

UNIVERZITET U BEOGRADU
Medicinski fakultet

Đorđević Z. Jelena

**Značaj genskih polimorfizama IL28B
u predikciji stabilnog virusološkog
odgovora pacijenata sa hroničnim C
hepatitisom**

doktorska disertacija



Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
Medical faculty

Djordjevic Z. Jelena

**The influence of IL28B polymorphisms
on sustained virological response in
patients with chronic hepatitis C**

Doctoral Dissertation



Belgrade, 2014.

PODACI O MENTORU I KOMISIJI

Mentor

Prof. dr Petar Svorcan, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor

Doc. dr Ivana Lazarević, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA

1. Prof. dr Dragan Delić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Miodrag Krstić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

3. VNS dr Jasna Banković, Institut za biološka istraživanja „Dr Siniša Stanković“ u Beogradu

SAŽETAK

UVOD: *IL28B* polimorfizmi se smatraju važnim prognostičkim faktorom za ishod terapije pacijenata sa hroničnim C hepatitisom koji se leče standardnom, dvojnomo terapijom PEG-IFN/RBV.

CILJ: Ovo istraživanje ima za cilj da ispita uticaj pojedinačnih polimorfizama (eng. Single nucleotide polymorphisms, SNP): rs8099917, rs12979860 i rs12980275 i njihovih kombinacija (*IL28B* profili) na SVR, kao i uticaj virusoloških faktora i faktora od strane domaćina.

METODOLOGIJA: Istraživanje je obuhvatilo 136 pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 koji su lečeni po protokolu - pegilovani-interferon $\alpha 2a/\alpha 2b$ i ribavirin tokom 48 nedelja. Za ispitivanje polimorfizama korišćen je SSP-PCR (eng. Sequence specific primer - PCR) metod.

REZULTATI: SVR je postiglo 58.8% pacijenata. Genotipovi TT_{rs8099917} CC_{rs12979860} i AA_{rs12980275} su označeni kao "povoljni" zbog značajno veće prevalence u grupi pacijenata koja je odgovorila na primenjenu terapiju. S druge strane, genotipovi GG_{rs8099917} i TT_{rs12979860} su označeni kao "nepovoljni" jer su bili povezani sa izostankom odgovora na terapiju. Prisustvo CC_{rs12979860} ili AA_{rs12980275} povećava verovatnoću za SVR 3 odnosno 1.5 puta. *IL28B* profil koji u sebi sadrži makar jedan povoljan genotip TT_{rs8099917} ili CC_{rs12979860} ili AA_{rs12980275}, se pokazao kao nezavisni prediktor odgovora na primenjenu terapiju, a potom i mlađe životno doba i niži stepen nekroinflatorne aktivnosti jetre. Među pacijentima koji su postigli SVR, 87.5% je imalo neki od ovih *IL28B* profila. Najjaču PPV ima CC_{rs12979860} (81.8%), dok su najjaču NPV pokazali TT_{rs12979860} i GG_{rs8099917}, 65.5%, odnosno 61.6%. Niža serumaska aktivnost AST u korelaciji je sa TT_{rs8099917}, dok je niži nivo virusne replikacije pre početka terapije u korelaciji sa GG_{rs8099917}.

ZAKLJUČAK: Rezultati ovog ispitivanja su potvrdili da sva tri ispitivana polimorfizma imaju važnu ulogu u predikciji SVR. Od ispitivanih parametara kao nezavisni prediktor ishoda terapije, pokazao se *IL28B* profil koji u sebu sadrži makar jedan povoljan genotip od tri ispitivana polimorfizma.

Ključne reči: *IL28B*, Hepatitis C virus (HCV), polimorfizam pojedinačnog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism - SNP), stabilan virusološki odgovor (SVR)

Naučna oblast: gastroenterologija i hepatologija

SUMMARY

BACKGROUND: The three single nucleotide polymorphisms (SNPs) near *IL28B* gene were shown to be highly predictive of sustained virological response (SVR) in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection.

AIM: This study attempted to demonstrate the role of single and combined *IL28B* polymorphisms (rs8099917, rs12979860 and rs12980275) and other host and viral factors in predicting response to treatment, in Caucasian patients infected with HCV genotype 1.

METHODOLOGY: The study comprised 136 patients with chronic hepatitis C infection genotype 1 who were treated with pegylated-interferon $\alpha 2a/\alpha 2b$ and ribavirin for 48 weeks. SNPs were identified using SSP-PCR (Sequence specific primer - PCR).

RESULTS: 58.8% achieved SVR. Genotypes $TT_{rs8099917}$, $CC_{rs12979860}$ and $AA_{rs12980275}$ were associated with favorable response to treatment, while $GG_{rs8099917}$ and $TT_{rs12979860}$ were identified as predictors of treatment failure. Patients carrying genotypes $CC_{rs12979860}$ or $AA_{rs12980275}$ were 3 and 1.5 times more likely to achieve SVR, respectively. The presence of *IL28B* profiles (combinations of genotypes from all 3 SNPs), that included at least one of the favorable genotypes, was identified as the most important factor associated with SVR, followed by younger age and lower grade of histological activity. Of all patients who achieved SVR, 87.5% was carrying one of these *IL28B* profiles. The strongest PPV of single SNPs for achieving SVR was observed for $CC_{rs12979860}$ (81.8%). The presence of $TT_{rs12979860}$ showed the strongest NPV of 65.5%, followed by $GG_{rs8099917}$ 61.6%. The correlation of SNPs with other host and viral factors revealed association of $TT_{rs8099917}$ and lower AST levels as well as lower baseline viral load and $GG_{rs8099917}$.

CONCLUSION: Results of this study confirm that all investigated *IL28B* polymorphisms are associated with treatment response and that presence of any of the favorable *IL28B* genotypes can be considered independent pretreatment determinant of the effectiveness of therapy.

Key words: *IL28B*, Hepatitis C virus (HCV), single nucleotide polymorphism (SNP), sustained virological response (SVR)

Scientific field: gastroenterology and hepatology

ŽUTICA

“Ova bolest većinom dolazi od jakog duševnog rastrojstva, straha, gneva, ozlojedjenosti itd. Znaci su žuta boja lica, očiju i celog tela, žuta i gusta mokraćá, koja ostavlja na preobuci žutu boju, kao da si je obojio. Protiv žutice koja je došla od ljutine i teške brige leči ovo: naberi pet grama lišća leskova (ali iz šume), pa stavi u čisto, prirodno belo vino da prenoći u zatvorenom sudu. Izjutra rano naštinu treba popiti to vino (nastojak). 12 do 16 takvih napitaka za toliko dana obično izleči bolesnika....Ako koža mnogo svrbi i znoj zaudara, dobro je da se bolesnik okupa. Žuticu uvek treba lečiti neodložno, jer kad se ona napusti, onda prelazi u vodenu bolest, koja se posve teško leči. Pri ovoj bolesti mora se konačno ostaviti ljutnja i svako uživanje polne ljubavi i svako drugo naprezanje”

Vasa Pelagić

SADRŽAJ

1	Uvod	1
1.1	Virusni hepatitis	2
1.2	Virusni C hepatitis	2
1.2.1	Istorijat i biologija hepatitis C virusa	3
1.2.2	Organizacija genoma i genetička heterogenost virusa	3
1.2.3	Genotipovi virusa i njihov klinički značaj	5
1.2.4	Geografska distribucija genotipova	6
1.3	Kliničke karakteristike HCV infekcije	8
1.4	Epidemiološke karakteristike hronične HCV infekcije	10
1.5	Dijagnoza hronične HCV infekcije	12
1.6	Patogeneza hronične HCV infekcije	13
1.6.1	Citokin IL28B	15
1.6.2	Gen koji kodira IL28B i njegovi polimorfizmi	16
1.7	Terapija akutnog i hroničnog C hepatitisa	17
2	Ciljevi istraživanja	25
3	Materijal i metodologija	27
3.1	Kliničko ispitivanje pacijenata	28
3.2	Virusološke analize	30
3.3	Terapijski protokol i lečenje	30
3.4	Određivanje IL28B genotipova	31
3.5	Statistička analiza	33
4	Rezultati	35
4.1	Ispitivanje razlike između respondera i ne-respondera	36
4.2	Određivanje IL28 genotipova i njihova distribucija	38
4.3	Ispitivanje međusobne povezanosti prediktivnih faktora stabilnog virusološkog odgovora	43
4.4	Prediktivna vrednost ispitivanih parametara u odnosu na SVR	43

5	Diskusija	49
5.1	Značaj, distribucija i prevalenca IL28B genotipova u predikciji SVR	51
5.2	Značaj IL28B profila u predikciji SVR	57
5.3	Značaj demografskih, biohemijskih, virusoloških i patohistoloških parametara u predikciji SVR	59
5.4	Korelacija biohemijskih, patohistoloških i virusoloških faktora sa ispitivanim polimorfizmima	61
6	Zaključci	64
7	Literatura	66



1. UVOD

Procenjuje se da je 120 do 180 miliona ljudi širom sveta inficirano hepatitis C virusom (HCV) što čini oko 3% svetske populacije. Svake godine se registruje 3-4 miliona novih slučajeva (Shepard i sar., 2005.). Oko 20-30% obolelih ima progresivan tok bolesti sa ozbiljnim kliničkim posledicama. Hronična HCV infekcija povećava rizik razvoja ciroze jetre, hepatocelularnog karcinoma (HCC) i mortaliteta. Rizik razvoja hepatične dekompenzacije (ikterus, ascites, krvarenje iz varikoziteta jednjaka, encefalopatija) iznosi 3-4% godišnje (Fattovich i sar., 1997.), dok je rizik za nastanak HCC 3-7% godišnje (Sangiovanni i sar., 2006.). Posle razvoja neke od navedenih komplikacija, petogodišnje preživljavanje iznosi oko 50% (Fattovich i sar., 1997., Sangiovanni i sar., 2006.). Hronična C virusna infekcija je razlog transplantacije jetre u svetu (Lauer i sar., 2001.). Međutim, 5 godina nakon transplantacije jetre rizik razvoja ciroze jetre iznosi 28%, dok se u 40% slučajeva razvija hepatična dekompenzacija (Davis i sar., 2004., Berenguer i sar., 2000.).

Adekvatna antivirusna terapija ima za cilj eliminaciju virusa iz organizma, prevenciju razvoja komplikacija i letalnog ishoda što se postiže kroz stabilan virusološki odgovor (eng. sustained virological response, SVR) – nedetektabilna HCV RNK 24 nedelje po završenoj terapiji). Većina (99%) pacijenata koji postignu SVR ostaju HCV RNK negativni i 5 godina nakon terapije (Zeuzem i sar., 2004., Manns i sar., 2008., Swain i sar., 2007.).

