = 0.007$) (tabela 8, grafikoni 8 i 9).

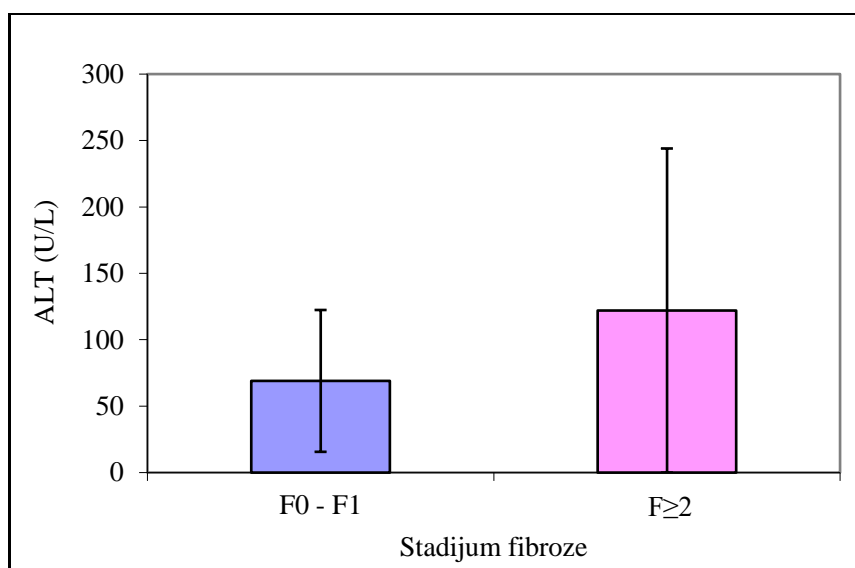
Tabela 8. Vrednosti AST-a i ALT-a (U/L) u odnosu na stadijum fibroze

	F0-F1 (n=52)	$\geq F2$ (n=35)	p
AST	51.12 ± 40.70 44.00 (11.00–250.00)	116.63 ± 140.39 90.00 (22.00–878.00)	<0.001
ALT	69.02 ± 53.39 59.50 (11.00–301.00)	122 ± 158.106 90.00 (5.00–950.00)	0.007

Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, i kao medijana (minimum–maksimum).



Grafikon 8. Vrednosti AST-a u odnosu na stadijum fibroze



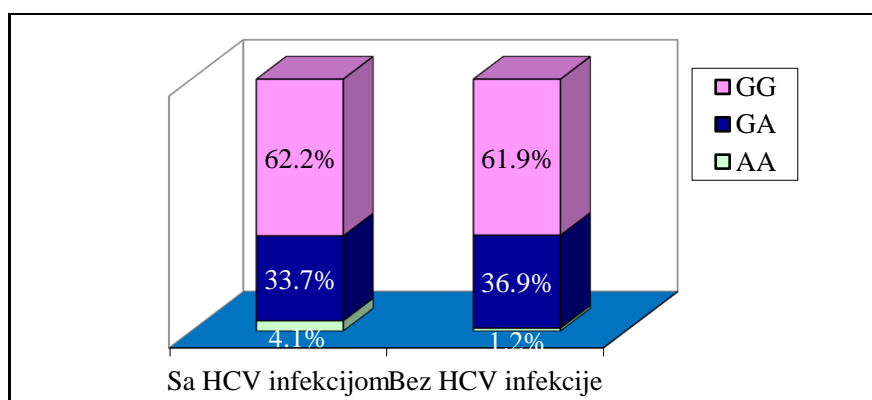
Grafikon 9. Vrednosti ALT-a u odnosu na stadijum fibroze

U grupi od 98 pacijenta sa HCV infekcijom, AA genotip TNF alfa-308 bio je zastupljen kod 4 (4.1%) ispitanika, GA kod 33 (33.7%), a GG genotip kod 61 (62.2%) pacijenta. Kod 168 ispitanika kontrolne grupe, AA genotip bio je zastupljen kod 2 (1.2%) osobe, GA kod 62 (36.9%), a GG genotip kod 104 (61.9%) ispitanika. Hi kvadrat test je pokazao da ne postoje značajne razlike u distribuciji TNF alfa-308 genotipova u ispitivanoj i kontrolnoj grupi (tabela 9, grafikon 10).

Tabela 9. Distribucija TNF α -308 genotipova u ispitivanoj i kontrolnoj grupi

Genotip TNF α -308	Sa HCV infekcijom (n=98)	Bez HCV infekcije (n=168)	p
AA	4 (4.1%)	2 (1.2%)	0.126
GA	33 (33.7%)	62 (36.9%)	0.596
GG	61 (62.2%)	104 (61.9%)	0.956

Napomena: Vrednosti su prikazane kao učestalost (procenat)



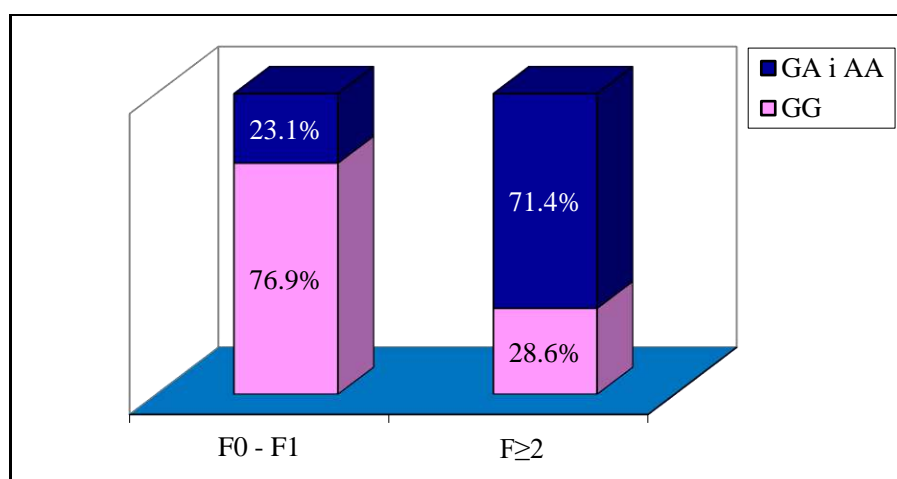
Grafikon 10. Distribucija TNF α -308 genotipova

U grupi od 52 pacijenta sa stadijuma F0-F1, TNF alfa-308 GG genotip bio je zastupljen kod 40 (76.9%), a GA i AA genotipovi kod 12 (23.1%) pacijenata. Kod 35 ispitanika sa fibrozom stadijuma \geq F2, genotip GG otkriven je kod 10 (28.6%), a GA i AA genotipovi kod 25 (71.4%) pacijenata. Hi kvadrat test je pokazao da postoje značajne razlike u distribuciji TNF alfa-308 genotipova kod pacijenata sa različitim stadijumima fibroze ($p < 0.001$) (tabela 10, grafikon 11).

Tabela 10. Distribucija TNF α -308 genotipova u odnosu na stadijum fibroze

Genotip TNF α -308	F0-F1 (n=52)	\geq F2 (n=35)	p
GG	40 (76.9%)	10 (28.6%)	<0.001
GA i AA	12 (23.1%)	25 (71.4%)	

Napomena: Vrednosti su prikazane kao učestalost (procenat)



Grafikon 11. Distribucija TNF α -308 genotipova u odnosu na stadijum fibroze

Prosečna vrednost AST-a kod pacijenata sa GA i AA genotipovima iznosila je 113.59 ± 139.44 U/L, medijana 82, a vrednosti su se kretale od 16 do 878 U/L. U grupi pacijenata sa GG genotipom, prosečna vrednost AST-a iznosila je 58.08 ± 41.33 U/L, medijana 49, a vrednosti su se kretale od 11 do 220 U/L. *Mann-Whitney* test je pokazao da je prosečna vrednost AST-a u grupi pacijenata sa GA i AA genotipovima bila značajno viša ($p < 0.001$).

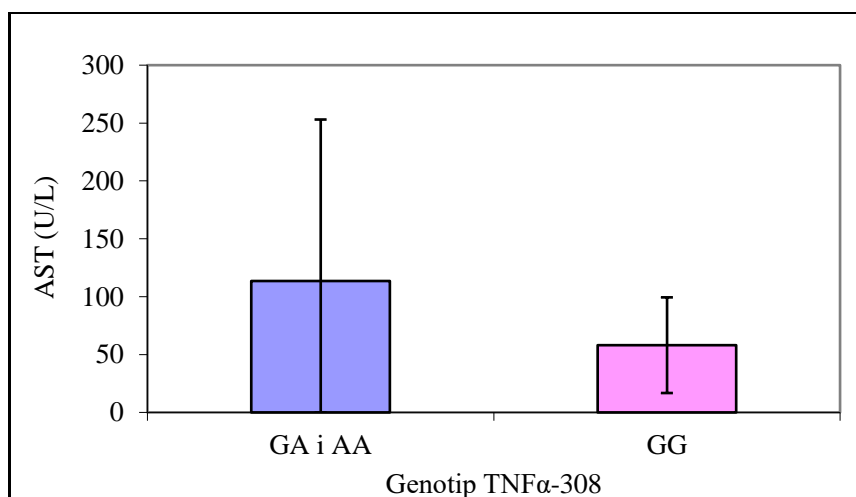
Prosečna vrednost ALT-a kod pacijenata sa GA i AA genotipovima iznosila je 129.43 ± 156.65 U/L, medijana 97, a vrednosti su se kretale od 21 do 950 U/L. U grupi pacijenata sa GG genotipom, prosečna vrednost ALT-a iznosila je 70.02 ± 46.38 U/L, medijana 65, a vrednosti su se kretale od 5 do 250 U/L. *Mann-Whitney* test je pokazao da je prosečna

vrednost ALT-a u grupi pacijenata sa GA i AA genotipovima bila značajno viša ($p=0.005$) (tabela 11, grafikoni 12 i 13).

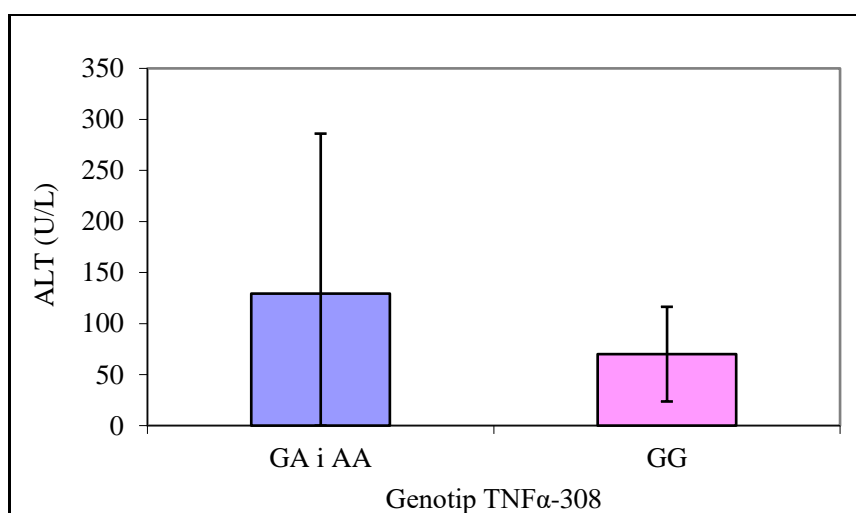
Tabela 11. Vrednosti AST-a i ALT-a (U/L) u odnosu na genotip TNF α -308

	GA/AA (n=37)	GG (n=61)	p
AST	113.59±139.44 82 (16–878)	58.08±41.33 49 (11–220)	<0.001
ALT	129.43±156.65 97 (21–950)	70.02±46.38 65.0 (5–250)	0.005

Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija, i kao medijana (minimum–maksimum).



Grafikon 12. Vrednosti AST-a u odnosu na genotip TNF α -308



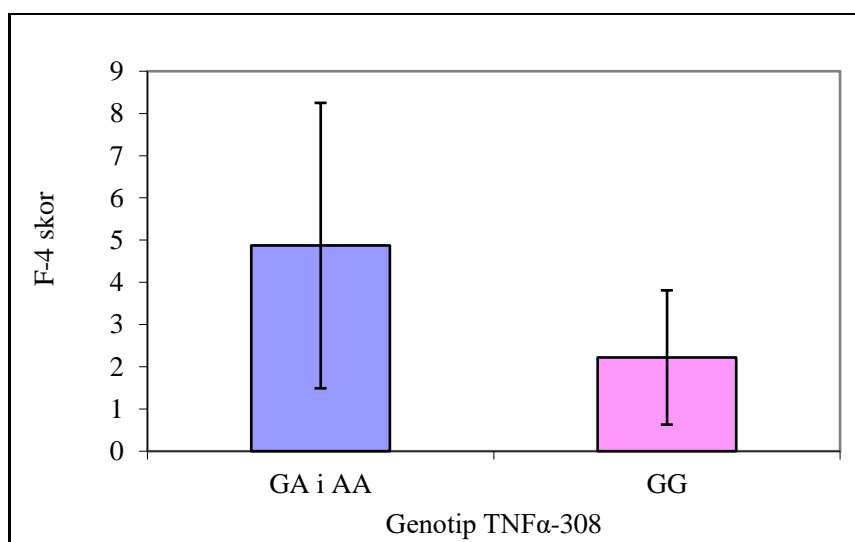
Grafikon 13. Vrednosti ALT-a u odnosu na genotip TNF α -308

Prosečna vrednost FIB-4 skora kod pacijenata sa GA i AA genotipovima iznosila je 4.87 ± 3.38 , medijana 3.90, a vrednosti su se kretale od 0.92 do 18.84. U grupi pacijenata sa GG genotipom, prosečna vrednost FIB-4 skora iznosila je 2.22 ± 1.59 , medijana 1.65, a vrednosti su se kretale od 0.37 do 6.76. *Mann-Whitney* test je pokazao da su razlike u vrednosti FIB-4 skora između dve ispitivane grupe statistički značajne (<0.001) (tabela 12, grafikon 14).