Do danas je identifikovano šest genotipova hepatitis C virusa, a na našem području najčešći je genotip 1. Aktuelna terapija podrazumeva kombinovanu primenu pegilovanog interferona α (PEG-IFN) i ribavirina (RBV). Njenom primenom kod pacijenata sa genotipom 1 SVR se postiže tek kod 40% lečenih, što uz česte i mnogobrojne neželjene efekte lekova nameće potrebu za jasnim definisanjem prediktivnih faktora dobrog kliničkog i virusološkog odgovora na terapiju (Manns i sar., 2001., Fried i sar., 2002., Hadziyannis i sar., 2004., McHutchison i sar., 2004., Marcellin i sar., 2012.). Veći broj faktora utiče na tok i ishod terapije kao što su genotip virusa, stepen replikacije virusa pre započinjanja terapije, starosna dob pacijenta, pol, etnička pripadnost, body mass index (BMI), insulinska rezistencija (IR), stadijum fibroze jetre i aktivnost inflamacije (Zeuzem i sar., 2004., Conjeevaram i sar., 2006.). Brzi virusološki odgovor (eng. rapid virological response, RVR) kao i rani virusološki odgovor (eng. early virological response, EVR) pouzdani su prediktori SVR, ali su oni dostupni tek u 4. odnosno 12. nedelji terapije. Današnja istraživanja pokazuju da je odgovor na terapiju određen ne samo faktorima od strane domaćina i virusološkim parametrima već i da je genski determinisan (Ge i sar., 2009.). Od nedavno se smatra da su genski polimorfizmi *IL28B* najjači prognostički

faktori postizanja SVR (Dill i sar., 2011, Marcello i sar., 2006, Thompson i sar., 2010., Ge i sar., 2009., Suppiah i sar., 2009., Tanaka i sar., 2009.). Prirodna varijabilnost pojedinačnih nukleotida u blizini gena koji kodira IL28B razlog su za postojanje više genotipova IL28B kod ljudi. Postojanjem različitih genotipova *IL28B* se može objasniti spontana eliminacija virusa, razvoj hronične bolesti, ali i ishod terapije PEG-IFN/RBV. Do sada su kao najznačajnija izdvojena 3 polimorfizma na dugom kraku 19. hromozoma – rs12979860 (C/T), rs8099917 (T/G), rs12980275 (A/G) (Suppiah i sar., 2009, Tanaka i sar., 2009., Ge i sar. 2009.).

1.1 Virusni hepatitis

Hepatitis je svaka zapaljenska bolest jetre, različite etiologije. Klinička slika, prognoza i terapija zavise od uzroka bolesti. Bol u trbuhu, žuta prebojenost kože, povišena temperatura i uvećana jetra najčešće su kliničke manifestacije akutnog hepatitisa (Ryder i sar., 2001.). Hronična forma bolesti se uglavnom ispoljava nespecifičnim tegobama – umor, malaksalost, gubitak apetita uz tup bol ispod desnog rebarnog luka (DRL). Neki se hronični oblici hepatitisa manifestuju malim brojem simptoma i znakova i to tek kada je došlo do dugotrajne upale koja je uzrokovala zamenu hepatocita fibroznim tkivom, odnosno kada je razvijena citoza jetre (Kanwal i sar., 2012.). Najčešći uzroci akutnog hepatitisa su hepatotropni virusi: hepatitis A (HAV), hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), hepatitis D (HDV), hepatitis E (HEV) i hepatitis G (HGV)

1.2 Virusni C hepatitis

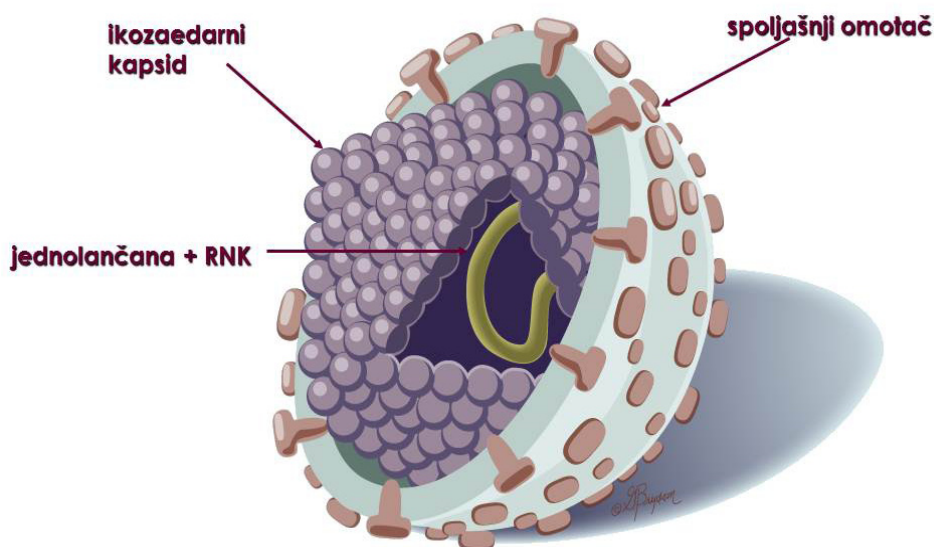
Veoma infektivno oboljenje jetre, koje se prenosilo feko-oralnim putem i verovatno bilo uzrokovano HAV, poznatno je nekoliko hiljada godina. Nastanak žutice nakon transfuzije krvi prvi put je opisan 1943. godine (Beeson i sar. 1943.). HBV je otkriven u drugoj polovini XX veka (Blumberg i sar., 1965., Krugman i sar., 1967.). Međutim, njegovim otkrićem bilo je moguće utvrditi uzrok infekcije kod velikog broja obolelih, ali ne i kod svih (Blumberg i sar., 1967.).

Sumnja na postojanje novog hepatotropnog virusa postavljena je 1973. godine, kada je doveden u vezu sa nastankom posttransfuzionog hepatitisa non-A, non-B (Prince i sar., 1974.). Virus je definitivno identifikovan 1989. godine i nazvan je hepatitis C virus (Bradley i sar., 1985., Arima i sar., 1989.). Hepatitis C virus (izvorno “non-A, non-B hepatitis”) se prenosi putem kontaminirane krvi i derivata krvi, a znatno ređe seksualnim kontaktom (Sutton i sar., 2008.). Ne postoji vakcina

protiv hepatitis C virusa. Može da uzrokuje akutnu i hroničnu formu bolesti. Akutna bolest uglavnom protiče asimptomatski i ostaje neprepoznata. Iako asimptomatska kod oko 90% obolelih progredira u hroničnu formu bolesti. U hroničnoj fazi tegobe su nespecifične ili odsutne, sve dok se ne razvije ciroza jetre kao završni stadijum hronične bolesti jetre (Lehmann i sar., 2004, Thompson i sar., 2007.).

1.2.1. Istorijat i biologija hepatitis C virusa

Hepatitis C virus pripada porodici Flaviviridae. To je mala partikula veličine 55-65µm koja se sastoji od kapsida i spoljašnjeg omotača (Slika 1). U kapsidu je sadržana jednolančana (+) RNK, dužine oko 9.600 baznih parova, dok je kapsid obavijen dvoslojnim lipoproteinskim spoljašnjim omotačem koji se sastoji od proteina – glikoproteina E1 i E2 koji su kodirani od strane samog virusa i lipida koji potiču od ćelije domaćina (Chooi sar., 1989.). HCV je otporan u spoljašnjoj sredini. Na temperaturi od 25°C ostaje infektivan i do 16 dana, a na 37°C oko 2 dana. Izuzetno je otporan na niske temperature. Na temperaturama nižim od 4°C ostaje aktivan duže od 6 nedelja. Osetljiv je na toplotu – temperature preko 65°C dovode do njegove inaktivacije tokom 4 minuta. Takođe je osetljiv i na jonizujuće i ultraljubičasto zračenje kao i na organske rastvarače (Songsar., 2010.).

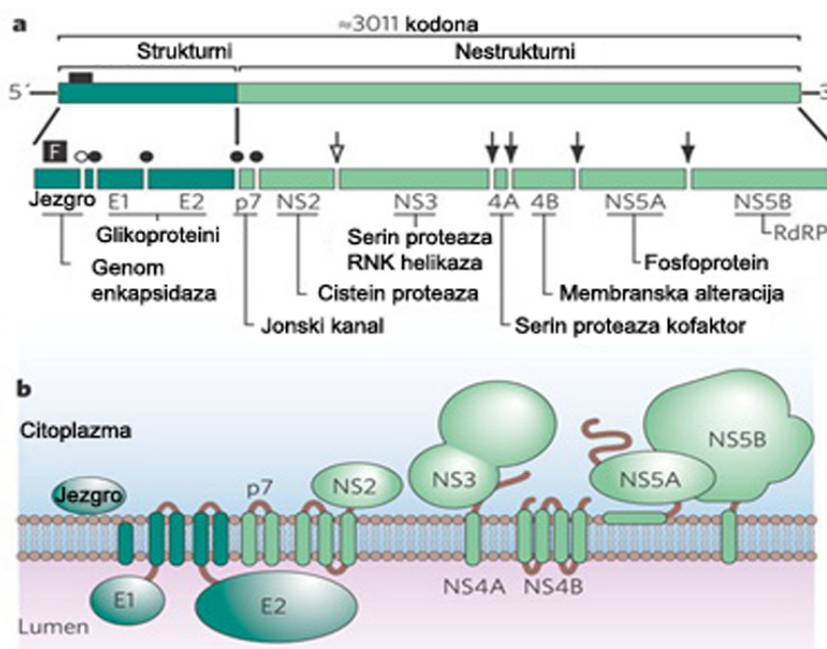


Slika 1. Šematski prikaz hepatitis C virusa. Kapsid sa (+) RNK i spoljašnji omotač.

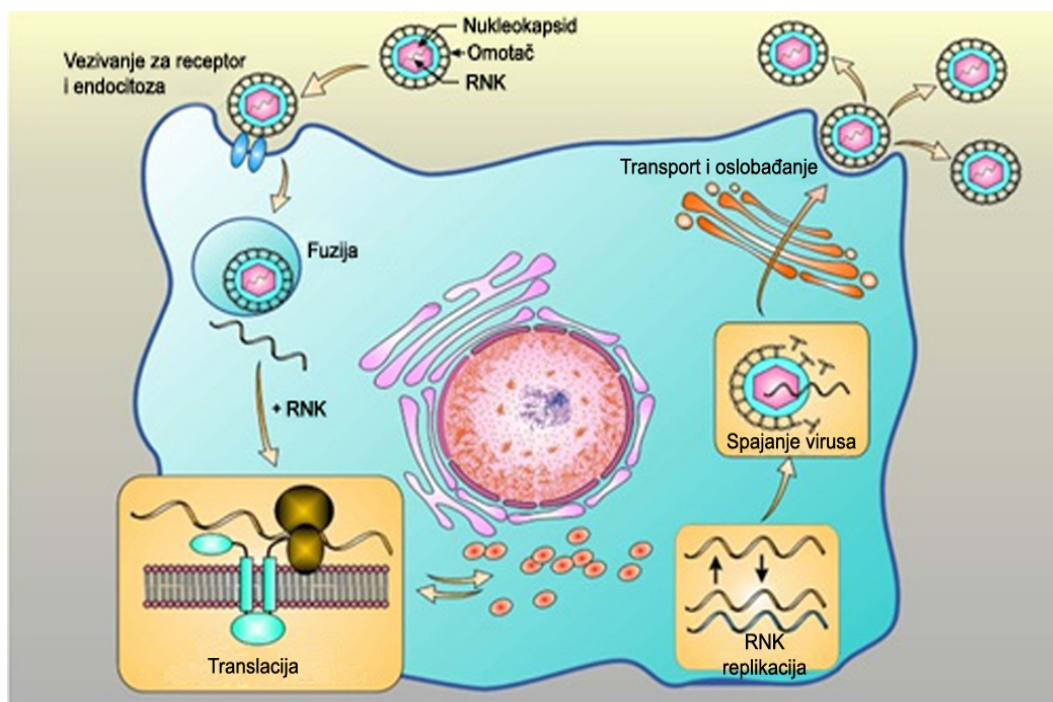
1.2.2 Organizacija genoma i genetička heterogenost virusa

Genom HCV je izuzetno heterogen i sklon čestim mutacijama zbog grešaka u procesu transkripcije i nedostatka reparacionih mehanizama. U genomu se izdvajaju dva nekodirajuća

regiona – 5' i 3' i dva kodirajuća regiona – S-region koji kodira sintezu strukturnih proteina i NS-region koji kodira sintezu nestrukturnih proteina. Nekodirajući regioni ne učestvuju u sintezi strukturnih proteina virusa, ali imaju važnu ulogu u replikaciji virusne RNK. Protein jezgra (C protein), E1 i E2 proteini čine strukturne proteine virusa, dok grupi nestrukturnih proteina pripadaju NS2, NS3, NS4, NS4A, NS4B, NS5 i NS5B (Slika 2). Iako proces onkogeneze kod pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom još uvek nije dovoljno razjašnjen, smatra se da C protein učestvuje u onkogenezi kod hepatocita, dok glikoproteini E1 i E2 učestvuju u ulasku virusa u hepatocit. Najvarijabilniji deo genoma virusa je E2 region. Zbog velike varijabilnosti genoma virusa izbegava stvorena antitela čime se objašnjava perzistencija virusa u organizmu i hronicitet bolesti. Nestrukturni proteini učestvuju u replikaciji virusa (Dubuisson i sar., 2007., Lauer i sar., 2011., Gupta i sar., 2012.). Ona se odigrava uglavnom u hepatocitima (Slika 3), ali i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi. Kod pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom replikacija virusa u mononuklearnim ćelijama periferne krvi može da dovede do pojave imunoloških poremećaja (krioglobulinemija, B – ćelijski limfom, monoklonske gamopatije) (Everharti sar., 2009., Moradpour i sar., 2007.).



Slika 2. Struktura i organizacija genoma hepatitis C virusa. Nekodirajući regioni – 5' i 3' i kodirajući regioni – S-region koji kodira sintezu strukturnih proteina i NS-region koji kodira sintezu nestrukturnih proteina. Nekodirajući regioni ne učestvuju u sintezi strukturnih proteina virusa – učestvuju u replikaciji virusne RNK. Protein jezgra (C protein), E1 i E2 proteini čine strukturne proteine virusa, dok su NS2, NS3, NS4, NS4A, NS4B, NS5 i NS5B nestrukturni proteini.



Slika 3. *Replikacija C virusa u hepatocitu. Replikacija virusa se odvija u više faza: apsorpcija i penetracija u hepatocit, translacija i replikacija virusnog genoma, kompletiranje viriona i njegovo napuštanje ćelije.*

1.2.3 Genotipovi virusa i njihov klinički značaj

Na osnovu prirodne genetske heterogenosti HCV se može klasifikovati u šest genotipova (1-6), dok unutar svakog genotipa postoji nekoliko podtipova (označeni su malim slovom). Postojanje genetske varijabilnosti unutar istog podtipa definiše se kao kvazi specijes i predstavlja genetsku heterogenost virusa kod inficirane osobe (Manns i sar., 2005., Rigat i sar., 2010., Biswal i sar., 2005., O'Farrell i sar., 2003.).

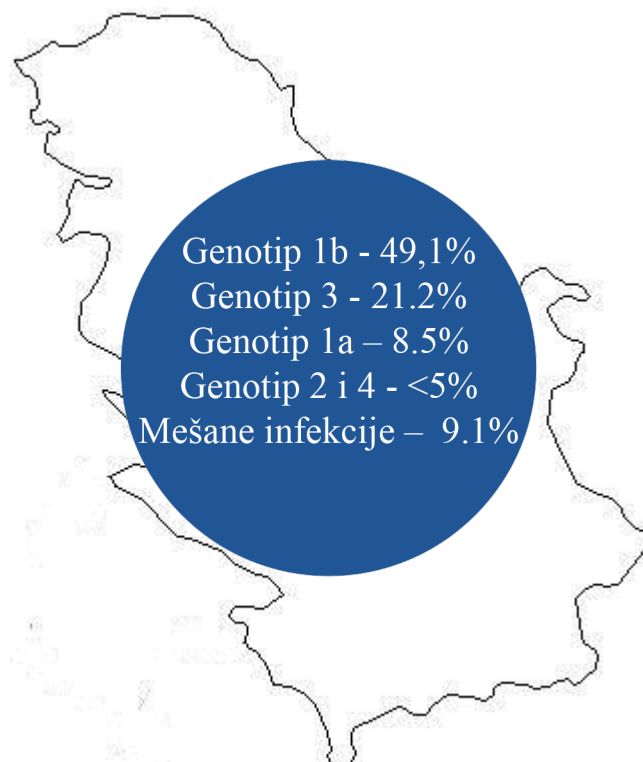
Genotip virusa je jedan od faktora koji određuje dužinu primene antivirusne terapije i prediktivni je faktor odgovora na terapiju. Genotipovi 1, 4, 5 i 6 slabije reaguju na terapiju interferonom u poređenju sa genotipovima 2 i 3. Dužina primene terapije kod pacijenata inficiranih genotipovima 1, 4, 5 i 6 je duža i iznosi 48 nedelja, dok za genotipove 2 i 3 iznosi 24 nedelje (European Association for the Study of the Liver, 2011.). Moguća je istovremena infekcija sa dva ili više genotipa (De Francesco i sar., 1999.). Uspeh primenjene terapije među različitim genotipovima takođe je

različit. Procenjuje se da oko 40-60% pacijenata sa genotipom 1 odgovori na primenjenu terapiju, 90% pacijenata sa genotipom 2 i 3, oko 65% sa genotipom 4 i oko 80% obolelih sa genotipom 6 (Manns i sar., 2001.).

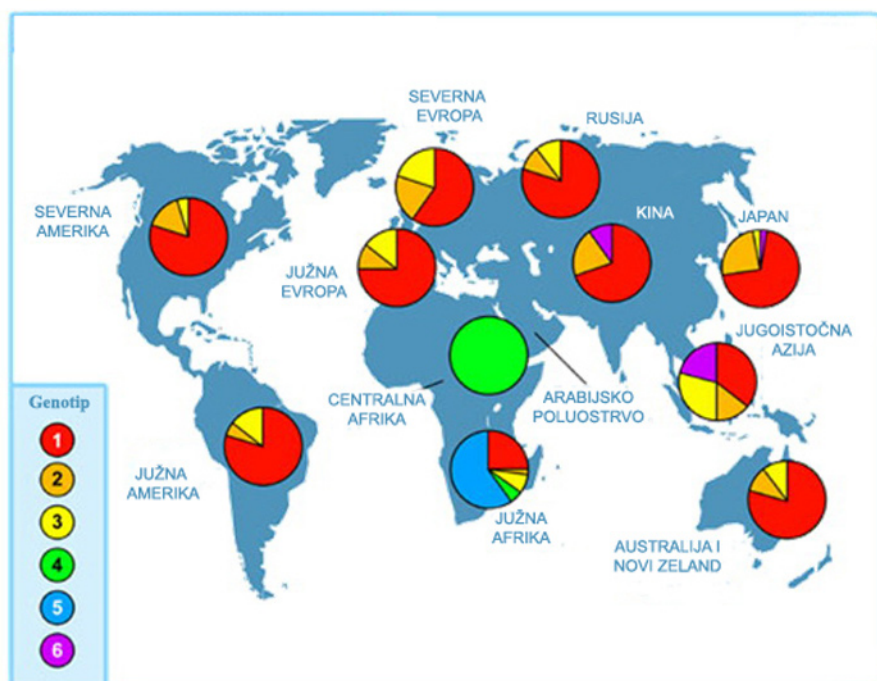
Podaci o brzini progresije bolesti i patogenosti genotipova su različiti. Pojedini autori smatraju da je genotip 1, naročito 1b patogeniji u poređenju sa drugim. Pacijenti inficirani genotipom 1b brže će razviti cirozu jetre i HCC (Simmonds i sar., 1993, 2005., Nakano i sar., 2011., Ohnoo i sar., 2007., Yu i sar., 2009., Laskus i sar., 2001., Takada i sar., 1996., Chen i sar., 1994., Haydon i sar., 1995., Tanaka i sar., 1996.). Međutim, postoje i autori koji smatraju da brzina progresije bolesti ne zavisi od genotipa virusa (Yotsuyanagi i sar., 1995., Lee i sar., 1996.). Da progresija bolesti ne zavisi od genotipa virusa govore i istraživanja autora iz naše zemlje (Švrtlih i sar., 2007.).

1.2.4 Geografska distribucija genotipova

Genotipovi pokazuju geografsku distribuciju na osnovu koje se može pratiti širenje infekcije (Slika 4). Genotipovi 1 i 2 sa svojim podtipovima 1a i 1b, odnosno 2a i 2b prisutni su u čitavom svetu. U zemljama zapadne Evrope i Sjedinjenim Američkim Državama ovi genotipovi su najčešći. U južnoj i istočnoj Evropi najčešći je genotip 1b. Genotipovi 5 i 6 imaju ograničenu geografsku distribuciju, uglavnom u zemljama Azije i južne Afrike. Genotip 2 je čest u zemljama zapadne Afrike. Analizom dosadašnjih istraživanja može se videti da genotipovi imaju i određenu distribuciju među različitim populacijama stanovništva. Tako je genotip 3 najzastupljeniji među intravenskim uživaocima droga (IVDU) i kod mlađih pacijenata, dok je tip 1b najčešći uzročnik infekcija kod osoba starijih od 50 godina (Simmonds i sar., 2004.). U našoj zemlji najčešća je infekcija genotipom 1 – 1b 49.1% i 1a 8.5%, a potom genotipom 3 koji se nalazi kod 21.2% obolelih. Infekcije genotipovima 2 i 4 su znatno ređe (6.7% i 4.6%). Infekcija sa dva ili tri genotipa je prisutna kod 9.1% obolelih (Stamenković i sar., 2000.). Oboleli sa genotipom 1 su značajno stariji u poređenju sa pacijentima koji su inficirani genotipom 3 ili 4 (Delić i sar., 2008., Švrtlih i sar., 2007.).



Slika 4. Zastupljenost HCV genotipova u Srbiji. Eur J Epidemiol. 2000.