Tabela 12. Vrednosti FIB-4 skora u odnosu na genotip TNF α -308

GA/AA (n=37)	GG (n=50)	p
4.87 ± 3.38	2.22 ± 1.59	<0.001
3.90 (0.92–18.84)	1.65 (0.37–6.76)	

Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, i kao medijana (minimum–maksimum).



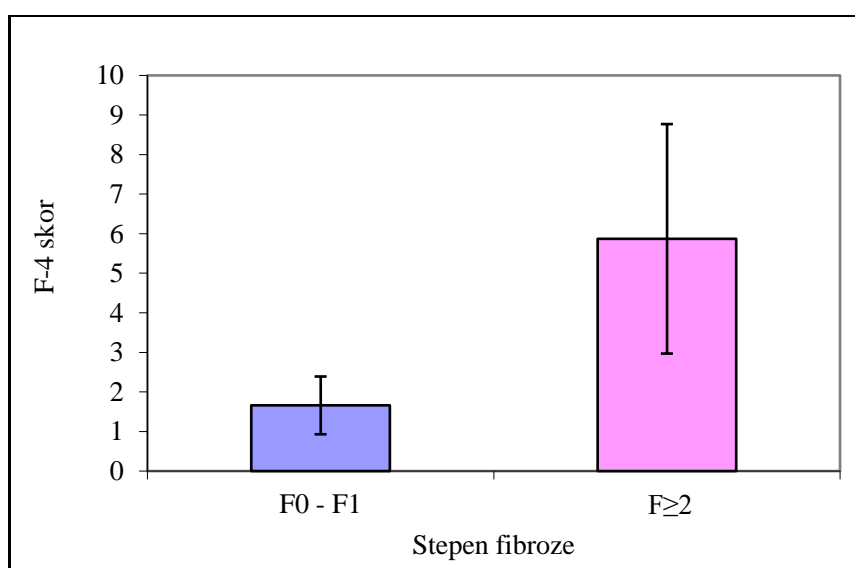
Grafikon 14. Vrednosti FIB-4 skora u odnosu na genotip TNF α -308

Prosečna vrednost FIB-4 skora kod pacijenata sa stadijuma F0-F1 iznosila je 1.66 ± 0.73 , medijana 1.54, a vrednosti su se kretale od 0.37 do 3.21. Kod pacijenata sa fibrozom stadijuma $F \geq 2$, prosečna vrednost FIB-4 skora iznosila je 5.87 ± 2.90 , medijana 5.43, a vrednosti su se kretale od 3.31 do 18.84. *Mann-Whitney* test je pokazao da je prosečna vrednost FIB-4 kod pacijenata sa fibrozom stadijuma $F \geq 2$ bila značajno viša nego kod pacijenata sa stadijumom F0-F1 ($p < 0.001$) (tabela 13, grafikon 15).

Tabela 13. Vrednosti FIB-4 skorau odnosu na stadijum fibroze

F0-F1 (n=52)	F \geq 2 (n=35)	p
1.66 \pm 0.73 1.54 (0.37–3.21)	5.87 \pm 2.90 5.43 (3.31–18.84)	<0.001

Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, i kao medijana (minimum–maksimum).



Grafikon 15. Vrednosti FIB-4 skora u odnosu na stadijum fibroze

Univarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da je povećana verovatnoća za razvoj značajne fibroze povezana sa HCV genotipom 3 (OR=2.526, 95% IP: 1.012 do 6.304, p=0.047), dok je smanjenje verovatnoće za razvoj značajne fibroze povezano sa HCV genotipom 1A (OR=0.374, 95% IP: 0.147 do 0.950, p=0.039) i sa GG genotipom TNF alfa-308 (OR=0.120, 95% IP: 0.045 do 0.319, p<0.001). Ostala ispitivana obeležja nisu pokazala značajnu povezanost sa verovatnoćom za razvoj značajne fibroze.

Multivarijantna logistička regresiona analiza je kao jedini značajni prediktor za razvoj značajne fibroze potvrdila genotip GG TNF alfa-308. Genotip GG je, uz kontrolu uticaja svih drugih obeležja, povezan sa smanjenjem verovatnoće za razvoj značajne fibroze (OR=0.116, 95% IP: 0.038 do 0.356, p<0.001) (tabela 14).

Tabela 14. Povezanost stadijuma fibroze i ispitivanih obeležja, rezultati logističke regresione analize

Obeležje	OR	Granice 95% IP		p
		Donja	Gornja	
Univarijantna analiza				
Ženski pol	2.202	0.847	5.727	0.105
Starost (godine)	1.016	0.979	1.055	0.404
HCV genotip 1a	0.374	0.147	0.950	0.039
HCV genotip 1b	2.654	0.849	8.293	0.093
HCV genotip 3	2.526	1.012	6.304	0.047
HCV RNA (IU/mL)	1.000	0.999	1.001	0.759
Genotip TNF α -308 GG	0.120	0.045	0.319	<0.001
Multivarijantna analiza				
Ženski pol	1.973	0.589	6.611	0.271
Starost (godine)	1.018	0.968	1.070	0.498
HCV genotip 1a	0.912	0.082	10.096	0.940
HCV genotip 1b	3.408	0.270	42.952	0.343
HCV genotip 3	4.390	0.416	46.291	0.218
HCV RNA (IU/mL)	1.000	0.999	1.001	0.937
Genotip TNF α -308 GG	0.116	0.038	0.356	<0.001

Univarijantna linearna regresiona analiza je pokazala da je GG genotip TNF alfa-308 povezan sa smanjenjem vrednosti FIB-4 skora (B=-2.443, 95% IP: -3.429 do -1.457, p<0.001). Ostala ispitivana obeležja nisu pokazala značajnu povezanost sa vrednostima FIB-4 skora.

Multivarijantna linearna regresiona analiza je kao značajne prediktore vrednosti FIB-4 skora potvrdila starost pacijenata i GG genotip TNF alfa-308. Uz kontrolu uticaja svih drugih obeležja, starost pacijenata je povezana sa povećanjem vrednosti FIB-4 skora (B=0.051, 95% IP: 0.007 do 0.095, p=0.025), dok je GG genotip povezan sa smanjenjem vrednosti FIB-4 skora (B=-2.248, 95% IP: -3.360 do -1.327, p<0.001) (tabela 15).

Tabela 15. Povezanost FIB-4 skora i ispitivanih obeležja, rezultati linearne regresione analize

Obeležje	B	Granice 95% IP		p
		Donja	Gornja	
Univarijantna analiza				
Ženski pol	0.660	-0.516	1.837	0.268
Starost (godine)	0.047	0.000	0.093	0.052
HCV genotip 1a	-0.850	-1.935	0.234	0.123
HCV genotip 1b	0.716	-0.658	2.090	0.303
HCV genotip 3	1.004	-0.128	2.136	0.082
HCV RNA (IU/mL)	0.001	-0.001	0.001	0.591
Genotip TNF α -308 GG	-2.443	-3.429	-1.457	<0.001
Multivarijantna analiza				
Ženski pol	0.346	-0.750	1.443	0.532
Starost (godine)	0.051	0.007	0.095	0.025
HCV genotip 1a	-0.433	-2.087	1.221	0.604
HCV genotip 1b	0.157	-1.716	2.029	0.868
HCV genotip 3	0.826	-0.914	2.566	0.348
HCV RNA (IU/mL)	0.001	-0.001	0.001	0.959
Genotip TNF α -308 GG	-2.348	-3.360	-1.337	<0.001

Univarijantna linearna regresiona analiza je pokazala da je HCV genotip 3 povezan sa povećanjem vrednosti AST-a (B=60.930, 95% IP: 23.828 do 102.032, p=0.002), dok su sa smanjenjem vrednosti AST-a povezani HCV genotip 1a (B=-64.368, 95% IP: -101.393 do -27.344, p=0.001) i GG genotip TNF alfa-308. (B=-55.513, 95% IP: -93.329 do -17.696, p=0.004). Ostala ispitivana obeležja nisu pokazala značajnu povezanost sa vrednostima AST-a.

Multivarijantna linearna regresiona analiza je kao jedini značajni prediktor vrednosti AST-a potvrdila GG genotip TNF alfa-308. Uz kontrolu uticaja svih drugih obeležja, GG genotip TNF alfa-308 je povezan sa smanjenjem vrednosti AST-a (B=-53.821, 95% IP: -91.318 do -16.324, p=0.005) (tabela 16).

Tabela 16. Povezanost vrednosti AST-a i ispitivanih obeležja, rezultati linearne regresione analize

Obeležje	B	Granice 95% IP		p
		Donja	Gornja	
Univarijantna analiza				
Ženski pol	-10.507	-52.791	31.777	0.623
Starost (godine)	-0.885	-2.586	0.816	0.305
HCV genotip 1a	-64.368	-101.393	-27.344	0.001
HCV genotip 1b	21.796	-27.400	70.992	0.381
HCV genotip 3	62.930	23.828	102.032	0.002
HCV RNA (IU/mL)	0.001	-0.001	0.001	0.911
Genotip TNF α -308 GG	-55.513	-93.329	-17.696	0.004
Multivarijantna analiza				
Ženski pol	-19.858	-60.502	20.785	0.334
Starost (godine)	-0.562	-2.198	1.075	0.497
HCV genotip 1a	-47.759	-109.084	13.566	0.125
HCV genotip 1b	15.862	-53.544	85.268	0.651
HCV genotip 3	33.737	-30.767	98.241	0.302
HCV RNA (IU/mL)	0.000	0.000	0.000	0.470
Genotip TNF α -308 GG	-53.821	-91.318	-16.324	0.005

Univarijantna linearna regresiona analiza je pokazala da je HCV genotip 3 povezan sa povećanjem vrednosti ALT-a (B=60.870, 95% IP: 16.530 do 105.211, p=0.008), dok su sa smanjenjem vrednosti ALT-a povezani HCV genotip 1a (B=-73.675, 95% IP: -114.988 do -32.361, p=0.001) i GG genotip TNF alfa-308. (B=-59.416, 95% IP: -101.894 do -16.938, p=0.007). Ostala ispitivana obeležja nisu pokazala značajnu povezanost sa vrednostima ALT-a.

Multivarijantna linearna regresiona analiza je kao jedini značajni prediktor vrednosti ALT-a potvrdila GG genotip TNF alfa-308. Uz kontrolu uticaja svih drugih obeležja, GG genotip TNF alfa-308 je povezan sa smanjenjem vrednosti ALT-a (B=-57.800, 95% IP: -99.983 do -15.617, p=0.008) (tabela 17).

Tabela 17. Povezanost vrednosti ALT-a i ispitivanih obeležja, rezultati linearne regresione analize

Obeležje	B	Granice 95% IP		p
		Donja	Gornja	
Univarijantna analiza				
Ženski pol	-12.379	-59.690	34.933	0.605
Starost (godine)	-0.711	-2.619	1.198	0.461
HCV genotip 1a	-73.675	-114.988	-32.361	0.001
HCV genotip 1b	41.236	-13.403	95.875	0.137
HCV genotip 3	60.870	16.530	105.211	0.008
HCV RNA (IU/mL)	0.000	0.000	0.000	0.830
Genotip TNF α -308 GG	-59.416	-101.894	-16.938	0.007
Multivarijantna analiza				
Ženski pol	-27.409	-73.132	18.314	0.237
Starost (godine)	-0.530	-2.371	1.311	0.569
HCV genotip 1a	-54.024	-123.013	14.966	0.123
HCV genotip 1b	33.638	-44.442	111.719	0.394
HCV genotip 3	30.257	-42.309	102.822	0.410
HCV RNA (IU/mL)	0.000	0.000	0.000	0.648
Genotip TNF α -308 GG	-57.800	-99.983	-15.617	0.008

Nivo TBARS-a kod pacijenata sa HCV infekcijom bio je značajno viši nego u kontrolnoj grupi (6.99 ± 4.02 ; 4.38 ± 1.38 $\mu\text{mol/LMDA}$; *Mann-Whitney* test: $p < 0.001$).