Slika 5. Distribucija genotipova u svetu. U zemljama zapadne Evrope najčešći je genotip 1, a zatim genotipovi 2 i 3. Genotipovi 4 i 5 su najčešći u Africi, a genotip 6 u Aziji.

1.3 Kliničke karakteristike HCV infekcije

Procenjuje se da kod 50-90% obolelih akutna faza bolesti protiče inaparentno, odnosno asimptomatski.

Jedna od osnovnih karakteristika akutne HCV infekcije je njena progresija u hroničnu formu bolesti. Svega 10-20% obolelih eliminiše virus u prvih 3 meseca, dok oko 90% pacijenata razvije hroničnu bolest. Evolucija hronične infekcije traje decenijama. Prisustvo diabetes mellitusa, konzumiranje alkohola, HIV koinfekcije ili drugog hepatotropnog virusa ubrzava progresiju bolesti u cirozu jetre. U zavisnosti od prisustva kofaktora, 10-40% obolelih sa hroničnim C hepatitisom će razviti cirozu jetre (Lehmann i sar., 2004., Thompson i sar., 2007.). Smatra se da je najvažniji kofaktor u progresiji hronične infekcije u cirozu jetre konzumiranje alkohola. Ispitivanja su pokazala da ono povećava rizik razvoja ciroze i do 3 puta (Hutchinson i sar., 2005.). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je progresija bolesti brža ukoliko infekcija nastupi u starijem životnom dobu, odnosno kod osoba starijih od 50 godina (Davis i sar., 2010., Thein i sar., 2008., Poynard i sar., 2001.), dok je tok bolesti sporiji kod mlađih osoba, ženskog pola (Levine i sar., 2006.). HIV koinfekcija takođe ubrzava progresiju bolesti verovatno kroz smanjen broj CD4+ T limfocita (Benhamou i sar., 2001.).

Kod oko 70% pacijenata hronični hepatitis C protiče asimptomatski i otkriva se slučajno, pri rutinskoj kontroli biohemijskih analiza i slučajnim otkrivanjem povišenih vrednosti aminotranferaza (alanin-aminotranferaza – ALT, aspartat-aminotranferaza – AST) (Inglesby i sar., 1999.). Manji broj obolelih ima nespecifične tegobe – malaksalost, gubitak apetita, brzo zamaranje, tup bol ispod DRL (Kanwal i sar., 2012.). Ekstrahepatične manifestacije bolesti takođe mogu biti prisutne – krioglobulinemija, lihen planus, limfocitni sialoadenitis i membranozni glomerulonefritis. Prema nekim autorima postoji povezanost hronične C infekcije i non-Hodgkin limfoma (Tabela 1) (Calvaruso i sar., 2012.).

Neretko se bolest otkriva u terminalnoj fazi sa razvijenom cirozom, insuficijencijom jetre i HCC (Kanwal i sar., 2012.). HCV infekcija se smatra najčešćim uzrokom nastanka HCC u Evropi. Rizik mortaliteta kod ovih pacijenata iznosi 33% u prvoj godini od postavljanja dijagnoze (Yang i sar., 2010., Bartosch i sar., 2009.).

Tabela 1. Ekstrahepatične manifestacije HCV infekcije

Endokrinološke manifestacije	Reumatološke manifestacije	Hematološke manifestacije	Dermatološke manifestacije	Retke manifestacije (miscellaneous)
Autoimune bolesti štitaste žlezde	Mešovita krioglobulinemija	Limfoproliferativne bolesti (Non-Hodgkin limfom)	Palpabilna purpura	Depresija
D. mellitus /insulinska rezistencija	Vaskulitis	Monoklonske gamopatije	Porphyria cutanea tarda (PCT)	Hronični umor
	Periferna neuropatija	Autoimuna hemolitička anemija	Lichen planus	Miopatija
	Membrano-proliferativni glomerulonefritis (GF)		Pruritus	Miokarditis
	Membranozni GF			Kardiomiopatija/Miocarditis
	Poli/oligoartritis			

1.4 Epidemiološke karakteristike hronične HCV infekcije

Prevalenca HCV infekcije u svetu se procenjuje ispitivanjem prokuženosti dobrovoljnih davalaca krvi i iznosi oko 3%. Međutim, ova prevalenca je samo približan pokazatelj infekcije u opštoj populaciji, jer dobrovoljnim davanjem krvi nisu obuhvaćene osobe mlađe od 18 i starije od 65 godina, osobe sa hroničnim bolestima kao i one sa faktorima rizika za krvno-transmisivne bolesti (Lavanchy i sar., 2009.). Prevalenca HCV zavisi od geografskog područja. Najniža je u Velikoj Britaniji i u zemljama Skandinavije gde se kreće između 0.01% i 0.1%, dok je nešto viša u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i zapadnoj Evropi (oko 0.5%). Najvišu prevalencu u Evropi imaju mediteranske zemlje, Italija 0.7% i Španija 0.9%. Analizom epidemioloških podataka o Južnoj Americi, može se videti da je prevalenca u Argentini 0.9%, a u Brazilu 1.7%. Visoke prevalencije se beleže u i zemljama Azije – u Japanu 1.5% i u Kini 2.5%. Ipak, najviša prevalenca HCV infekcije je u zemljama Severne Afrike, posebno u Egiptu i kreće se i do 20% (Armstrong i sar., 2000., Wasley i sar., 2000., Davis i sar., 2010.). U našoj zemlji iznosi od 0.3 do 0.7% (Delić, 2012.). Smatra se da su geografske varijacije u prevalenci HCV infekcije posledica prisustva, odnosno odsustva različitih faktora rizika. Tako se na primer, HCV infekcija u SAD i Australiji registruje pretežno kod mlađih osoba (30-49 godina starosti), muškog pola koji su IVDU, dok je kod osoba starijih od 50 godina put infekcije gotovo uvek transfuzija kontaminirane krvi u mladosti (Armstrong i sar., 2000., Davis i sar., 2010.). S druge strane, u Japanu i Italiji obolele su uglavnom osobe starije životne dobi. U Egiptu ne postoje razlike u starosnim strukturama obolelih zbog jatrogenog prenosa infekcije kontaminiranom krvi i derivata krvi gde je većina ljudi inficirana genotipom 4 (Wasley i sar., 2000.).

Izvor infekcije je uvek čovek, sa akutnom ili hroničnom HCV infekcijom. S obzirom da se HCV nalazi u svim telesnim tečnostima, ne iznenađuje podatak da je prevalenca HCV infekcije veća u takozvanim „rizičnim grupama“ nego u opštoj populaciji. „Rizičnim grupama“ se smatraju IVDU, bolesnici koji su primali transfuzije ili derivate krvi, bolesnici na hemodijalizi, osobe sa rizičnim oblicima seksulanog ponašanja i zdravstveni radnici. U faktore rizika spadaju i body piercing i bušenje ušiju kao i svi isceliteljski i kulturološko-verski obredi tokom kojih dolazi u kontakt krv dve osobe. Moguća je i vertikalna transmisija sa majke na plod (Delić, 2012.).

IVDU čine 60-80% novoobolelih u SAD. Rizik oboljevanja uživaoca psihoaktivnih supstanci iznosi 17% do skoro 80% godišnje. Visoka prevalenca HCV infekcije u ovoj populaciji prevashodno se objašnjava zajedničkom upotrebom kontaminiranih igala i drugog pribora, ali i zbog većeg broja seksualnih kontakata među uživaocima. Rizik za nastanak HCV infekcije među uživaocima narkotika se povećava sa dužinom staža i zavisi od veličine inokuluma. Bitno je napomenuti i da 14% kokainskih zavisnika koji nikada nisu koristili intravenske narkotike ima HCV infekciju – „ušmrkavanje“ kokaina zajedničnom cevčicom predstavlja rizik za nastanak HCV infekcije (Page i sar., 2009., Hagan i sar., 2010.).

Jedan od gavnih puteva prenosa HCV infekcije 70-ih godina prošlog veka bio je putem transfuzije kontaminirane krvi i derivata krvi. Međutim, uvođenjem dobrovoljnog davanja krvi i testiranja krvi na HBsAg broj obolelih u toj populaciji se smanjio za 60%. Tendencija pada oboljevanja se nastavila i 90-ih godina uvođenjem najpre prve, a potom i druge generacije anti-HCV testova kod davalaca krvi. Smatra se da danas rizik transmisije iznosi 0.01-0.001% po primenjenoj transfuziji. Poseban problem predstavljaju davaoci krvi u periodu „prozora“ infekcije kada još nisu napravili serokonverziju i kada potencijalno mogu zaraziti drugu osobu (Alter i sar., 1997.).

Seksualna transmisija virusa je moguća, ali je učestalost ovakvog načina prenosa infekcije manja u poređenju sa hepatitis B virusnom infekcijom što se objašnjava manjom otpornošću HCV u spoljašnjoj sredini i manjom koncentracijom HCV u semenoj i vaginalnoj tečnosti. Ipak, prevalenca anti-HCV antitela među seksualnim partnerima inficiranih osoba iznosi 3.2% i viša je nego u opštoj populaciji. Povećan rizik za dobijanje HCV imaju homoseksualci i promiskuitetne osobe (prevalenca među prostitutkama iznosi oko 4.4%) (Grady i sar., 2013.).

Rizik prenosa HCV infekcije sa inficirane majke na novorođenče je prisutan tokom čitave trudnoće, ali prenos nije čest. Kod majki koje su HCV RNK pozitivne rizik transmisije iznosi oko 3.2%. Prisustvo HIV koinfekcije povećava rizik vertikalnog prenosa zbog imunokompromitovanosti i kod HCV RNK pozitivnih majki iznosi 7.9% (Bonacini i sar., 2000.). Dosadašnja ispitivanja nisu pokazala da carski rez smanjuje prevalencu prenosa HCV infekcije i učestalost infekcije je slična kod vaginalnog porođaja i carskog reza (Murakami i sar., 2012.).

Zdravstveni radnici su pod većim rizikom od HCV infekcije u poređenju sa opštom populacijom, a infekcija najčešće nastaje akcidentalno – ubodom na kontaminiranu iglu ili neki drugi oštri predmet. Rizik iznosi oko 1.8% (0-6.6%).

Uprkos poznavanju puteva transmisije HCV infekcije, kod oko 30% obolelih put infekcije ostaje nepoznat i otkriva se slučajno pri rutinskoj kontroli krvi (Puro i sar., 1998.).

1.5 Dijagnoza hronične HCV infekcije

U diferencijalnog dijagnozi hroničnog C hepatitisa potrebno je razmotriti oštećenje jetre drugim hepatotropnim virusima, pre svega HBV i HDV, autoimune bolesti jetre, nealkoholni steatohepatitis (NASH), oštećenje jetre izazvano alkoholom i lekovima i metaboličke bolesti (Vilsonova bolest, hemohromatoza, deficit α -1 antitripsina). Dijagnoza se postavlja na osnovu kliničke slike, biohemijskih i virusoloških analiza, a za potvrdu dijagnoze potreban je patohistološki nalaz bioptata jetre. Prisustvo anti-HCV antitela utvrđuje se serološkim metodama- enzimoimuno testom (ELISA), dok se serumski HCV RNK određuje molekularnim tehnikama (lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu, eng. Real-time PCR), kvalitativno i kvantitativno. Najnovije generacije eseja poseduju visoku senzitivnost koja može da utvrdi postojanje izuzetno niskog stepena replikacije virusa (10 IU/ml) do replikacije od 107 IU/ml. Visoka senzitivnost novih eseja posebno mesto zauzima u „odgovorom vođenoj terapiji“ (eng. Response guided therapy, RGT) kada se u lečenju pacijenata sa hroničnim C hepatitisom koriste inhibitori proteaze.

Za procenu stepena težine oštećenja jetre, tj. stadijuma fibroze (staging) i stepena aktivnosti (grading), biopsija jetre i dalje predstavlja zlatni standard (Slika 5). Najčešće korišćeni scoring sistemi u Evropi su METAVIR, Scheuer, Ishak i Knodell (Poynard i sar., 1997.). Patohistološkim pregledom bioptata jetre naročito je važno identifikovati pacijente kod kojih je ciroza jetre prisutna pre započinjanja terapije, jer upravo ovi pacijenti pripadaju grupi onih koji imaju manju šansu da postignu SVR. Kod pacijenata sa jasnom klinčkom slikom ciroze jetre biopsija jetre nije potrebna. Za određivanje težine fibroze jetre pored biopsije koja je invazivna metoda, postoje i druge neinvazivne metode. Tranzitorna elastografija (TE) omogućava procenu stadijuma fibroze, ali ne govori o nekroinflamatornoj aktivnosti i etiologiji bolesti. U širokoj primeni su i serumski biohemijski markeri fibroze, ali su primenjivi samo kod pacijenata sa značajnom fibrozom (METAVIR score F2-F4) (European Association for the Study of the Liver, 2011.).



*Slika 6. **Ciroza jetre.** Makronodularna ciroza jetre uzrokovana najčešće HBV i HCV.*

1.6 Patogeneza hronične HCV infekcije

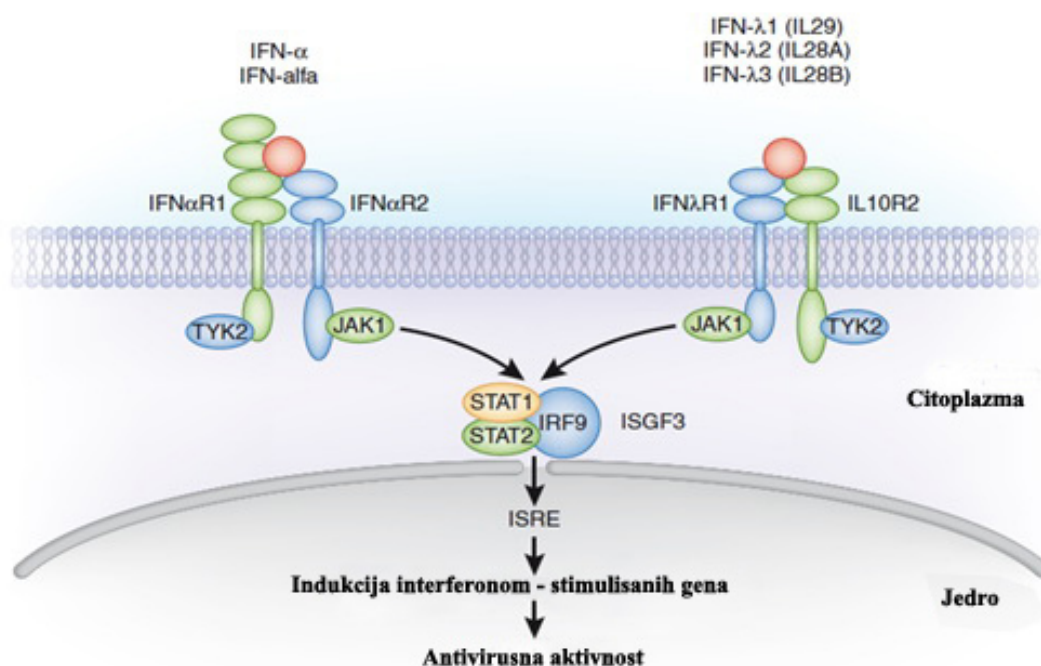
Poznato je da mnogi faktori utiču na tok i razvoj HCV infekcije. Celularni i humoralni imunski odgovor domaćina i genetska predispozicija značajno utiču na tok i ishod HCV infekcije. Specifični CD4+ T limfociti kod pacijenata sa „samoograničavajućim akutnim hepatitisom“, prepoznaju NS3 protein u kontekstu HLA antigena I klase i dovode do snažnog imunoproliferativnog odgovora koji je praćen produkcijom IFN- γ . U toku hronične faze bolesti CD4+ T ćelijski odgovor se smanjuje i kod hronično obolelih postaje nedektabilan. Proteini C i NS4 se smatraju najsnažnijim antigenima koje prepoznaju CD4+ T limfociti. CD4+ T limfociti proizvode različite citokine (IL-2, IFN- γ) koji imaju i imunomodulatorno dejstvo na B i CD8+ T limfocite. Dokazano je i citotoksično dejstvo CD8+ T limfocita koji prepoznaju antigene u kontekstu HLA antigena klase II. CD8+ limfociti prepoznaju peptide virusa na površini hepatocita i dovode do njihove eliminacije. Međutim, specifični citotoksični T limfociti prisutni su ne samo kod obolelih sa akutnom, već i kod pacijenata sa hroničnom C virusnom infekcijom što govori da je taj citotoksični odgovor nedovoljan da eliminiše virus. U hroničnoj C virusnoj infekciji prisustvo CD8+

T limfocita korelira sa hepatocelularnim oštećenjem. Da bi se razvio CD4+ i CD8+ posredovani imunološki odgovor potrebno je nekoliko dana ili nedelja. U međuvremenu, prvu liniju odbrane čine natural killer cells (NK ćelije). One nemaju Ag-specifične receptore, ali posreduju u citolizi virusom inficiranih ćelija. NK ćelije postaju aktivne u ranoj fazi virusne infekcije. Do njihove aktivacije dovodi tip 1 interferona (IFN- α/β) i IL-12. Aktivirane NK ćelije sekretuju citokine (IFN- γ , TNF- α), hemokine i interferon gama inducibilni protein - 10 (IP-10) (Diepolder i sar., 1996.).

IFN- α svoje antivirusno dejstvo ostvaruje aktivacijom stotina genastimuliranih interferonima (eng. Interferon-stimulated genes, ISG) dejući na interferon alfa receptor (IFN α R) kroz signalni put JAK-STAT (JAK – janus-kinaza, STAT – provodnik signala i aktivator transkripcije) (Slika 7). Naime, aktivacijom JAK1 i TYK2 (tirozin-kinaza) dolazi do fosforilacije STAT1 i STAT2 koji se vezuju za jedan od mnogobrojnih ISG promotera – IFN stimulirani element odgovora (ISRE). Njegovom aktivacijom ostvaruje se antivirusna aktivnost u inficiranoj ćeliji. S druge strane, aktivacijom ISG supresora (SOCS1, SOCS3) inhibira se fosforilacija STAT1 i STAT2 kroz inhibiciju JAK1 i TYK2 čime se antivirusno dejstvo suprimira. Poput IFN- α i IFN- λ ostvaruje svoje antivirusne dejstvo inhibirajući replikaciju virusa kroz signalni put JAK-STAT, ali putem različitog receptora na površini inficirane ćelije (O' Brien, 2010.).

Na prisustvo HCV organizam reaguje i stvaranjem antitela, 6-12 nedelja nakon akutne infekcije. Anti-HCV antitela su neutrališuća i stvaraju se na proteine C, NS3 i NS4, ali i na proteine hipervarijabilnog regiona E2.

I pored snažnog celularnog i humoralnog imunskog odgovora svega 20% inficiranih eliminiše virus iz organizma tokom akutne faze bolesti, dok ostali razvijaju hroničnu bolest što govori da je imunski sistem nedovoljan za eliminaciju virusa iz organizma. Zašto je to tako još uvek nije dovoljno jasno. Smatra se da važnu ulogu u razvoju hronične infekcije imaju upravo CD8+ T limfociti koji ne sekretuju dovoljnu količinu IFN- γ (Tester i sar., 2005., Rahman i sar., 2004., Lauer i sar., 2005., Wiegand i sar., 2007., Rosen i sar., 2003.).



Slika 7. Interferoni i citokini u kontroli virusne infekcije. IFN- α i IFN- λ aktivacijom JAK1 i TYK2 (tirozin-kinaza) dovodi do fosforilacije STAT1 i STAT2 koji se vezuju za ISG promotera – IFN stimulisani element odgovora (ISRE). Njegovom aktivacijom ostvaruje se antivirusna aktivnost u inficiranoj ćeliji (O'Brien, Nature genetics, 2009.).

1.6.1 Citokin IL28B

Poznato je da citokini imaju važnu ulogu u borbi protiv virusnih infekcija. Indukujući imunološki odgovor pomažu eliminaciju virusa iz organizma. Citokini su mali signalni molekuli. Mogu se klasifikovati kao proteini, peptidi ili glikoproteini; termin "citokini" se odnosi na veliku i raznoliku porodicu regulatora koje u čitavom organizmu proizvode ćelije različitog embrionalnog porekla. Jedan od njih je i IL28 koji ima dve izoforme IL28A (IFN- λ 2) i IL28B (IFN- λ 3) i ima ulogu u odbrani organizma od virusa. IL28B je otkriven 2003. godine i zajedno sa IL28A i IL29 (IFN- λ 1) pripada tipu III interferonske familije citokina. Antivirusne osobine svrstavaju ga u porodicu interferona, dok zbog svoje hromozomske lokalizacije i strukture kao i činjenice da je kodiran multiplim egzonima pripada citokinima (Asselah i sar., 2008., Sheppard i sar., 2003.). Označava se i kao interferon λ 3 (IFN- λ 3) i učestvuje u imunološkoj kontroli HCV infekcije delujući na ISGF3 suprimirajući replikaciju HCV. Glavnu ulogu u njegovoj sekreciji imaju dentritične ćelije, ali