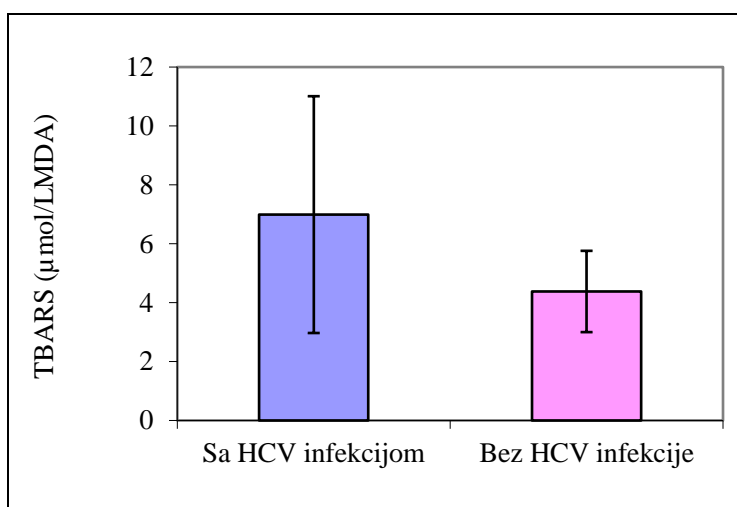
Nivo AOPP-a bio je značajno viši kod pacijenata sa HCV infekcijom nego u kontrolnoj grupi (122.40 ± 43.12 ; 97.92 ± 30.90 $\mu\text{mol/L}$ chloramine T; *Mann-Whitney* test: $p = 0.001$).

Nivo katalaze kod pacijenata sa HCV infekcijom iznosio je 183.41 ± 134.08 Kat/L i bio je značajno niži nego u kontrolnoj grupi, gde je iznosio 260.60 ± 132.04 Kat/L (*Mann-Whitney* test: $p = 0.007$) (tabela 18, grafikoni 16, 17, 18).

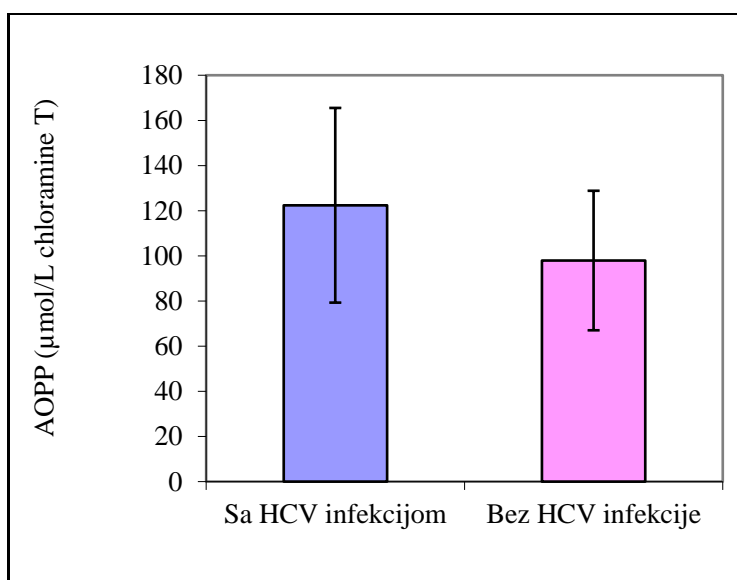
Tabela 18. Vrednosti parametara oksidativnog stresa (TBARS, AOPP) i aktivnosti katalaze u ispitivanoj i kontrolnoj grupi

Parametri	Sa HCV infekcijom (n=52)	Bez HCV infekcije (n=50)	p
TBARS ($\mu\text{mol/LMDA}$)	6.99 \pm 4.02	4.38 \pm 1.38	<0.001
AOPP ($\mu\text{mol/L chloramine T}$)	122.40 \pm 43.12	97.92 \pm 30.90	0.001
Katalaza (Kat/L)	183.41 \pm 134.08	260.60 \pm 132.04	0.007

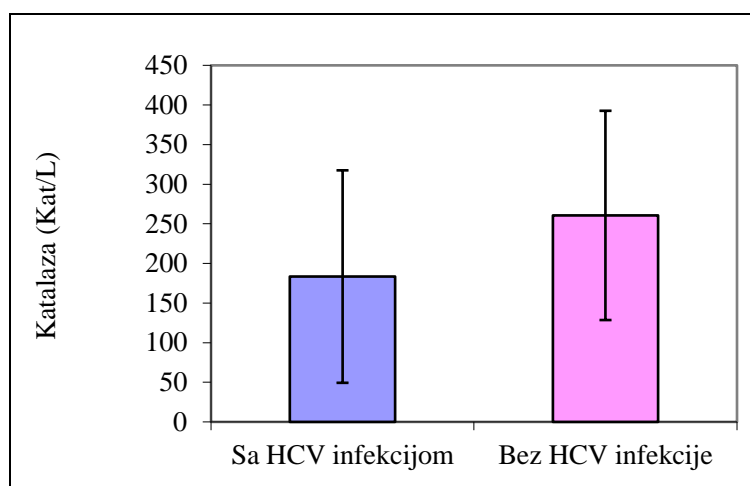
Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.



Grafikon 16. Vrednosti TBARS-a



Grafikon 17. Vrednosti AOPP-a



Grafikon 18. Vrednosti katalaze

Nivo TBARS-a bio je najviši kod pacijenata sa HCV 1b genotipom (7.45 ± 5.86 $\mu\text{mol/LMDA}$), a najniži kod pacijenata sa 1a i 3 genotipom (6.73 ± 3.11 i 6.73 ± 3.15 $\mu\text{mol/LMDA}$). Neparametrijska analiza varijanse pokazala je da razlike između ovih vrednosti nisu statistički značajne ($p=0.981$).

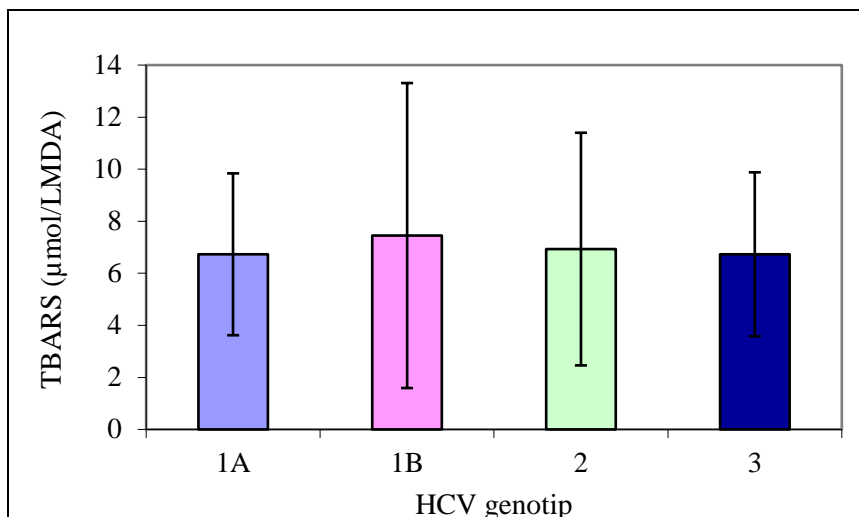
Nivo AOPP-a kretao se od 117.27 ± 33.84 $\mu\text{mol/L chloramine T}$ kod pacijenata sa genotipom 1a, do 125.87 ± 50.98 $\mu\text{mol/L chloramine T}$ kod pacijenata sa genotipom 3, ali neparametrijska analiza varijanse je pokazala da razlike u vrednostima nivoa AOPP-a kod pacijenata inficiranih različitim genotipovima virusa nisu statistički značajne ($p=0.955$).

Nivo katalaze kretao se od 172.17 ± 149.34 Kat/L kod pacijenata sa genotipom 1a, do 192.00 ± 180.68 Kat/L kod pacijenata sa genotipom 2. Neparametrijska analiza varijanse je pokazala da razlike u vrednostima katalaze kod pacijenata inficiranih različitim genotipovima HCV-a nisu statistički značajne ($p=0.936$) (tabela 19, grafikoni 19, 20, 21).

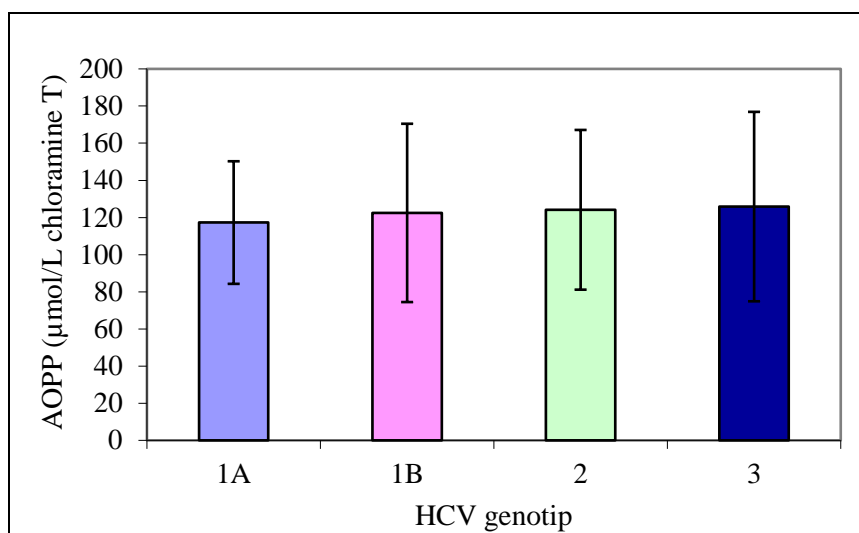
Tabela 19. Vrednosti parametara oksidativnog stresa (TBARS, AOPP) i aktivnosti katalaze u odnosu na HCV genotip

Genotip	TBARS ($\mu\text{mol/LMDA}$)	AOPP ($\mu\text{mol/L chloramine T}$)	Katalaza (Kat/L)
1a	6.73 ± 3.11	117.27 ± 33.84	172.17 ± 149.34
1b	7.45 ± 5.86	122.46 ± 48.53	190.92 ± 137.66
2	6.93 ± 4.47	124.14 ± 43.41	192.00 ± 180.68
3	6.73 ± 3.15	125.87 ± 50.98	182.38 ± 125.25
Poređenje	ANOVA: $p=0.981$	ANOVA: $p=0.955$	ANOVA: $p=0.936$

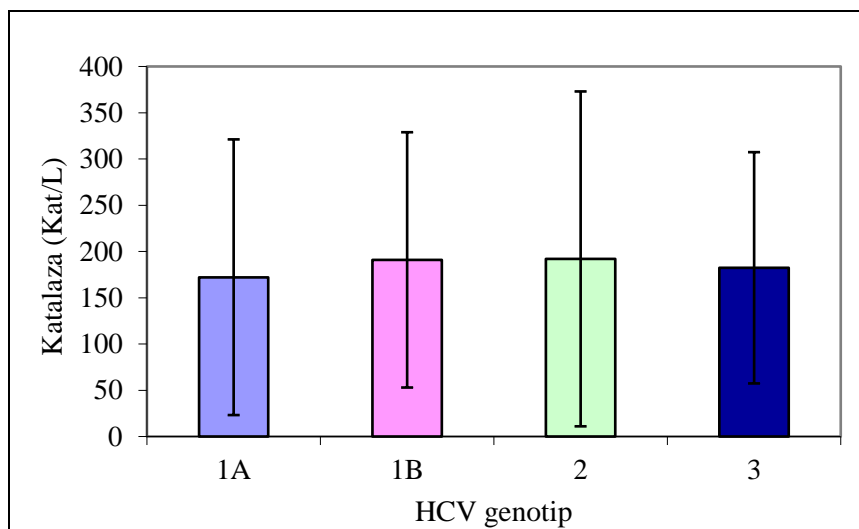
Napomena: Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.



Grafikon 19. Vrednosti TBARS-a u odnosu na HCV genotip



Grafikon 20. Vrednosti AOPP-a u odnosu na HCV genotip



Grafikon 21. Vrednosti katalaze u odnosu na HCV genotip

Statistički značajna pozitivna korelacija potvrđena je između nivoa viremije (broja IU/mL HCV RNK) i nivoa AOPP-a (Pirsonov koeficijent korelacije $r=0.344$ i $p=0.012$). Pozitivna korelacija potvrđena je i između nivoa viremije i nivoa TBARS-a, ali nije statistički značajna ($r=0.251$ i $p=0.072$) (tabela 20).

Tabela 20. Korelacija nivoa viremije, parametara oksidativnog stresa i aktivnosti katalaze

		TBARS	AOPP	Katalaza
Viremija	r	0.251	0.344	0.020
	p	0.072	0.012	0.897
TBARS	r		0.098	0.189
	p		0.489	0.209
AOPP	r			0.101
	p			0.504

11. DISKUSIJA

HCV infekcija predstavlja ozbiljan zdravstveni problem zbog toga što, nakon akutne infekcije, kod 70% bolesnika virus uspostavlja perzistentnu infekciju. Perzistentna HCV infekcija klinički se manifestuje hroničnim oboljenjem jetre, koje često ima progresivni tok, od hroničnog hepatitisa, preko ciroze jetre, do primarnog hepatocelularnog karcinoma.

Ispitivanje povezanosti faktora koji potiču od virusa (genotip/suptip i viremija) i genetskih faktora domaćina (polimorfizam TNF alfa-308) sa kliničkim manifestacijama hronične HCV infekcije je od velikog značaja zbog boljeg razumevanja njihove uloge u patogenezi hroničnog oboljenja jetre i njihovog značaja u praćenju progresije bolesti kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom.