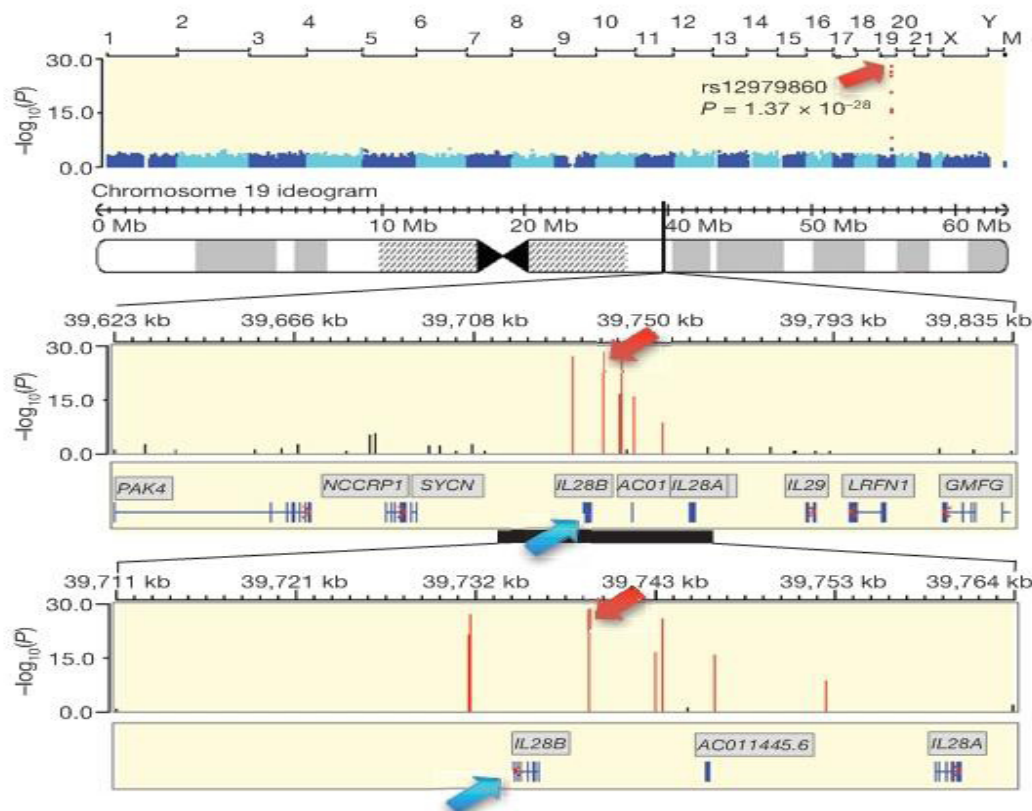
i makrofagi i Kupferove ćelije jetre (Jensen i sar., 2012., Marcello i sar., 2006.). Sinteza i sekrecija neadekvatne količine IL28B kod pacijenata sa HCV infekcijom može biti povezana sa razvojem hronične bolesti jetre ili razvojem rezistencije na terapiju interferonom (Dill i sar., 2011.).

1.6.2 Gen koji kodira IL28B i njegovi polimorfizmi

Geni koji kodiraju IL28 se nalaze blizu IL29 na hromozomu 19 (Slika 8). Receptor za IL28 se sastoji od jedinstvenog IL28 receptor alfa lanca koji se spaja sa IL10 receptor beta lancem.

U Studijama ispitivanja celog genoma (eng. GWAS – Genome Wide Association Studies) 2009. godine utvrđeno je postojanje više polimorfizama pojedinačnog nukleotida (eng. SNP – single nucleotide polymorphism) u blizini gena koji kodira IL28B koji utiču na ishod terapije pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1. Ovi polimorfizmi su odgovorni za postojanje više genotipova IL28B od kojih zavisi spontana eliminacija virusa C hepatitisa, razvoj hronične bolesti, ali i ishod terapije interferonom i ribavirinom (Ge i sar., 2009, Suppiah i sar., 2009, Tanaka i sar., 2009, Rallón i sar., 2012.). Smatra se da oni utiču na tok virusne infekciju menjajući ekspresiju i/ili funkciju IFN- λ 3. Odnos između IFN- α i IFN- λ 3 i kako je njihov odnos regulisan IL28B genotipom do danas nije sasvim razjašnjen. Takođe nije poznato da li bazalna vrednost IFN- λ 3 (vrednost pre započinjanja terapije) zavisi od genotipa IL28B. Po podacima koje su objavili Rallón i sar. 2012. godine serumski nivo IFN- λ 3 ne zavisi od genske varijabilnosti IL28B, dok je po drugima autorima visok nivo IFN- λ 3 uslovljen postojanjem “povoljnog” genotipa IL28B (Langhans i sar., 2011.).

Do sada su se u predikciji SVR, kod pacijenata inficiranih genotipom 1, kao najznačajnija izdvojila 3 polimorfizma na dugom kraku 19. hromozoma – rs12979860 (C/T), rs8099917 (T/G), rs12980275 (A/G). Polimorfizmi rs12979860 (Ge i sar., 2009, Rauch i sar., 2010.) i rs8099917 (Tanaka i sar., 2009, Thomas i sar., 2009.) se nalaze 3 kbp odnosno 7.5 kbp uzvodno, dok se rs12980275 (Tanaka i sar., 2009.) nalazi 2.5kbp nizvodno od IL28B gena. Danas se smatra da su genski polimorfizmi IL28B nezavisni prognostički faktori postizanja SVR (Ge i sar., 2009, Thompson i sar., 2010, Rallón i sar., 2012.).



Slika 8. Struktura IL28B gena. rs12979860 3 kbp uzvodno od IL28B gena

1.7 Terapija akutnog i hroničnog C hepatitisa

S obzirom da 50-90% obolelih sa akutnim hepatitisom razvija hroničnu formu bolesti koja sa sobom nosi čitav niz ozbiljnih kliničkih posledica, nameće se potreba za ranim lečenjem akutne infekcije. Rano lečenje ima za cilj ne samo prevenciju razvoja ozbiljnih kliničkih komplikacija kao što su ciroza jetre ili HCC već predstavlja i meru prevencije transmisije virusa (Wedemeyer i sar., 2004.). Devedestih godina prošlog veka nekoliko studija je pokazalo da primena interferona u akutnoj infekciji dovodi do virusološkog odgovora kod oko 90% lečenih (Omata i sar., 1991., Viladomiu i sar., 1992.).

IFN- α deluje na replikaciju HCV stimulišući transkripciju IFN-zavisnih gena koji kroz proces fosforilacije aktiviraju različite citoplazmatske proteine - ISGF. Nakon procesa fosforilacije proteini STAT 1 i STAT 2 ulaze u jedro ćelije gde se vezuju za interferon stimulisani genski faktor 3 (ISGF3). Smatra se da ISGF3 ima važnu ulogu u procesu transkripcije enzima 2,5 oligoadenilat-sintetaze. Ovaj enzim učestvuje u sintezi 2, 5 oligoadenilata koji katalizuje sintezu endonukleaza. Smatra se da upravo te sintetisane endonukleaze razaraju virusnu i-RNK (Marcello i sar., 2006., Thompson i sar., 2010.).

IFN- α ima imunomodulatorno i antiproliferativno dejstvo. Imunomodulatorno dejstvo se ispoljava kroz indukciju antigena klase I glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC) i aktivaciju makrofaga, NK ćelija i citotoksičnih T limfocita. Takođe učestvuje u složenoj interakciji sa citokinima i stimuliše produkciju T helper limfocira. Pored toga, IFN- α ispoljava i antiproliferativno dejstvo – smanjuje sintezu prokolagena III i hijaluronata te na taj način usporava proces fibroze. Čak i kod pacijenata koji ne postignu SVR tokom primene IFN terapije, proces fibroze i ciroze jetre je sporiji (Camma i sar., 2004.).

Međutim, zbog nepovoljnog farmakokinetikog i farmakodinamskog profila IFN- α , efikasnost ovog terapijskog režima je bila relativno ograničena (Kjaergard i sar., 2001.). Nakon uvođenja tehnologije pegilacije, u terapijsku primenu je ušao najpre pegilovani interferon - α 2b (PEG-IFN- α 2b), a potom i pegilovani interferon - α 2a (PEG-IFN- α 2a). Procesom pegilacije, tj. dodatkom polimera polietilen glikola (PEG) apsorpcija leka nakon subkutane (s.c) primene postala je ravnomernija, volumen distribucije i renalni klirens manji, a koncentracija u plazmi stabilnija. S obzirom da je aktivnost leka zavisna od njene koncentracije i porast efikasnosti terapije postao je veći (Zeuzem i sar., 2000., Heathcote i sar., 2000.).

U početku se IFN- α primenjivao kao monoterapija, a potom u kombinaciji sa ribavirinom. Ribavirin je sintetski analog nukleozida koji se 70-tih godina prošlog veka najpre koristio u lečenju infekcija izazvanih respiratornim sincicijalnim virusom, a početkom 90-tih uočeno je njegovo antivirusno dejstvo protiv flavivirusa. IFN- α je u početku primenjivan kao monoterapija u lečenju hroničnog C hepatitisa što je rezultiralo padom serumske aktivnosti transaminaza, ali ne i padom nivoa virusne replikacije u serumu. Međutim, u kombinaciji sa RBV uspešnost terapije postala je gotovo udvostručena. 1998. godine u Sjedinjenim Američkim Država za lečenje hroničnog C hepatitisa odobrena je primena ribavirina u kombinaciji sa IFN (McHutchison i sar., 1998., Davis i sar., 1998.). Tačan mehanizam delovanja RBV nije do kraja razjašnjen, ali je sigurno da inhibira replikaciju virusa (Feld i sar., 2005.).

U lečenju akutnog C hepatitisa je 2005. godine uveden pegilovani interferon α -2b (PEG-IFN α 2b). S obzirom na visok stepen SVR (94%) tokom 24 nedelje terapije uz dobro podnošenje leka od strane pacijenata danas je lečenje akutnog C hepatitisa zasnovano na monoterapiji PEG-IFN α tokom 24 nedelja odmah po njenom otkrivanju (Ghany i sar., 2011.).

Pod hroničnim C hepatitisom se smatra infekcija koja traje duže od 6 meseci i koja je praćena povišenom aktivnošću aminotransferaza u serumu (aktivnost

može da ima fluktuirajući tok), prisustvom HCV RNK u krvi i patohistološkim promenama u jetri karakterističnim za hronični hepatitis. Adekvatna antivirusna terapija hroničnog C hepatitisa ima za cilj eliminaciju virusa iz organizma, prevenciju razvoja komplikacija i letalnog ishoda što se postiže kroz SVR. Ustanovljeno je da 99% pacijenata koji postignu SVR ostaju HCV RNK negativni i 5 godina nakon terapije (Zeuzem i sar., 2009. Swain i sar., 2007., Manns i sar., 2008., European Association for the Study of the Liver , 2001.).