Ovo istraživanje obuhvatilo je 98 pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom starosti od 24 do 81 godine (prosečne starosti 53.22 ± 11.24). U ispitivanoj grupi bilo je 70 (71.4%) muškaraca i 28 (28.6%) žena. Genotipizacijom virusa, kod 38 (38.8%) pacijenata dijagnostikovano je HCV genotip 1a, kod 31 (31.6%) genotip 3, a kod 18 (18.4%) pacijenata genotip 1b. Učestalost ostalih genotipova virusa bila je niska: genotip 2 otkriven je kod 3.1%, a genotip 4 kod 1.0% pacijenta. Mešovita infekcija dijagnostikovana je kod 7 (7.1%) pacijenata, najčešće izazvana 1b/4, a zatim 1a/1b, 1a/3 i 3/4 genotipovima. U ovom istraživanju genotip 1 bio je najzastupljeniji (kod 50% pacijenata), sa dominacijom suptipa 1a, a zatim genotip 3.

Genotip 1 je najzastupljeniji genotip u većini evropskih zemalja, sa učestalošću od: 58% u Belgiji, 45.3% u Danskoj, 45% u Engleskoj, 62.5% u Nemačkoj, 45.1% u Grčkoj, 59.3% u Italiji, 79.4% u Poljskoj, 99.8% u Rumuniji i 54% u Švajcarskoj. Genotip 3 je drugi najčešći genotip virusa u svim navedenim Evropskim zemljama osim u Italiji i Rumuniji, a učestalost ovog genotipa kreće se od 19–43.8% (162).

Pitanje koje se često nameće u dostupnoj literaturi odnosi se na korelaciju genotipa virusa i nivoa viremije kod pacijenata sa HCV infekcijom. Rezultati dosadašnjih istraživanja su kontradiktorni. Rezultati pojedinih istraživanja ukazuju na to da postoji značajna korelacija visokog nivoa viremije i genotipa 1 (163, 164), posebno suptipa 1b (165). Takođe, evidentirana je pozitivna korelacija visokog nivoa viremije i genotipa 3. Rezultati *Shuliat'ev* i saradnika govore o višem nivou viremije kod bolesnika sa genotipom 3, nego kod onih sa genotipom 1 i 2 (166). *Ahmad* i saradnici evidentirali su značajno viši nivo viremije kod bolesnika inficiranih

genotipovima 2 i 4 (167). Nasuprot tome, rezultati drugih istraživanja sugerišu da nema značajne razlike u nivou viremije u odnosu na najčešće HCV genotipove (168).

U našem istraživanju najviši nivo viremije (broj IU/ml HCV RNK) otkriven je kod bolesnika sa genotipom 3. Međutim, nije otkrivena statistički značajna razlika u nivou viremije kod bolesnika inficiranih različitim HCV genotipovima/suptipovima.

Rezultati, objavljeni u dostupnoj literaturi, o korelaciji HCV genotipa/suptipa i vrednosti ALT-a i AST-a, kao markera citolize hepatocita, takođe su kontradiktorni. Delić i saradnici su otkrili značajno više vrednosti ALT-a kod bolesnika inficiranih genotipom 1b u odnosu na ispitanike inficirane ostalim genotipovima, ali ne i značajno više vrednosti AST-a (165). I prema rezultatima *Lee YS* i saradnika, genotip 1 b bio je dominantan kod bolesnika sa povišenim vrednostima ALT-a (169). U istraživanju *Lee CM* i saradnika vrednosti ALT-a bile su značajno više kod bolesnika sa genotipom 2 nego kod onih inficiranih genotipom 1 (168). Slične rezultate objavili su *Ahmad* i saradnici, koji ukazuju na to da su vrednosti ALT-a značajno bile više kod bolesnika sa genotipovima 2b i 4a u odnosu na bolesnike koji su imali genotip 1a, 3a, 3b, 4b i mešovitu infekciju (167). *Payan* i saradnici, ispitujući korelaciju nivoa ALT-a i različitih HCV genotipova, otkrili su značajnu više vrednosti ALT-a kod pacijenata inficiranih genotipom 3 (170). Nasuprot tome, *Berger* i saradnici nisu otkrili statistički značajnu korelaciju između vrednosti ALT-a i HCV genotipova (171). *Moatter* i saradnici, komparativnom analizom vrednosti ALT-a kod bolesnika sa genotipom 1 i onih sa genotipom 3, kao najčešćim genotipovima, nisu našli statistički značajnu razliku u vrednostima ALT-a (172).

U ovom istraživanju, analizom prosečne vrednosti AST-a i ALT-a kod bolesnika inficiranih različitim genotipovima, dobijeni su sledeći rezultati: vrednosti AST-a bile su statistički značajno više u grupama pacijenata inficiranih genotipovima 1b i 3 u odnosu na pacijente inficirane genotipom 1a (*Mann-Whitney test*: $p < 0.001$) i pacijenate inficirane ostalim genotipovima (*Mann-Whitney test*: $p = 0.021$ i $p = 0.047$).

Takođe, prosečne vrednosti ALT-a bile su statistički značajno više u grupama pacijenata inficiranih genotipovima 1b i 3 u odnosu na one inficirane genotipom 1a (*Mann-Whitney test*: $p < 0.001$) i ostalim genotipovima (*Mann-Whitney test*: $p = 0.011$ i $p = 0.038$).

Na osnovu FIB-4 skora, 87 pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom podeljeno je u dve grupe: 35 (40.2%) pacijenata sa fibrozom stadijuma $\geq F2$ i 52 (59.8%) pacijenta sa stadijumom F0-F1.

Distribucija genotipova/suptipova, nivo viremije, vrednosti transaminaza i distribucija TNF alfa-308 genotipova komparativno su analizirani u grupi pacijenata sa fibrozom stadijuma $\geq F2$ i grupi pacijenata sa stadijumom F0-F1.

Kakav je uticaj HCV genotipova na stepen patohistoloških promena u jetri i progresiju hroničnog oboljenja jetre. Zabeležena je viša učestalost razvoja hronične infekcije kod bolesnika inficiranih genotipom 1b nego kod onih sa non-1b genotipom. Zbog toga se smatra da je genotip 1b značajan nezavisni prediktor za razvoj hroničnog hepatitisa (173). Rezultati pojedinih istraživanja govore o povezanosti genotipa 1, posebno 1b, sa višim stepenom oštećenja jetre, višom viremijom i slabijim odgovorom na terapiju. Rezultati istraživanja *Payan* i saradnika ukazuju na to da su genotipovi 1a i 2 udruženi sa blagim hepatitisom, 1b sa težim oblikom hepatitisa, a genotip 3 sa cirozom. Cirroza jetre bila je zastupljenija kod bolesnika sa genotipom 1b i 3 u odnosu na one sa infekcijom izazvanom genotipovima 1a, 2 i 4 (170). Slične rezultate objavili su i drugi autori, a oni govore o tome da je genotip 1b mnogo agresivniji i češće je povezan sa razvojem ciroze i HCC-a, a tip 3 sa steatozom i fibrozom (174, 175). Rezultati META analize 16 studija sugerišu da je genotip 3 povezan sa ubrzanim razvojem fibroze (176).

Nasuprot tome, u dostupnoj literaturi objavljeni su i rezultati koji ukazuju na to da genotip virusa nema uticaja na stepen oštećenja jetre i progresiju hroničnog oboljenja jetre (177). *Lee YS* i saradnici iznose podatke da genotip virusa ne korelira sa HAI skorom, niti sa citolizom hepatocita (ALT) (169). Smatra se da je najznačajniji klinički aspect HCV genotipova odgovor na terapiju, odnosno da HCV genotip može biti prediktor odgovora na antivirusnu terapiju (9, 170).

U ovom istraživanju, u grupi bolesnika sa fibrozom stadijuma \geq F2 najzastupljeniji je bio genotip 3 (kod 45.7% bolesnika), zatim genotip 1a (kod 25.7%) i 1b (kod 25.7%). Zastupljenost genotipa 3 bila je statistički značajno viša kod pacijenata sa fibrozom stadijuma \geq F2 ($p=0.044$), a genotipa 1a kod bolesnika sa stadijuma F0-F1 ($p=0.036$). Nije otkrivena značajna razlika u prevalenci ostalih genotipova između ove dve grupe bolesnika.

Međutim, analizirajući zastupljenost fibroze stadijuma \geq F2 u grupama bolesnika sa infekcijom izazvanom pojedinačnim HCV genotipovima/suptipovima, evidentirana je statistički značajno viša zastupljenost ovog stadijuma fibroze u grupi bolesnika sa 1b i 3 genotipom u odnosu na grupe bolesnika inficiranih drugim genotipovima (1a vs 1b: $p=0.025$; 1a vs 3: $p=0.020$; 1b vs ostali: $p=0.019$; 3 vs ostali: $p=0.020$).

Naši rezultati, koji ukazuju na značajnu povezanost genotipa 3 sa značajnom fibrozom u saglasnosti su sa rezultatima META analize koju su sproveli *Probst* i saradnici (176), kao i *Ripoli* i *Pazienza* (174), koji takođe ukazuju na povezanost genotipa 3 i uznapredovale fibroze. Takođe, naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima *Payan* i saradnika sa aspekta povezanosti genotipova 1b i 3 sa višim stepenom oštećenja jetre (170).

Uticaj viremije na stepen patoloških promena u jetri kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom takođe je bio predmet interesovanja brojnih autora. U studijama u kojima je analizirana uloga viremije u razvoju pojedinih oblika hroničnog oboljenja jetre, nivo viremije posmatran je u odnosu na vrednosti ALT-a ili rezultate biopsije jetre. U pojedinim istraživanjima otkrivena je povezanost nivoa viremije i visokih vrednosti transaminaza (9).

Međutim, većina autora govori o tome da viremija nema uticaja na stepen oštećenja jetre (169, 172, 177). *Fanning* i saradnici su otkrili korelaciju nivoa viremije i stepena inflamacije, ali ne i korelaciju sa stepenom fibroze kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom (178). Pored toga, rezultati nekoliko dugotrajnih istraživanja, u kojima je analizirana uloga viremije u progresiji fibroze, sugerišu da viremija nema uticaj na progresiju fibroze (9).

U ovom istraživanju razlike u nivou viremije između grupa bolesnika sa različitim stadijumom fibroze nisu bile statistički značajne ($p=0.802$). Rezultati ovog istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima većine autora objavljenih u dostupnoj literaturi. Ovaj rezultat ide u prilog tezi da je u osnovi patogeneze HCV infekcije ćelijski imunski odgovor, a ne citopageni efekat virusa.

Serumska alanin aminotransferaza je dobar indikator oštećenja hepatocita. Međutim, oko trećine pacijenata sa hroničnim hepatitisom ima normalne vrednosti ALT-a. Pacijenti sa normalnim vrednostima ALT-a najčešće imaju blagu fibrozu. Rezultati koji potiču iz 23 studije, kojima je obuhvaćeno 1100 pacijenata, ukazuje na to da 80% pacijenata sa normalnim vrednostima transaminaza ima blagu fibrozu, a 20% uznapredovalu fibrozu. Pored toga, progresija fibroze se znatno ređe javlja kod bolesnika sa normalnim vrednostima ALT-a nego kod onih sa povišenim vrednostima, čak i sa blago povišenim. U brojnim studijama gde su rađene dve biopsije, dokazano je da je prva vrednost ALT-a bila prediktor progresije fibroze (9). Međutim, odnos AST-ALT je bolji prediktor kliničkog ishoda bolesti (179). U multivarijantnoj analizi rezultata *Payan* i saradnika, godine bolesnika i ALT izdvojeni su kao prediktori ciroze (170). *Lee YS* i saradnici otkrili su korelaciju ALT-a sa stepenom *piecemeal* nekroze i potralnom inflamacijom (169). *Shahid* i saradnici otkrili su korelaciju AST-a i ALT-a sa stadijumom fibroze kod genotipa 3a i smatraju da transaminaze koreliraju sa stepenom oštećenja jetre (180).

Bouzgarrou i saradnici otkrili su značajno višu prosečnu vrednost AST-a kod bolesnika sa F3-F4 stadijumom fibroze nego kod onih sa fibrozom stadijuma F1-F2. Međutim, prosečna vrednost ALT-a kod bolesnika ove dve grupe nije bila statistički značajna. Povezanost samo AST-a sa odmaklom cirozom autori objašnjavaju oštećenjem sinusoidalnih ćelija u odmakloj fazi ciroze (181).

U ovom istraživanju normalne vrednosti ALT-a otkrivene su kod 34.61% bolesnika sa stadijumom F0-F1, a kod 20% sa stadijumom fibroze \geq F2. Normalne vrednosti AST-a otkrivene su kod 46% bolesnika sa stadijumom F0-F1, a kod 14.28% sa stadijumom fibroze \geq F2.

Međutim, prosečna vrednost AST-a bila je značajno viša u grupi bolesnika sa stadijumom fibroze \geq F2 nego u grupi bolesnika sa stadijumom F0-F1 ($p < 0.001$). Takođe, prosečna vrednost ALT-a bila je značajno viša u grupi bolesnika sa stadijumom fibroze \geq F2 nego u grupi bolesnika sa stadijumom F0-F1 ($p = 0.007$). Naši rezultati, koji ukazuju na značajnu korelaciju vrednosti transaminaza sa stepenom fibroze, u saglasnosti su sa rezultatima većine autora objavljenih u literaturi (9).

S druge strane, kako su vrednosti transaminaza bile značajno više kod bolesnika inficiranih genotipom 1b i 3, ovaj rezultat ide u prilog tezi da genotipovi 1b i 3 povećavaju rizik za razvoj značajne fibroze, na šta ukazuju i naši rezultati o povezanosti transaminaza sa fibrozom i značajno višoj zastupljenosti fibroze kod bolesnika inficiranih ovim genotipovima.

Novija istraživanja posvećena su uticaju genetskih faktora na klinički tok HCV infekcije i progresiju hroničnog oboljenja jetre. Citokini su imunoregulatorni proteini koji, kao proinflatorni ili antiinflatorni, učestvuju u regulaciji inflamatornog odgovora domaćina. Disbalans u produkciji proinflatornih i antiinflatornih citokina ima ulogu u patogenezi i kliničkim manifestacijama infektivnih bolesti.

TNF alfa je potentan citokin sa brojnim proinflatornim aktivnostima (117). Ekspresija TNF alfa gena može biti izmenjena polimorfizmom (*single-nucleotide polymorphisms – SNP*) u regulatornim sekvencama gena koji kodira sintezu ovog citokina. Divlji genotip TNF alfa na poziciji -308 promotornog regiona je GG. Supstitucijom gvanina adeninom nastaju GA i AA genotipovi, koji su mutantne forme. Uloga polimorfizama TNF α -308 u patogenezi HCV infekcije još uvek nije u potpunosti razjašnjena.

Istraživanja distribucije TNF alfa-308 genotipova kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom i zdravih osoba kao kontrolne grupe, dala su različite rezultate. U istraživanju *Jeng* i saradnika pronađena je značajno viša zastupljenost genotipova sa alelom A u grupi bolesnika sa cirozom jetre i hepatocelularnim karcinomom nego u kontrolnoj grupi (182). *Bader* i saradnici objavili su slične rezultate. U njihovom istraživanju A alel bio je značajno zastupljeniji kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom nego u kontrolnoj grupi, a genotip GG u kontrolnoj grupi (183). Nasuprot tome, većina autora u dostupnoj literaturi iznosi podatke da nema statistički značajne razlike u distribuciji TNF alfa-308 genotipova između grupe bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom i kontrolne grupe (117, 120, 181, 184).

U ovom istraživanju analizirana je distribucija TNF alfa-308 genotipova kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom u odnosu na kontrolnu grupu, koju su činile zdrave osobe. Genotip GG bio je dominantan u obe grupe (kod 62.2% bolesnika i 61.9% zdravih osoba). Genotip GA otkriven je kod 33.7% bolesnika i 36.9% ispitanika kontrolne grupe, dok je genotip AA bio prisutan u svega 4.1% bolesnika i 1.2% osoba kontrolne grupe. Nije otkrivena statistički značajna razlika u distribuciju TNF alfa-308 genotipova u ispitivanoj i kontrolnoj grupi.

Da li TNF alfa-308 genotip ima uticaj na progresiju hroničnog oboljena jetre izazvanog hroničnom HCV infekcijom. Rezultati istraživača koji su se bavili ovim pitanjem su kontradiktorni.

Abbas i saradnici nisu otkrili korelaciju TNF alfa-308 genotipova sa stepenom nekroinflamatorne aktivnosti, niti sa cirozom jetre kod bolesnika inficiranih HCV genotipom 3 (185). *Goyal* i saradnici ispitivali su distribuciju pojedinih TNF-308 genotipova u grupi bolesnika sa blagom ili srednjom fibrozom (F skor ≤ 2) i u grupi sa težim oblikom fibroze (F skor >2). Autori nisu našli statistički značajnu razliku u distribuciji TNF-308 genotipova između ove dve grupe ispitanika (120). Slične rezultate objavili su *Powell* i saradnici uz zaključak da polimorfizam TNF alfa-308 ne korelira sa stadijumom fibroze i da nema prognostički značaj kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom (186).

Međutim, novija istraživanja su pokazala značajnu povezanost TNF alfa-308 GA i AA genotipova sa inflamacijom, steatozom i fibrozom jetre. *Radwan* i saradnici su dokazali da pacijenti sa hroničnom HCV infekcijom i genotipovima GA i AA imaju 2–3 puta veći rizik za razvoj fibroze nego oni sa GG genotipom, a 2,9 puta veći rizik za razvoj hepatocelularnog karcinoma. Autori zaključuju da genetsko testiranje na TNF alfa-308 genotipove može biti korisno u detekciji pacijenata sa HCV infekcijom koji su u visokim riziku za razvoj HCC (187). *Yee* i saradnici pratili su uticaj ALT-a, TNF alfa-308 genotipa, virusnog genotipa i viremije u dvema grupama bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom, u grupi pacijenata sa cirozom i grupi ispitanika bez ciroze jetre. Univarijantna i multivarijantna analiza izdvojile su TNF alfa-308 A varijantu kao faktor rizika za razvoj ciroze (188).

Bader i saradnici otkrili su statistički značajnu distribuciju TNF alfa-308 genotipa AA i A alela kod bolesnika sa stadijumom fibroze F2-F4 u odnosu na onu kod pacijenata sa stadijumom F0-F1. Rezultati ovog istraživanja pokazali su jasnu povezanost genotipova GA i AA sa inflamacijom, steatozom i fibrozom. Multivarijantna logistička regresiona analiza izdovija je alel A kao nezavistan faktor rizika za inflamaciju, steatozu i fibrozu jetre (183).

Slične rezultate objavili su *Moreira* i saradnici, koji ukazuju na značajnu korelaciju genotipa GA i odmaklog stadijuma fibroze i ciroze kod bolesnika inficiranih genotipom 1. Multivarijantna logistička regresiona analiza izdvojila je godine starosti i genotip GA kao faktore povećanog rizika za razvoj fibroze i ciroze. S druge strane, genotip GG predstavlja faktor smanjenog rizika za razvoj fibroze (189).

U ovom istraživanju TNF alfa-308 genotip GG otkriven je kod 76.9% pacijenata sa stadijumom F0-F1 i kod 28.6% ispitanika sa fibrozom stadijuma \geq F2. Genotipovi sa alelom A (GA i AA) otkriveni su kod 23.1% pacijenata sa stadijumom F0-F1 i 71.4% onih sa fibrozom stadijuma \geq F2. Genotipovi GA i AA značajno koreliraju sa stadijumom fibroze \geq F2, a GG sa stadijumom F0-F1 ($p < 0.001$).

Prosečne vrednosti ALT-a i AST-a, kao biohemijskih markera citoloze hepatocita, analizirane su u odnosu na TNF alfa-308 genotipove. Prosečna vrednost AST-a kod pacijenata sa GA i AA genotipovima iznosila je 113.59 ± 139.44 , a u grupi pacijenata sa GG genotipom 58.08 ± 41.33 U/L. Prosečna vrednost AST-a u grupi pacijenata sa GA i AA genotipovima bila je značajno viša ($p < 0.001$).

Prosečna vrednost ALT-a kod pacijenata sa GA i AA genotipovima iznosila je 129.43 ± 156.65 , a u grupi pacijenata sa GG genotipom 70.02 ± 46.38 U/L. I prosečna vrednost ALT-a u grupi pacijenata sa GA i AA genotipovima bila je značajno viša ($p = 0.005$).

Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima *Bader* i saradnika koji su, osim povezanosti genotipova GA i AA sa odmaklim stadijumom fibroze, dokazali da su vrednosti ALT-a i AST-a značajno više u grupi bolesnika sa genotipovima GA i AA nego kod onih sa genotipom GG (183).

Univarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da je povećana verovatnoća za razvoj značajne fibroze povezana sa HCV genotipom 3 (OR=2.526, 95% IP: 1.012 do 6.304, $p = 0.047$), dok je smanjenje verovatnoće za razvoj značajne fibroze povezano sa HCV genotipom 1a (OR=0.374, 95% IP: 0.147 do 0.950, $p = 0.039$) i sa TNF alfa-308 GG genotipom (OR=0.120, 95% IP: 0.045 do 0.319, $p < 0.001$).

Multivarijantna logistička regresiona analiza je kao jedini značajni prediktor za razvoj značajne fibroze potvrdila TNF alfa-308 GG genotip. Genotip GG je povezan sa smanjenjem verovatnoće za razvoj značajne fibroze (OR=0.116, 95% IP: 0.038 do 0.356, $p < 0.001$).

Analizirajući prosečnu vrednost FIB-4 skora u odnosu na TNF alfa-308 genotip, dobijeni su sledeći rezultati: prosečna vrednost FIB-4 skora kod pacijenata sa GA i AA genotipovima iznosila je 4.87 ± 3.38 , a u grupi pacijenata sa GG genotipom 2.22 ± 1.59 . Razlike u prosečnoj vrednosti FIB-4 skora između dve ispitivane grupe su statistički značajne ($p < 0.001$).

Statistički značajna povezanost genotipova GA i AA sa povišenim vrednostima transaminaza, višom prosečnom vrednošću FIB-4 skora i stadijumom fibroze \geq F2 u ovom istraživanju sugerise da polimorfizam TNF alfa-308 ima ulogu u razvoju kliničkih manifestacija hronične HCV infekcije.

Univarijantna linearna regresiona analiza je pokazala da je TNF alfa-308 GG genotip povezan sa smanjenjem vrednosti FIB-4 skora (B=-2.443, 95% IP: -3.429 do -1.457, $p<0.001$).

Multivarijantna linearna regresiona analiza je, kao značajne prediktore vrednosti FIB-4 skora, potvrdila starost pacijenata i GG genotip TNF α -308. Starost pacijenata je povezana sa povećanjem vrednosti FIB-4 skora (B=0.051, 95% IP: 0.007 do 0.095, $p=0.025$), dok je genotip GG povezan sa smanjenjem vrednosti FIB-4 skora (B=-2.248, 95% IP: -3.360 do -1.327, $p<0.001$).

Fibroza jetre kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom nastaje kao posledica kontinuiranog inflamatornog odgovora na oštećenje hepatocita, koje je uzrokovano imunskim odgovorom. U toku inflamatornog odgovora dolazi do produkcije inflamatornih citokina koji imaju ulogu u razvoju fibroze. Jedan od njih je TNF alfa koji ima glavnu ulogu u pokretanju procesa razvoja ciroze. U prisustvu infekcije, aktivirani makrofagi u jetri (Kupferove ćelije) sekretuju citokine, a među njima TNF alfa. Ovaj citokin aktivira zvezdaste ćelije jetre, koje sekretuju komponente ekstracelularnog matriksa, što dovodi do akumulacije ekstracelularnog matriksa i razvoja fibroze (190, 181). Osim makrofaga, i CTL u jetri sekretuju TNF alfa (183).

Kada dodje do zamene normalnog parenhima jetre ekstracelularnim matriksnim depozitima, dolazi do progresije bolesti u cirozu (9). Nekoliko eksperimentalnih studija je pokazalo da inhibicija TNF alfa signalnog puta pomoću anti-TNF alfa antitela može da redukuje inflamaciju i da poboljša stanje bolesnika sa fibrozom (183).

Genotip TNF alfa-308 GG je divlji genotip, a alel A, prisutan u genotipovima GA i AA predstavlja mutantnu varijantu. Uticaj polimorfizma TNF alfa-308 gena u progresiji hroničnog oboljenja jetre i razvoju fibroze objašnjava se većom transkripcionom sposobnošću alela A, višom ekspresijom TNF alfa-308 gena i povećanom produkcijom ovog citokina. *Radwan* i saradnici objavili su rezultate svog istraživanja, koji su pokazali da je u grupi pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom, fibrozom i HCC-om nivo serumskog TNF alfa bio statistički značajno viši kod pacijenata sa AA nego kod onih sa GG genotipom. Pored toga, nivo TNF alfa u serumu bio je značajno viši kod bolesnika sa HCC-om u odnosu na one sa cirozom. Takođe, nivo serumskog TNF alfa bio je značajno viši kod pacijenata sa HCV infekcijom nego kod ispitanika kontrolne grupe (187). *Neuman* i saradnici su dokazali da nivo serumskog TNF alfa korelira sa stepenom inflamacije i HAI indeksom (114).

TNF alfa, koji potiče iz aktivisanih Kupferovih ćelija, produkuje slobodne radikale kiseonika (reaktivne vrste kiseonika – eng. *ROS*) (191). *ROS* obuhvata slobodne radikale kao što su: superoksidni anjon, hidrogen peroksid i hidroksilni radikal, koji mogu da uzrokuju oksidativni stres. Pošto TNF alfa ima ulogu u nastanku oksidativnog stresa, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je da se ispita uloga oksidativnog stresa u patogenezi hroničnog oboljenja jetre. Polazeći od činjenice da oksidativni stres predstavlja stanje poremećene ravnoteže između prooksidativnog i antioksidativnog sistema u ćeliji, nastalo usled pojačanog stvaranja slobodnih radikala u odnosu na kapacitet sistema antioksidativne odbrane da neutrališe slobodne radikale (133, 134), u ovom istraživanju ispitivan je nivo parametara oksidativnog stresa, TBARS i AOPP, i nivo katalaze kao enzimskog antioksidansa.

Komparativnom analizom parametara oksidativnog stresa i katalaze kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom i ispitanika kontrolne grupe, dobijeni su sledeći rezultati: nivo oksidativnih parametara bio je značajno viši u grupi bolesnika sa HCV infekcijom (TBAR $p < 0.001$, AOPP $p < 0.001$), a nivo katalaze u kontrolnoj grupi ($p = 0.007$). Pored toga, kod bolesnika inficiranih različitim genotipovima nivo parametara oksidativnog stresa bio je viši nego kod zdravih ispitanika kontrolne grupe, a nivo katalaze niži. Ovi rezultati, koji ukazuju na disbalans između *ROS* produkata i antioksidativne zaštite kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom zbog prekomerne produkcije *ROS-a*, a smanjene produkcije katalaze, u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora (192, 193).