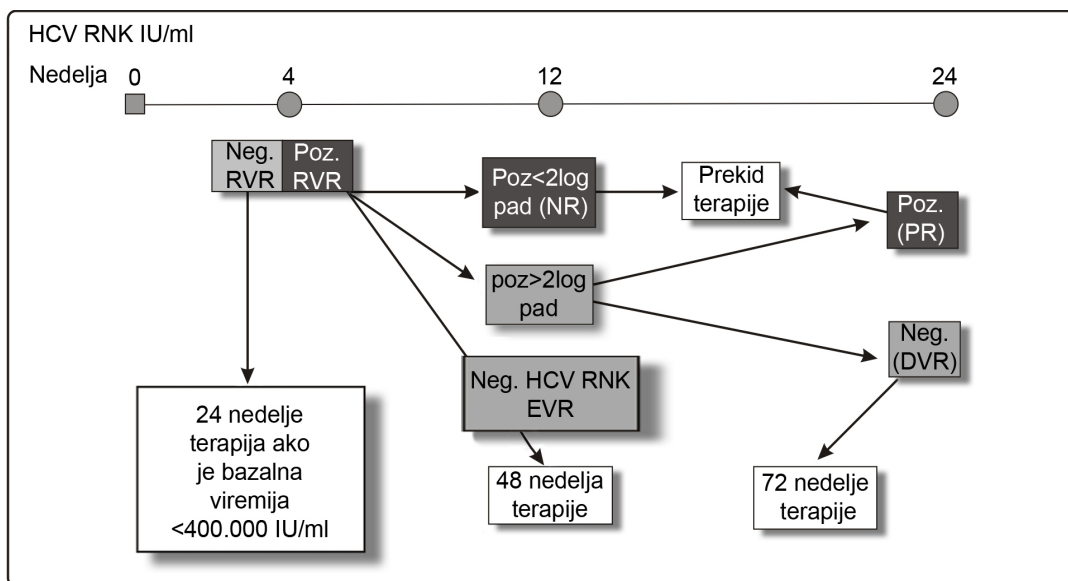
Danas standard u lečenju hroničnog C hepatitisa predstavlja primena kombinovane, dvojne terapije pegilovanim interferonom α (PEG - IFN) i ribavirinom (RBV) tokom 48 nedelja (genotip 1, 4, 5 i 6) odnosno 24 nedelje za genotipove 2 i 3. Doza PEG-IFN- α 2a je 180 μ g/nedeljno s.c. i PEG-IFN- α 2b 1.5 μ g/kg/nedeljno, dok se RBV pije svakodnevno, u dnevnoj dozi od 1000 ili 1200 mg zavisno od telesne težine, podeljen u dve doze (European Association for the Study of the Liver, 2011., Ghany i sar., 2011.).

Odgovor na terapiju definisan je SVR. Pacijenti koji postignu SVR nazivaju se responderi. Ukoliko pacijenti imaju detektabilnu HCV RNK na kraju terapije (eng. end of treatment, EOT) nazivaju se ne-responderi, za razliku od onih kod kojih je HCV RNK na kraju terapije nedetektabilna, ali imaju detektabilnu HCV RNK 24 nedelje po njenom završetku koji se nazivaju relapseri. EVR je definisan padom HCV RNK za najmanje 2 log₁₀ u odnosu na bazalnu vrednost. EVR može biti kompletan (eng. Complete early virological response, cEVR) kada se HCV RNK ne može detektovati u serumu ili parcijalan (eng. Partial early virological response, pEVR) kada je replikacija virusa u serumu i dalje prisutna, ali manja za 2 log₁₀ i više u poređenju sa bazalnom viremijom. Oni koji ne postignu EVR su null - responderi. Pacijenti koji postignu pEVR, uz nedektabilnu HCV RNK u 24. nedelji nazivaju se spori responderi. Kod tih pacijenata postoji odložen virusološki odgovor (eng. Delayed virological response) i kod njih treba razmotriti produženje terapije do 72. nedelje.

Aktuelni algoritam lečenja hroničnog C hepatitisa genotip 1 podrazumeva obustavljanje terapije u 12. nedelji ukoliko bolesnici ne postignu EVR, s obzirom da je verovatnoća da ovi pacijenti postignu SVR izuzetno niska, tj. negativna prediktivna vrednost (NPV) je oko 100% . Kod ovih pacijenata treba razmotriti lečenje trojnom terapijom, uz uvođenje inhibitora proteaze (PI) u kombinaciji sa PEG-IFN/RBV. Ukoliko je postignut pEVR, standardnu terapiju treba nastaviti do 48. nedelje uz kontrolu HCV RNK u 24. nedelji. Detektabilna HCV RNK u 24. nedelji indikacija je za prekid terapije, s obzirom da je NPV oko 98%. Kao i pacijenti

koji nisu postigli EVR i ovi pacijenti su kandidati za primenu trojne terapije.

Ukoliko pacijenti koji imaju nisku bazalnu viremiju (ispod 400.000 IU/ml) postignu RVR dužina lečenja može biti skraćena na 24. nedelje, a da se pri tome verovatnoća za postizanje SVR ne smanji značajno (slika 6) (Ferenci i sar., 2005., Bacon i sar., 2011., European Association for the Study of the Liver, 2011.).



Slika 9. Odgovorom vođena terapija. RVR – rapidni virusološki odgovor; EVR – rani virusološki odgovor; NR – null responders; DVR – odložen virusološki odgovor; PR – inhibitor proteaze. European Association for the Study of the Liver. *J of Hepatology* 2011.

2011. godine za terapiju hroničnog C hepatitisa genotip 1 odobrena je primena inhibitora proteaze (PI) – telaprevira i boceprevira u kombinaciji sa PEG-IFN/RBV. Primenjuju se u lečenju prethodno nelečenih pacijenata, ali i onih koji nisu odgovorili na standardnu dvojni terapiju – ne-responderi i relapseri. Odgovorom vođena terapija (eng. respons guided therapy, RGT) uz primenu PI i PEG-IFN/RBV povećala je procenat SVR u poređenju sa dvojnou terapijom (68% vs. 40% u grupi prethodno nelečenih pacijenata, i 66% vs. 21% u grupi ranije lečenih). Kroz RGT postoji mogućnost za kraće trajanja terapije (24 nedelje) kod pacijenata koji postignu RVR što je slučaj kod 50-66% lečenih (Bacon i sar., 2011., Poordad i sar., 2011.). Analizom bolesnika prethodno lečenih dvojnou terapijom, može se videti da je ishod trojne terapije bolji među relapserima nego parcijalnim responderima. Među null-responderima verovatnoća da postignu SVR trojnou terapijom iznosi 33% (European Association for the Study of the Liver, 2011., Ghany i sar., 2011.).

Primenom kombinovne, dvojne terapije PEG-IFN/RBV, kod pacijenata sa genotipom 1 SVR se postiže tek kod 40-50% lečenih (oko 80% za genotipove 2 i 3), što uz česte i mnogobrojne neželjene efekte lekova nameće potrebu za jasnim definisanjem prediktivnih faktora dobrog kliničkog i virusološkog odgovora na terapiju (Ge i sar., 2009.). Poznato je da su RVR i EVR, niska bazalna viremija (manje od 400.000 IU/ml), pripadnost beloj rasi, ženski pol, mlađe životno doba, odsustvo teške fibroze i insulinske rezistencije povoljni prediktori SVR. Međutim, iako pouzdani, RVR i EVR su dostupni tek u 4. odnosno 12. nedelji terapije (Davis i sar., 2003.). Osim toga, današnja istraživanja pokazuju mogućnost da je odgovor na terapiju određen ne samo faktorima od strane domaćina i virusološkim parametrima već da je i genski determinisan (Conjeevaram i sar., 2006., Ge i sar., 2009.).

HCV infekcija povećava nivo ISG ekspresije u hepatocitu. Iako zvuči paradoksalno, bazalno visok nivo ISG ekspresije je povezan sa lošijim odgovorom na dvojni terapiju u poređenju sa pacijentima koji su postigli SVR, a kod kojih je ekspresija ISG pre terapije bila niža. S druge strane, IFN- α uzrokuje brzu i snažnu ISG ekspresiju koja je znatno viša kod respondera nego kod non-respoder. To se može objasniti ili supresijom ISG u jetri ili već bazalno visokom ekspresijom ISG koja sprečava dalju efikasnu indukciju. Naime, IFN- α i IFN- λ 3 uglavnom deluju na iste ISG. Visoke vrednosti IFN- λ 3 mogle bi da smanje senzitivnost na IFN- α i time umanje efekat terapije. Ne treba zaboraviti da i sama HCV infekcija deluje na signalne mehanizme slabeći dejstvo IFN.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da genotipovi IL28B utiču na ekspresiju ISG, ali nije poznato kojim mehanizmom. Analizom podataka iz literature može se videti da su „povoljni” genotipovi povezani su sa nishodnom regulacijom ISG promotera, dok je ekspresija ISG supresora povišena. Smatra se da bazalno niska ekspresija ISG omogućava snažnu ekspresiju od strane IFN- α čime se objašnjava dobar odgovor na terapiju ovih pacijenata, ali ne i spontani klirens virusa iz organizma (Abe i sar., 2011., Honda i sar., 2010.). Dvojna terapija, PEG-IFN/RBV povećava serumski nivo IFN- λ 3 kod pacijenata sa “povoljnim” genotipom IL28B. Međutim, povezanost između nivoa IFN- λ 3 i SVR nije još objašnjena (Rallón i sar., 2012.)

Prema podacima iz literature se vidi da pacijenti sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 koji imaju CCr12979860 imaju dva puta veću šansu da postignu SVR nakon primenjene terapije (80%) u poređenju sa onima koji imaju CTr12979860 ili TTr12979860 (25-30%) bez obzira na njihovu etničku pripadnost. Frekvencija C alela je različita među različitim etničkim grupama što objašnjava bolji virusološki odgovor u zemljama Azije gde je frekvencija C alela veća u poređenju sa Afrikom

gde je frekvencija C alela najniža (64%) i virusološki odgovor na primenjenu terapiju lošiji. Prema do sada objavljenim istraživanjima i pacijenti sa CCrs12979860 koji ne postignu RVR imaju dva puta veću šansu da odgovore na terapiju u poređenju sa onima koji imaju CTrs12979860 ili TTrs12979860. Iako RVR ima veću pozitivnu prediktivnu vrednost (PPV) u poređenju sa ispitivanim polimorfizmom, RVR je dostupan tek u 4. nedelji terapije. Pozitivna prediktivna vrednost SNP CCrs12979860 za nastanak SVR se pokazala boljom u poređenju sa bazalnom viremijom, stadijumom hepatične fibroze i etničnom pripadnošću i iznosi oko 70% (Ge i sar., 2009, Suppiah i sar., 2011, Tanaka i sar., 2009). CCrs12979860 je u pozitivnoj korelaciji sa ranim padom nivoa virusne replikacije – u 2. nedelji terapiji pad bazalne viremije je za $2 - \log_{10}$ IU/ml veći u poređenju sa CTrs12979860 i TTrs12979860. Brži pad bazalne viremije korelira sa postizanjem RVR i EVR. Međutim, po postizanju EVR određivanje IL28B ima slabiju ulogu u predikciji SVR. Stepenn relapsa je manji među pripadnicima bele i crne rase koji imaju CCrs12979860 (Thompson i sar., 2010.). Takođe je i spontana eliminacija virusa iz organizma povezana sa “povoljnim” genotipom CCrs12979860 (Thomas i sar., 2009.).

Sve ovo ukazuje da određivanje IL28B genotipa za polimorfizam rs12979860 može da ima važnu ulogu u predikciji SVR naročito među pacijentima koji nemaju druge povoljne prognostičke pokazatelje (Thompson i sar., 2010, Ge i sar., 2009, Rauch i sar., 2010.).