Dokazano je da je među antioksidativnim enzimima aktivnost katalaze u jetri veoma visoka. Zbog toga, ona predstavlja prvu liniju odbrane antioksidativnog enzimskog sistema. Rezultati objavljeni u literaturi govore o tome da je kapacitet antioksidativne odbrane smanjen kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom. Smanjena antioksidativna aktivnost dovodi do nemogućnosti tkiva jetre da savlada oksidativni stres (192, 194).

U odnosu na genotipove HCV-a, nivo parametara oksidativnog stresa i katalaze nije bio statistički značajan, mada je nivo TBARS-a bio viši kod bolesnika inficiranih 1b genotipom, a nivo AOPP-a kod onih sa infekcijom izazvano genotipom 3. Slične rezultate objavili su *Khadem Ansari* i saradnici, koji su otkrili viši nivo MDA kod bolesnika inficiranih 1a i 1b genotipom (192). Odsustvo statistički značajne razlike u produkciji *ROS-a* između genotipova može se objasniti činjenicom da HCV core i nestrukturani proteini imaju visok stepen homologije među različitim genotipovima. Međutim, nešto viši nivoi parametara oksidativnog stresa kod bolesnika inficiranih genotipom 1b i 3 imaju značaja sa aspekta činjenice da su ovi genotipovi bili značajno povezani sa stadijumom fibroze \geq F2.

Analizom nivoa parametara oksidativnog stresa i katalaze u odnosu na nivo viremije kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom, dokazana je pozitivna korelacija između nivoa viremije i AOPP-a, odnosno da sa povećanjem nivoa viremije i nivo AOPP-a značajno raste. Pozitivna korelacija između nivoa viremije i TBARS-a nije dokazana. Međutim, rezultati pokazuju da povećanje nivoa viremije ima tendenciju da poveća nivo TBARS-a ($p=0.072$). Korelacija nivoa viremije i AOPP-a sugerše da virus, odnosno virusni proteini mogu biti direktno odgovorni za ROS produkciju, a time i oštećenje ćelije.

Mitohondrije su glavni izvor *ROS-a*, a hepatociti obiluju mitohondrijama (195). HCV core protein interreaguje sa mitohondrijalnim inhibitinom što dovodi do smanjene funkcije mitohondrijalnog respiratornog lanca, a time i prekomerne akumulacije *ROS-a* (196). E1, E2, NS3 i NS5A proteini povećavaju nivo *ROS-a* povećavajući influks intracelularnog kalcijuma i smanjujući mitohondrijalni transmembranski potencijal (197).

Takođe, HCV proteini mogu da uzrokuju i stres ER. NS5 A protein indukuje oslobađanje *ROS-a* tako što interreaguje sa strukturama membrane ER. Posle interakcije sa komponentama membrane, NS5 protein indukuje stress ER, praćen simultanim efluksom Ca^{2++} jona iz ER. Jone Ca^{2++} mogu da prihvate mitohondrije, menjajući na taj način transmembranski potencijal, što je praćeno smanjenjem molekularnog kiseonika, a time i akumuliranjem nestabilnog superoksidnog anjonskog radikala (O_2^-) u mitohondrijama. Kod ovog mehanizma, mitohondrijalni oksidativni fosforilacioni lanac, lociran na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani, glavni je izvor stvaranja slobodnih radikala (198).

I rezultati drugih autora ukazuju na značajnu povezanost hronične HCV infekcije i oksidativnog stresa i da intenzitet oksidativnog stresa može biti značajan faktor oštećenja jetre (199).

Može se zaključiti da dobijeni rezultati potvrđuju disbalans između markera oksidativnog stresa i antioksidativne odbrane organizma kod pacijenata sa HCV infekcijom, sa znatno pojačanom lipidnom peroksidacijom i oksidativnom modifikacijom proteina, a smanjenom aktivnošću katalaze. Pošto oksidativni stres može imati značajan uticaj na progresiju bolesti, fibrozu i karcinogenezu, naši rezultati govore u prilog uvođenja antioksidanata u ranu terapiju hronične HCV infekcije.

12. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Dominantan HCV genotip bio je genotip 1, sa višom učestalošću suptipa 1a nego suptipa 1b, a zatim genotip 3.
2. Nije otkrivena značajna korelacija nivoa viremije i pojedinih genotipova i suptipova HCV-a.
3. Vrednosti ALT-a i AST-a bile su značajno više kod bolesnika inficiranih HCV genotipom 1b i 3.
4. Genotipovi 1b i 3 značajno koreliraju sa stadijumom fibroze \geq F2.
5. Nivo viremije nije bio značajno povezan sa stadijumom fibroze.
6. Vrednosti ALT-a i AST-a bile su značajno više kod bolesnika sa stadijumom fibroze \geq F2.
7. Nije otkrivena značajna razlika u distribuciji genotipova TNF alfa-308 u grupi bolesnika sa HCV infekcijom i kontrolnoj grupi.
8. Genotipovi TNF alfa-308 sa alelom A (GA i AA) bili su značajno povezani sa stadijumom fibroze \geq F2, a genotip GG sa stadijumom F0-F1.
9. Genotipovi GA i AA TNF alfa-308 značajno su korelirali sa višim vrednostima AST-a i ALT-a.
10. Vrednosti FIB-4 skora bile su značajno više kod bolesnika sa genotipovima GA i AA, nego kod onih sa genotipom GG TNF alfa-308.
11. Verovatnoća za razvoj značajne fibroze povećana je kod bolesnika inficiranih HCV genotipom 3, a kod bolesnika sa HCV genotipom 1a i GG genotipom TNF alfa-308 postoji smanjena verovatnoća za razvoj značajne fibroze.
12. Multivarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da genotip GG TNF alfa-308 ima prediktivni značaj, kao parametar bolje prognoze bolesti.
13. Nivoi markera oksidativnog stresa bili su značajno viši kod bolesnika sa HCV infekcijom u odnosu na kontrolnu grupu, a marker antioksidativnog sistema kod zdravih osoba.

14. Nivoi markera oksidativnog stresa nisu pokazali značajnu razliku u odnosu na HCV genotip i suptip, ali su kod svih genotipova/suptipova bili značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu.
15. Vrednosti AOPP-a značajno su rasle sa porastom nivoa viremije, a vrednosti TBARS-a pokazale su tendenciju rasta.
16. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su postojanje disbalansa između markera oksidativnog stresa i antioksidativnog odbrambenog sistema organizma, odnosno povezanost oksidativnog stresa i HCV infekcije.

Opšti zaključak:

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da HCV genotipovi 1b i 3, povišene vrednosti ALT-a i AST-a, kao i genotip TNF alfa-308 mogu da budu parametri progresije hroničnog oboljenja jetre kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom. Genotip TNF alfa-308 GG je prediktor bolje prognoze bolesti. Pošto je HCV infekcija povezana sa oksidativnim stresom, ispitivanje markera oksidativnog stresa može biti od značaja u kliničkoj praksi u cilju boljeg sagledavanja kliničkog toka i ishoda bolesti.

13. LITERATURA

1. Du L, Tang H. An insight into the molecular characteristics of hepatitis C virus for clinicians. *Saudi Med J*. 2016;37(5):483-91.
2. Tawar RG, Schuster C, Baumert TF. HCV Receptors and Virus Entry. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C Virus I. Cellular and Molecular Virology*. Tokio: Springer; 2016. p. 81-103.
3. Marcotrigiano J, Catanese MT. The Structure of HCV. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C Virus I. Cellular and Molecular Virology*. Tokio: Springer; 2016. p. 31-64.
4. Shin-I T, Sugiyama M, Mizokami M. Hepatitis C Virus Genotypes and Their Evaluation. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C Virus I. Cellular and Molecular Virology*. Tokio: Springer; 2016. p. 15-29.
5. Lazarević I. Hepatitis C virus. U: Savić B, Mitrović S, Jovanović T, urednici. *Medicinska mikrobiologija*. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2020. p. 536-9.
6. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol*. 2004; 85: 3173-88.
7. Sandres K, Dubois M, Pasquier C, Payen JL, Alric L, Duffaut M, Vinel JP, Pascal JP, Puel J, Izopet J. Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J Virol*. 2000;74:661-8.
8. Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A. Sequence variability of HCV Core region: important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production. *Infect Genet Evol*. 2011;11(3):543-56.
9. Ghany MG, Liang TJ. Natural History of Chronic Hepatitis C. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C virus II. Infection and Disease*. Tokio: Springer; 2016. p. 3-55.
10. Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J Hepatol*. 2018;10(2):186-212.

11. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol*. 2006;80(5):2418-28.
12. Mazumdar B, Banerjee A, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. *Hepatology*. 2011;54(4):1149-56.
13. Merz A, Long G, Hiet MS, Brügger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem*. 2011;286(4):3018-32.
14. Moriishi K, Matsuura Y. Structural Proteins of HCV and Biological Functions. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C Virus I. Cellular and Molecular Virology*. Tokio: Springer; 2016. p. 105-27.
15. Shulla A, Randall G. Hepatitis C Virus- Host Interactions. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C Virus I. Cellular and Molecular Virology*. Tokio: Springer; 2016. p. 197-233.
16. Zona L, Lupberger J, Sidahmed-Adrar N, Thumann C, Harris HJ, Barnes A, Florentin J, Tawar RG, Xiao F, Turek M, Durand SC, Duong FH, Heim MH, Cosset FL, Hirsch I, Samuel D, Brino L, Zeisel MB, Le Naour F, McKeating JA, Baumert TF. HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe*. 2013;13(3):302-13.
17. Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guérin M, Mancip J, Granio O, Penin F, Lavillette D, Bartenschlager R, Baumert TF, Cosset FL, Dreux M. Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem*. 2012;287(37):31242-57.
18. 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(11):5751-63.
19. Lu H, Li W, Noble WS, Payan D, Anderson DC. Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J Proteome Res*. 2004;3(5):949-57.

20. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 2008;27(24):3300-10.
21. Li Y, Masaki T, Yamane D, McGivern DR, Lemon SM. Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(5):1881-6.
22. Romero-Brey I, Lohmann V. The HCV replicase Complex and Viral RNA Synthesis. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C Virus I. Cellular and Molecular Virology.* Tokio: Springer; 2016. p. 149-96.
23. Suzuki T, Suzuki R. Role of Nonstructural Proteins in HCV Replication. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C Virus I. Cellular and Molecular Virology.* Tokio: Springer; 2016. p. 129-48.
24. Salloum S, Wang H, Ferguson C, Parton RG, Tai AW. Rab18 binds to hepatitis C virus NS5A and promotes interaction between sites of viral replication and lipid droplets. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003513.
25. Vogt DA, Camus G, Herker E, Webster BR, Tsou CL, Greene WC, Yen TS, Ott M. Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003302.
26. Chigbu DI, Loonawat R, Sehgal M, Patel D, Jain P. Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells.* 2019;8(4):376.
27. Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):2986-91.
28. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature.* 2008;454(7203):523-7.
29. Kaplan DE. Immunopathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015;44(4):735-60..
30. Stanojević M. Virusna interferencija I interferoni. U: Savić B, Mitrović S, Jovanović T, urednici. *Medicinska mikrobiologija.* Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2020. p. 365-70.

31. Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol.* 1997;109(3):451-7.
32. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev.* 2000;174:5-20.
33. Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leukoc Biol.* 2004;76(4):743-59.
34. Swain MG. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond).* 2008;114(7):457-66.
35. Lucas M, Gadola S, Meier U, Young NT, Harcourt G, Karadimitris A, Coumi N, Brown D, Dusheiko G, Cerundolo V, Klenerman P. Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2003;77(3):2251-7.
36. Deignan T, Curry MP, Doherty DG, Golden-Mason L, Volkov Y, Norris S, Nolan N, Traynor O, McEntee G, Hegarty JE, O'Farrelly C. Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol.* 2002;37(1):101-8.
37. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell.* 2001;106(3):259-62.
38. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563-604.
39. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1-22.
40. Lunemann S, Schlaphoff V, Cornberg M, Wedemeyer H. NK cells in hepatitis C: role in disease susceptibility and therapy. *Dig Dis.* 2012;30 Suppl 1:48-54.
41. Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(10):1473-82.
42. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med.* 2000;191(9):1499-512.

43. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(1):3-8.
44. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162-74.
45. Ren JP, Zhao J, Dai J, Griffin JW, Wang L, Wu XY, Morrison ZD, Li GY, El Gazzar M, Ning SB, Moorman JP, Yao ZQ. Hepatitis C virus-induced myeloid-derived suppressor cells regulate T-cell differentiation and function via the signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Immunology.* 2016;148(4):377-86.
46. Kinchen VJ, Bailey JR. Defining Breadth of Hepatitis C Virus Neutralization. *Front Immunol.* 2018;9:1703.
47. Zeisel MB, Fafi-Kremer S, Robinet E, Habersetzer F, Baumert TF, Stoll-Keller F. Adaptive immunity to hepatitis C virus. *Viruses.* 2009;1(2):276-97.
48. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 1999;117(4):933-41.
49. Fitzmaurice K, Klenerman P. Cellular immunity and acute hepatitis C infection. *Curr Pharm Des.* 2008;14(17):1666-77.
50. Kondo Y, Machida K, Liu HM, Ueno Y, Kobayashi K, Wakita T, Shimosegawa T, Lai MM. Hepatitis C virus infection of T cells inhibits proliferation and enhances fas-mediated apoptosis by down-regulating the expression of CD44 splicing variant 6. *J Infect Dis.* 2009;199(5):726-36.
51. Ando K, Hiroishi K, Kaneko T, Moriyama T, Muto Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Imawari M. Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J Immunol.* 1997;158(11):5283-91.
52. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med.* 2006;45(4):183-91.
53. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001;194(10):1395-406.

54. 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 U S A*. 2002;99(24):15661-8.
55. Lauer GM, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, Schulze Zur Wiesch J, Paranhos-Baccala G, Sheridan I, Casson DR, Reiser M, Gandhi RT, Li B, Allen TM, Chung RT, Klenerman P, Walker BD. Full-breadth analysis of CD8+ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection and early therapy. *J Virol*. 2005;79(20):12979-88.
56. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol*. 2000;30(9):2479-87.
57. Li K. Innate Immune Recognition of Hepatitis C virus. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C Virus I. Cellular and Molecular Virology*. Tokio: Springer; 2016. p. 299-329.
58. Puig M, Mihalik K, Tilton JC, Williams O, Merchlinsky M, Connors M, Feinstone SM, Major ME. CD4+ immune escape and subsequent T-cell failure following chimpanzee immunization against hepatitis C virus. *Hepatology*. 2006;44(3):736-45.
59. Tester I, Smyk-Pearson S, Wang P, Wertheimer A, Yao E, Lewinsohn DM, Tavis JE, Rosen HR. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med*. 2005;201(11):1725-31.
60. Meyer-Olson D, Shoukry NH, Brady KW, Kim H, Olson DP, Hartman K, Shintani AK, Walker CM, Kalams SA. Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J Exp Med*. 2004;200(3):307-19.
61. 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(1):17-24.
62. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 2005;437(7062):1167-72.

63. Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(49):17717-22.
64. Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology*. 2005;128(4):1034-41.
65. Lin W, Kim SS, Yeung E, Kamegaya Y, Blackard JT, Kim KA, Holtzman MJ, Chung RT. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol*. 2006;80(18):9226-35.
66. Bode JG, Brenndörfer ED, Häussinger D. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462(2):254-65.
67. Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Häussinger D. IFN- α antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J*. 2003;17(3):488-90.
68. Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2004;190(11):1919-26.
69. Wertheimer AM, Bakke A, Rosen HR. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology*. 2004;40(2):335-45.
70. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, López-Díaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, García N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol*. 2002;76(10):5062-70.
71. Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, Asaad R, Heinzl FP, Lederman MM, Lehmann PV, Valdez H. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol*. 2004;172(8):4907-16.
72. Amjad M, Abdel-Haq N, Faisal M, Kamal M, Moudgal V. Decreased interferon- α production and impaired regulatory function of plasmacytoid dendritic cells induced by the hepatitis C virus NS 5 protein. *Microbiol Immunol*. 2008;52(10):499-507.

73. Della Bella S, Crosignani A, Riva A, Presicce P, Benetti A, Longhi R, Podda M, Villa ML. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4⁺ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology*. 2007;121(2):283-92.
74. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood*. 2001;97(10):3171-6.
75. Waggoner SN, Hall CH, Hahn YS. HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4⁺ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1407-19.
76. Jani AB, Hellman S. Early prostate cancer: hedonic prices model of provider-patient interactions and decisions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;70(4):1158-68.
77. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest*. 2000;106(10):1239-49.
78. Accapezzato D, Francavilla V, Rawson P, Cerino A, Cividini A, Mondelli MU, Barnaba V. Subversion of effector CD8⁺ T cell differentiation in acute hepatitis C virus infection: the role of the virus. *Eur J Immunol*. 2004;34(2):438-46.
79. Zimmermann M, Flechsig C, La Monica N, Tripodi M, Adler G, Dikopoulos N. Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes. *J Hepatol*. 2008;48(1):51-60.
80. Song X, Yao Z, Yang J, Zhang Z, Deng Y, Li M, Ma C, Yang L, Gao X, Li W, Liu J, Wei L. HCV core protein binds to gC1qR to induce A20 expression and inhibit cytokine production through MAPKs and NF- κ B signaling pathways. *Oncotarget*. 2016;7(23):33796-808.
81. Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Kaimori A, Oki C, Hiramatsu N, Kasahara A, Hayashi N. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology*. 2006;49(1-2):58-63.

82. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2004;173(10):6072-81.
83. Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut.* 2006;55(6):869-77.
84. De Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, Costa P, Congia S, Mingari MC, Moretta L. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):445-55.
85. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med.* 2002;195(1):43-9.
86. Yoon JC, Shiina M, Ahlenstiel G, Rehermann B. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology.* 2009;49(1):12-21.
87. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Ahlenstiel G, Zimmermann H, Leifeld L, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol.* 2005;166(2):443-53.
88. Herzer K, Falk CS, Encke J, Eichhorst ST, Ulsenheimer A, Seliger B, Krammer PH. Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J Virol.* 2003;77(15):8299-309.
89. Konan KV, Giddings TH Jr, Ikeda M, Li K, Lemon SM, Kirkegaard K. Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *J Virol.* 2003;77(14):7843-55.
90. Ha SJ, West EE, Araki K, Smith KA, Ahmed R. Manipulating both the inhibitory and stimulatory immune system towards the success of therapeutic vaccination against chronic viral infections. *Immunol Rev.* 2008;223:317-33.
91. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol.* 2003;77(8):4911-27.

92. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2007;27(4):670-84.
93. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. Sustained dysfunction of antiviral CD8⁺ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol*. 2001;75(12):5550-8.
94. Missale G, Cariani E, Ferrari C. Role of viral and host factors in HCV persistence: which lesson for therapeutic and preventive strategies? *Dig Liver Dis*. 2004;36(11):703-11.
95. Radziewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Osborn MK, Obideen K, Wehbi M, Freeman GJ, Lennox JL, Workowski KA, Hanson HL, Grakoui A. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8⁺ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol*. 2008;82(20):9808-22.
96. Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, Timm J, Kuntz M, Blum HE, Pircher H, Thimme R. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8⁺ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog*. 2010;6(6):e1000947.
97. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10(1):29-37.
98. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol*. 2006;80(22):11398-403.
99. Rutebemberwa A, Ray SC, Astemborski J, Levine J, Liu L, Dowd KA, Clute S, Wang C, Korman A, Sette A, Sidney J, Pardoll DM, Cox AL. High-programmed death-1 levels on hepatitis C virus-specific T cells during acute infection are associated with viral persistence and require preservation of cognate antigen during chronic infection. *J Immunol*. 2008;181(12):8215-25.
100. Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(45):16004-9.

101. Lang KS, Recher M, Navarini AA, Harris NL, Löhning M, Junt T, Probst HC, Hengartner H, Zinkernagel RM. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol.* 2005;35(3):738-45.
102. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, Hanson HL, Steinberg JP, Masopust D, Wherry EJ, Altman JD, Rouse BT, Freeman GJ, Ahmed R, Grakoui A. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol.* 2007;81(6):2545-53.
103. Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, Crotty S, von Herrath MG. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med.* 2006;203(11):2461-72.
104. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest.* 2004;113(7):963-72.
105. Rigopoulou EI, Abbott WG, Haigh P, Naoumov NV. Blocking of interleukin-10 receptor--a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus. *Clin Immunol.* 2005;117(1):57-64.
106. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2004;40(5):1062-71.
107. 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(6):1437-48.
108. Kondo Y, Ueno Y, Kakazu E, Kobayashi K, Shiina M, Tamai K, Machida K, Inoue J, Wakui Y, Fukushima K, Obara N, Kimura O, Shimosegawa T. Lymphotropic HCV strain can infect human primary naïve CD4+ cells and affect their proliferation and IFN- γ secretion activity. *J Gastroenterol.* 2011;46(2):232-41.
109. Sarhan MA, Chen AY, Michalak TI. Differential expression of candidate virus receptors in human T lymphocytes prone or resistant to infection with patient-derived hepatitis C virus. *PLoS One.* 2013;8(4):e62159.

110. Kondo Y, Shimosegawa T. Direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells. *World J Gastroenterol*. 2013;19(44):7889-95.
111. Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, Mizuochi T. Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent hepatitis C virus infection. *J Innate Immun*. 2010;2(6):607-17.
112. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
113. Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol*. 2000;35(9):665-72.
114. Neuman M, Angulo P, Malkiewicz I, Jorgensen R, Shear N, Dickson ER, Haber J, Katz G, Lindor K. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta reflect severity of liver damage in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(2):196-202.
115. Stanley AC, Lacy P. Pathways for cytokine secretion. *Physiology (Bethesda)*. 2010;25(4):218-29.
116. Fallahi P, Ferri C, Ferrari SM, Corrado A, Sansonno D, Antonelli A. Cytokines and HCV-related disorders. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:468107.
117. Noh IC, Ahmad I, Suraiya S, Musa NF, Nurul AA, Ruzilawati AB. Cytokine (IL-10, IL-6, TNF- α and TGF- β 1) Gene Polymorphisms in Chronic Hepatitis C Virus Infection among Malay Male Drug Abusers. *Biomedicines*. 2021;9(9):1115.
118. Lacy P, Stow JL. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood*. 2011;118(1):9-18.
119. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun*. 1999;1(1):3-19.
120. Goyal A, Kazim SN, Sakhuja P, Malhotra V, Arora N, Sarin SK. Association of TNF-beta polymorphism with disease severity among patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol*. 2004;72(1):60-5.
121. Thio CL, Goedert JJ, Mosbrugger T, Vlahov D, Strathdee SA, O'Brien SJ, Astemborski J, Thomas DL. An analysis of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms and haplotypes with natural clearance of hepatitis C virus infection. *Genes Immun*. 2004;5(4):294-300.

122. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992;1(5):353.
123. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol.* 1997;34(5):391-9.
124. Shmarina G, Pukhalsky A, Petrova N, Zakharova E, Avakian L, Kapranov N, Alioshkin V. TNF gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: contribution to the disease progression. *J Transl Med.* 2013 23;11:19.
125. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol.* 2001;62(11):1191-9.
126. Nelson DR, Lim HL, Marousis CG, Fang JW, Davis GL, Shen L, Urdea MS, Kolberg JA, Lau JY. Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci.* 1997;42(12):2487-94.
127. Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M, Zingariello P, Mancino P, Petrarca C, Pizzigallo E, Conti P, Vecchiet J. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci.* 2006;36(2):144-50.
128. Kinnman N, Andersson U, Hultcrantz R. In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35(12):1294-300.
129. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):209-18.
130. Choi J. Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(7):1135-50.
131. Heredia-Torres TG, Rincón-Sánchez AR, Lozano-Sepúlveda SA, Galan-Huerta K, Arellanos-Soto D, García-Hernández M, Garza-Juarez AJ, Rivas-Estilla AM. Unraveling the Molecular Mechanisms Involved in HCV-Induced Carcinogenesis. *Viruses.* 2022;14(12):2762.
132. Capone F, Guerriero E, Sorice A, Maio P, Colonna G, Castello G, Costantini S. Characterization of metalloproteinases, oxidative status and inflammation levels in the different stages of fibrosis in HCV patients. *Clin Biochem.* 2012;45(7-8):525-9.
133. Richter K, Kietzmann T. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):591-605.

134. Herb M, Gluschko A, Schramm M. Reactive Oxygen Species: Not Omnipresent but Important in Many Locations. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:716406.
135. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol.* 2013;87(14):8169-78.
136. Chusri P, Kumthip K, Hong J, Zhu C, Duan X, Jilg N, Fusco DN, Brisac C, Schaefer EA, Cai D, Peng LF, Maneekarn N, Lin W, Chung RT. HCV induces transforming growth factor β 1 through activation of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Sci Rep.* 2016;6:22487.
137. Rebbani K, Tsukiyama-Kohara K. HCV-Induced Oxidative Stress: Battlefield-Winning Strategy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7425628.
138. Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(2):108-18.
139. Aleksunes LM, Manautou JE. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):459-73.
140. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DT, Doehle B, Papic N, Delker DA, Jo J, Bertoletti A, Hagedorn CH, Gale M Jr. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003330.
141. Hurtado-Navarro L, Angosto-Bazarra D, Pelegrín P, Baroja-Mazo A, Cuevas S. NLRP3 Inflammasome and Pyroptosis in Liver Pathophysiology: The Emerging Relevance of Nrf2 Inducers. *Antioxidants (Basel).* 2022 8;11(5):870.
142. Russo FP, Zanetto A, Pinto E, Battistella S, Penzo B, Burra P, Farinati F. Hepatocellular Carcinoma in Chronic Viral Hepatitis: Where Do We Stand? *Int J Mol Sci.* 2022 2;23(1):500.
143. Thannickal VJ, Jandeleit-Dahm K, Szyndralewicz C, Török NJ. Pre-clinical evidence of a dual NADPH oxidase 1/4 inhibitor (setanaxib) in liver, kidney and lung fibrosis. *J Cell Mol Med.* 2023;27(4):471-481.
144. National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S3-20.

145. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015;44(4):717-34.
146. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 2006;3(2):47-52.
147. Mizamura T. Global Control of Hepatitis C virus Infection. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, editors. *Hepatitis C virus II. Infection and Disease.* Tokio: Springer; 2016. p. 347-68.
148. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015;61(1):77-87.
149. Pybus OG, Markov PV, Wu A, Tatem AJ. Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus. *Int J Parasitol.* 2007;37(8-9):839-49.
150. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C; Hepatitis Group. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat.* 2001;8(2):87-95.
151. Forman MS, Valsamakis A. Hepatitis c virus. In: Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warrock DW, editors. *Murray's Manual of Clinical Microbiology.* 10th ed. Washington: American Society of Microbiology Press; 2011. p. 1437-55.
152. Web MD Editorial Contributors. Hepatitis C diagnosis and Tests. <https://www.Webmed.com/hepatitis/diagnostic-tests-hepatitis-c-virus>.
153. Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci.* 2014;8(1):19-25.
154. Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol.* 2005;32(2):92-101.
155. Kesli R, Polat H, Terzi Y, Kurtoglu MG, Uyar Y. Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C virus (HCV) core antigen test with the HCV RNA assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4089-93.
156. Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J. Diagnosis and Management of Hepatitis C. *Am Fam Physician.* 2015;91(12):835-42.

157. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: A systematic review. *JAMA* 2007; 297(7):724-32.
158. WHO Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. (July 2018) Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/guide-care-treat-persons-diagnosed-chronic-hepatitis-c-978-92-4-155034-5>.
159. Sahreen S, Khan MR, Khan RA. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl₄-induced damage in rat. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11:48.
160. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304-13.
161. Nabavi SF, Nabavi SM, Abolhasani F, Moghaddam AH, Eslami S. Cytoprotective effects of curcumin on sodium fluoride-induced intoxication in rat erythrocytes. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2012;88(3):486-90.
162. Alberti A, Lacoïn L, Morais E, Lefevre C, Abogunrin S, Iheanacho I. Literature review of the distribution of hepatitis C virus genotypes across Europe. *J Med Virol*. 2016;88(12):2157-69.
163. PetruzzIELLO A, Coppola N, Loquercio G, Marigliano S, Giordano M, Azzaro R, Diodato AM, Iervolino V, Di Costanzo G, Di Macchia CA, Di Meo T, Paradiso L, Ferro R, Giuliano P, Russo F, Pasquale G, Cacciapuoti C. Distribution pattern of hepatitis C virus genotypes and correlation with viral load and risk factors in chronic positive patients. *Intervirology*. 2014;57(6):311-8.
164. Sallam M, Batarseh R, Natsheh A, Abbadi J, Al-Fraihat E, Yaseen A, Kaddomi D, Khamees N, Mahafzah A, Şahin GÖ. An update on hepatitis C virus genotype distribution in Jordan: a 12-year retrospective study from a tertiary care teaching hospital in Amman. *BMC Infect Dis*. 2019;20(1):3.
165. Delic D, Nesic Z, Prostran M, Maksic N, Cutovic M, Simonovic J, Svirtlih N. The relationship of serum aminotransferase levels to viral load and genotype in chronic hepatitis C. *Jugoslov Med Biochem*. 2005;24(4):247-52.
166. Shuliat'ev IS, Borunova ZhV, Shaposhnikova NN, Noskova KK, Drozdov VN. [Effect of hepatitis C virus genotype on viral load and clinical-laboratory characteristics of liver disease]. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2010;(10):17-21. Russian.

167. Ahmad W, Ijaz B, Javed FT, Kausar H, Sarwar MT, Gull S, Asad S, Shahid I, Hassan S. HCV genotype-specific correlation with serum markers: higher predictability for genotype 4a. *Virology*. 2011;8:293.
168. Lee CM, Lu SN, Hung CH, Tung WC, Wang JH, Tung HD, Chen CH, Hu TH, Changchien CS, Chen WJ. Hepatitis C virus genotypes in southern Taiwan: prevalence and clinical implications. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;100(8):767-74.
169. Lee YS, Yoon SK, Chung ES, Bae SH, Choi JY, Han JY, Chung KW, Sun HS, Kim BS, Kim BK. The relationship of histologic activity to serum ALT, HCV genotype and HCV RNA titers in chronic hepatitis C. *Journal of Korean Medical Science*. 2001;16(5):585-91.
170. Payan C, Roudot-Thoraval F, Marcellin P, Bled N, Duverlie G, Fouchard-Hubert I, Trimoulet P, Couzigou P, Cointe D, Chaput C, Henquell C, Abergel A, Pawlotsky JM, Hezode C, Coudé M, Blanche A, Alain S, Loustaud-Ratti V, Chevallier P, Trepo C, Gerolami V, Portal I, Halfon P, Bourlière M, Bogard M, Plouvier E, Laffont C, Agius G, Silvain C, Brodard V, Thieffin G, Buffet-Janvresse C, Riachi G, Grattard F, Bourlet T, Stoll-Keller F, Doffoel M, Izopet J, Barange K, Martinot-Peignoux M, Branger M, Rosenberg A, Sogni P, Chaix ML, Pol S, Thibault V, Opolon P, Charrois A, Serfaty L, Fouqueray B, Grange JD, Lefrère JJ, Lunel-Fabiani F. Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millennium: The GEMHEP GenoCII Study. *Journal of Viral Hepatitis*. 2005;12(4):405-13.
171. Berger A, von Depka Prondzinski M, Doerr HW, Rabenau H, Weber B. Hepatitis C plasma viral load is associated with HCV genotype but not with HIV coinfection. *Journal of Medical Virology*. 1996;48(4):339-43.
172. Moatter T, Hussainy AS, Hamid S, Ahmad Z, Siddiqui S. Comparative analysis of viral titers and histologic features of Pakistani patients infected with hepatitis C virus type 3. *International Journal of Infectious Diseases*. 2002;6(4):272-6.
173. Hwang SJ, Lee SD, Lu RH, Chu CW, Wu JC, Lai ST, Chang FY. Hepatitis C viral genotype influences the clinical outcome of patients with acute posttransfusion hepatitis C. *Journal of Medical Virology*. 2001;65(3):505-9.
174. Ripoli M, Pazienza V. Impact of HCV genetic differences on pathobiology of disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2011;9(9):747-59.

175. Breaking bad mitochondria: How hepatitis C survives for so long. Available online: www.Sciencedaily.com/releases/2014/04/140415143959.htm (accessed on 17 April 2019).
176. Probst A, Dang T, Bochud M, Egger M, Negro F, Bochud PY. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat.* 2011;18(11):745-59.
177. Freeman AJ, Law MG, Kaldor JM, Dore GJ. Predicting progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2003;10(4):285-93.
178. Fanning L, Kenny E, Sheehan M, Cannon B, Whelton M, O'Connell J, Collins JK, Shanahan F. Viral load and clinicopathological features of chronic hepatitis C (1b) in a homogeneous patient population. *Hepatology.* 1999;29(3):904-7.
179. Ghany MG, Lok AS, Everhart JE, Everson GT, Lee WM, Curto TM, Wright EC, Stoddard AM, Sterling RK, Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Morishima C, Morgan TR, Dienstag JL; HALT-C Trial Group. Predicting clinical and histologic outcomes based on standard laboratory tests in advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2010;138(1):136-46.
180. Shahid M, Idrees M, Nasir B, Raja AJ, Raza SM, Amin I, Rasul A, Tayyab GU. Correlation of biochemical markers and HCV RNA titers with fibrosis stages and grades in chronic HCV-3a patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2014;26(7):788-94.
181. Bouzgarrou N, Hassen E, Gabbouj S, Schvoerer E, Ben Mami N, Triki H, Chouchane L. Lack of effect of tumor necrosis factor- α -308 G/A polymorphism on severity of liver fibrosis in Tunisian hepatitis C virus (HCV)-infected patients. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010;34(4-5):297-304.
182. Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY, Ho MS, Lin ZY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Wang LY, Yu ML, Dai CY, Chang JG. Tumor necrosis factor- α 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia.* 2007;9(11):987-92.
183. Bader El Din NG, Farouk S, El-Shenawy R, Ibrahim MK, Dawood RM, Elhady MM, Salem AM, Zayed N, Khairy A, El Awady MK. Tumor necrosis factor- α -G308A polymorphism is associated with liver pathological changes in hepatitis C virus patients. *World J Gastroenterol.* 2016;22(34):7767-77.

184. Bahr MJ, el Menuawy M, Boeker KH, Musholt PB, Manns MP, Lichtinghagen R. Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2003;23(6):420-5.
185. Abbas Z, Moatter T, Hussainy A, Jafri W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. *World J Gastroenterol.* 2005;11(42):6656-61.
186. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2000;31(4):828-33.
187. Radwan MI, Pasha HF, Mohamed RH, Hussien HI, El-Khshab MN. Influence of transforming growth factor- β 1 and tumor necrosis factor- α genes polymorphisms on the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cytokine.* 2012;60(1):271-6.
188. Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun.* 2000;1(6):386-90.
189. Moreira ST, Silva GF, de Moraes CF, Grotto RM, de Moura Campos Pardini MI, Bicalho Mda G, Moliterno RA. Influence of cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms on the degree of liver damage in patients with chronic hepatitis C. *Meta Gene.* 2016; 9:90-6.
190. Chuang E, Del Vecchio A, Smolinski S, Song XY, Sarisky RT. Biomedicines to reduce inflammation but not viral load in chronic HCV--what's the sense? *Trends Biotechnol.* 2004;22(10):517-23.
191. Giannelli G, Antonaci S. Immunological and molecular aspects of liver fibrosis in chronic hepatitis c virus infection. *Histol Histopathol.* 2005;20(3):939-44.
192. Khadem Ansari MH, Omrani MD, Kheradmand F. Oxidative stress response in patients infected by diverse hepatitis C virus genotypes. *Hepat Mon.* 2015;15(2):e22069.
193. Limongi D, Baldelli S, Santi F, D'Agostini C, Palamara AT, Nencioni L, Ciotti M. Redox alteration in patients infected by different HCV genotypes. *Infez Med.* 2018;26(3): 249-54.
194. Razzaq Z, Malik A. Viral load is associated with abnormal serum levels of micronutrients and glutathione and glutathione-dependent enzymes in genotype 3 HCV patients. *BBA Clin.* 2014;2:72-8.

195. Li H, Huang MH, Jiang JD, Peng ZG. Hepatitis C: From inflammatory pathogenesis to anti-inflammatory/hepatoprotective therapy. *World J Gastroenterol*. 2018;24(47):5297-311.
196. Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology*. 2009;50(2):378-86.
197. Ivanov AV, Bartosch B, Smirnova OA, Isaguliantz MG, Kochetkov SN. HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses*. 2013;5(2):439-69.
198. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9599-604.
199. Reshi ML, Su YC, Hong JR. RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *Int J Cell Biol*. 2014;2014:467452.

14. BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Vukica Đorđević rođena je 24.11.1987. godine u Čupriji. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Stokholmu (Švedska). Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu upisala je školske 2008/9. godine, a diplomirala je na studijskom programu Integrisane akademske studije medicine 11.07.2014. godine, sa prosečnom ocenom 9.38. Doktorske akademske studije upisala je školske 2014/15 godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu. Kao student doktorskih studija, od 01.06.2015. godine, bila je uključena u rad Katedre za mikrobiologiju i imunologiju u svrhu stručnog i naučnog usavršavanja.

Radni odnos na određeno vreme, na Institutu za javno zdravlje – Centar za mikrobiologiju, zasnovala je 10.09.2015. godine, a zatim je 20.02.2017. godine primljena u stalni radi odnos.

Specijalistički ispit iz Medicinske mikrobiologije položila je decembra 2021. godine. Danas radi kao specijalista mikrobiolog na Odeljenju za virusologiju Centra za mikrobiologiju.

Juna 2017. godine izabrana je u zvanje saradnika u nastavi za UNO Mikrobiologija i imunologija-virusologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu, a 2020. godine u zvanje asistenta.

Objavila je ukupno 17 radova, od toga 7 u časopisima na SCI listi. Istraživač je na projektu resornog ministarstva, a bila je istraživač u dva Interna projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, koji su realizovani u period 2017–19. godina.

Asist. dr Vukica Đorđević dala je veliki doprinos u borbi protiv epidemije izazvane SARS- cov 2 virusom. Prva je počela da radi virusološku dijagnostiku ove virusne infekcije u Nišu, zbog čega je dobila Zahvalnicu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Istim povodom, Zahvalnica Medicinskom fakultetu uručena je dr Vukici Đorđević od strane premijerke Vlade Republike Srbije.

Govori engleski i švedski jezik.

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Утицај биолошких карактеристика вируса и полиморфизма гена фактора некрозе тумора-алфа на клиничке манифестације хроничне хепатитис С вирусне инфекције

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

(Име, средње слово и презиме)

Изјава 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов дисертације:

**Утицај биолошких карактеристика вируса и полиморфизма гена фактора
некрозе тумора-алфа на клиничке манифестације хроничне хепатитис С
вирусне инфекције**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам
предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**,
истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

(Име, средње слово и презиме)

Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Утицај биолошких карактеристика вируса и полиморфизма гена фактора некрозе тумора-алфа на клиничке манифестације хроничне хепатитис С вирусне инфекције

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)**

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

(Име, средње слово и презиме)