Polimorfizam rs8099917 se nalazi oko 7.5 kbp uzvodno od startnog kodona IL28B. Najmanja frekvencija G alela (risk allele) je među pacijentima kod kojih je prisutan spontani klirens virusa iz organizma – 24%. Frekvencija je nešto veća među pacijentima sa hroničnom C virusnom infekcijom koji su odgovorili na dvojni terapiju – 32%, dok je među hronično obolelima koji nisu odgovorili na terapiju frekvencija G alela najveća - 58% (Rauch i sar., 2010.). Prisustvo G alela na poziciji rs8099917 povezano je sa nižom ekspresijom IFN- λ 3 (Suppiah i sar., 2009., Tanaka i sar., 2009.). Osobe koje su TT homozigoti imaju bolju prognozu u poređenju sa osobama koje imaju GT i GG genotipove. Naime, polimorfizam rs8099917 se smatra jakim prediktorom terapijom indukovane eliminacije HCV iz organizma (Suppiah i sar., 2009., Tanaka i sar., 2009., Rauch i sar., 2010.). Ako se analiziraju pojedinačni faktori koji utiču na tok i ishod terapije, aktivnost inflamacije je veća i stepenn fibroze jetre teži kod pacijenata koji su TTrs8099917. Iako je inflamatorna aktivnost u jetri ovih pacijenata veća, serumska aktivnost enzima jetre ALT, AST i gama-glutamilttransferaze (γ -GT) je niža što je u suprotnosti sa onim što bi se

očekivalo, ali po podacima iz literature niža serumaska aktivnost enzima jetre značajan je prediktor postizanja SVR kod ovih pacijenata (Abe i sar., 2011.). Značajno češća distribucija GGr8099917 u grupi onih koji ne postignu SVR može da pomogne u identifikaciji pacijenata koji verovatno neće odgovoriti na standardnu terapiju i karakteriše GG genotip kao značajan faktor u predikciji izostanka SVR (Abe i sar., 2011., Riva i sar., 2012.). U ranije sprovedenim istraživanjima polimorfizam rs8099917 se pokazao i kao dobar prediktor izostanka SVR kod pacijenata lečenih trojnom terapijom. Treba napomenuti da se radi o pacijentima koji su prethodno lečeni kombinovanom terapijom PEG-IFN/RBV, ali koji nisu postigli SVR ili su pak napravili relaps bolesti, što ukazuje na potrebu određivanja IL28B pre ponovne terapije, tj. pre započinjanja trojne terapije (Akuta i sar., 2010.).

Treći polimorfizam koji se pokazao značajnim u predikciji SVR je rs12980275. „Povoljnim“ se smatra AAr12980275, dok pacijenti koji su AGr12980275 ili GGr12980275 imaju manju šansu da postignu SVR. (Tanaka i sar., 2009., Fattovich i sar., 2011., Lagging i sar., 2011.).

S obzirom da je distribucija TTr8099917 slična među pacijentima koji postignu SVR i u grupi onih koji ne odgovore na terapiju, CCrs12979860 se smatra boljim prediktorom SVR u poređenju sa TTr8099917 (Riva i sar., 2012.).

Iako do sad sprovedena istraživanja govore o značajnoj povezanosti genskih polimorfizama IL28B (rs2979860 C/T, rs8099917 T/G, rs12980275 A/G) i toka i ishoda hroničnog C hepatitisa genotip 1 i 4, do sada objavljeni rezultati o korelaciji genskih varijacija IL28B i genotipa 2 i 3 virusa su dosta različiti. Dok jedna grupa autora smatra da je određivanje genskih polimorfizama IL28B značajno u predikciji SVR kod bolesnika sa hroničnim C hepatitisom genotip 2 i 3, naročito u grupi onih koji nisu postigli RVR (Mangia i sar., 2010.), po drugima ne postoji značajna povezanost između genskih polimorfizama i SVR kod pacijenata sa genotipom 2 i 3 virusa (Rallón i sar., 2010., Fattovich i sar., 2011., Jia i sar., 2012.).

Evropska i Američka asocijacija za ispitivanje bolesti jetre uvrstili su testiranje genskih polimorfizama IL28B u svoje vodiče za lečenje hroničnog C hepatitisa 2011. godine (European Association for the Study of the Liver, 2011, Ghany i sar., 2011.).

Iz svega navedenog se može reći da postoji potreba za određivanjem genskih IL28B polimorfizama kod pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1. Njihovim određivanjem mogli bi se izdvojiti pacijenti sa visokom verovatnoćom postizanja SVR primenom standardne, kombinovane terapije PEG-IFN/ RBV, kao i pacijenti kod kojih je uspeh standardne terapije malo verovatan. Na taj način mogla

bi se izbeći primena nepotrebne i skupe terapije koja sa sobom nosi rizik nastanka mnogobrojnih neželjenih efekata. Kod ove grupe pacijenata bi bilo potrebno razmotriti druge terapijske opcije i uvođenje inhibitora proteaze u terapiju.

Prema do sada sprovedenim istraživanjima kod pacijenata sa CCrs12979860 ne postoji značajna razlika u postizanju SVR u odnosu na primenjeni terapijski režim (dvojna vs. trojna terapija). Dakle, određivanjem IL28B statusa izbegla bi se eventualna primena inhibitora proteaze kod ovih pacijenata dok bi pacijenti sa TT genotipom mogli imati veću šansu za izlečenjem primenom trojne terapije. Poznavanjem IL28B statusa pacijenti bi mogli da dobiju važne podatke o prognozi bolesti, dužini trajanja lečenja i eventualnom kraćem trajanju lečenja kroz odgovorom vođenu terapiju što bi imalo pozitivne efekte na bezbednost primene terapije i povećalo toleranciju i komplikaciju pacijenata na terapijski tretman. Tako bi i cena terapije bila manja (Clark i sar., 2011., Jensen i sar., 2012.).



2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Planom istraživanja predviđeni su sledeći ciljevi:

- ▶ Ispitati zastupljenost genskih polimorfizama rs2979860, rs12980275 i rs 8099917 kod pacijenta sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 koji su lečeni kombinovanom terapijom pegilovanim interferonom α i ribavirinom tokom 48 nedelja.
- ▶ Analizirati uticaj polimorfizama IL28B i ostalih značajnih faktora na postizanje stabilnog virusološkog odgovora.
- ▶ Ispitati povezanost polimorfizama IL28B sa demografskim, biohemijskim, virusološkim faktorima i patohistološkim nalazom.
- ▶ Utvrditi da li je uticaj analiziranih polimorfizama na postizanje stabilnog virusološkog odgovora značajniji u poređenju sa uticajem drugih ispitivanih faktora.



3. MATERIJAL I METODOLOGIJA

Istraživanje predviđeno temom ove doktorske disertacije obavljeno je u periodu od 2011. do 2013. godine u:

- Kliničkom odeljenju za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničko - bolničkog Centra Zvezdara
- Klinici za infektivne i tropske bolesti, Kliničkog Centra Srbije
- Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Istraživanje je obuhvatilo 136 pacijenata sa dijagnozom hroničnog C hepatitisa genotip 1 koji su najpre ispitivani, a potom i lečeni na Kliničkom odeljenju za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Zvezdara i Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog Centra Srbije, od 2004. do 2013. godine. Pacijenti su lečeni po protokolu kombinovanom terapijom PEG-IFN α 2a ili α 2b i RBV 48 nedelja uz dodatnu evaluaciju još 24 nedelje, prema preporukama Evropske asocijacije za ispitivanje bolesti jetre. I Kliničko - bolnički Centar Zvezdara i Klinika za Infektivne i tropske bolesti su referentne ustanove za lečenje hroničnog C hepatitisa.

Dijagnoza hroničnog C hepatitisa se zasnivala na kliničkoj slici, laboratorijskim i virusološkim nalazima, a potvrđena je biopsijom jetre.

3.1 Kliničko ispitivanje pacijenata

Kliničko ispitivanje pacijenata je podrazumevalo:

- anamnezu i fizikalni pregled
- laboratorijske analize - standardni pregled krvne slike sa leukocitarnom formulom, biohemijske nalaze koje uključuju ispitivanje nekro-inflamatorne aktivnosti jetre (alanin-aminotrasferaza, aspartat-aminotrasferaza, γ -glutamilttransferaza) i holestaze (alkalna fosfataza) kao i ispitivanje sintetske funkcije jetre (serumski nivo albumina i protrombinsko vreme) i ekskretorne funkcije jetre (ukupni i direktni bilirubin), funkcije bubrega (urea, kreatinin), elektrolitnog statusa (natrijum, kalijum), lipidnog statusa (holesterol, trigliceridi) i glikemije
- imunološke analize – antinuklearna antitela (ANA), antiglatkomišićna At (AGMA), antimitohondrijalna At (AMA) i At na antigen jetre, bubrega i mišića (anti-LKM 1)
- tumor marker – alfa- feto protein (AFP)
- tireoidni status - T3, T4, TSH i antimikrozomalna At (antiTPO)
- serološke analize – antiHCV At, HBsAg i antiHIV At
- molekularne tehnike – HCV RNK (kvalitativno i kvantitativno) i genotipizacija virusa
- u pojedinačnim slučajevima određivani su ceruloplazmin i α 1 – antitripsin
- radiografski pregled pluća

- ehotomografski pregled abdomena i male karlice
- ezofagogastroduodenoskopija
- biopsija jetre

Pre započinjanja specifične terapije pacijenti su klinički, laboratorijski, virusološki i serološki ispitani na Kliničkom odeljenju za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Zvezdara i Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog Centra Srbije. Pacijenti sa prisutnom koinfekcijom hepatitis B virusom i HIV koinfekcijom nisu obuhvaćeni istraživanjem kao ni pacijenti sa alkoholnim oštećenjem jetre, autoimunim i metaboličkim bolestima jetre, bolesnici sa dekompenzovanom cirozom jetre i osobe mlađe od 18 godine. Istraživanjem nisu obuhvaćeni ni bolesnici sa teškim kardiovaskularnim bolestima, teškim oblicima depresije i hematološkim bolestima koje predstavljaju kontraindikaciju za primenu dvojne antivirusne terapije. Svi pacijenti obuhvaćeni istraživanjem primili su više od 80% planirane doze PEG-IFN i više od 60% planirane doze RBV. Ezofagogastroduodenoskopija urađena je svim pacijentima kako bi se isključilo postojanje varkoziteta jednjaka i želuca i portne hipertenzivne gastropatije kao indirektnih znakova portne hipertenzije. Ehosonografski pregled abdomena takođe je urađen svim pacijentima kako bi se otkrile eventualne fokalne lezije u jetri koje sa sobom nose rizik krvarenja tokom slepe biopsije jetre, ali i prisustvo ascitesa i drugih indirektnih pokazatelja portne hipertenzije (dilatirana v. portae i v. lienalis i splenomegalija).

Slepa biopsija jetre urađena je pacijentima kod kojih nisu postojale kontraindikacije za njeno izvođenje. Stadijum fibroze i inflamatorna aktivnost određivani su METAVIR scoring sistemom na Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Po METAVIR scoring sistemu (Poynard i sar., 1997.) postoje 4 stadijuma fibroze jetre:

- F0 – fibroza je odsutna
- F1 – laka fibroza
- F2 – umerena fibroza
- F3 – teška fibroza
- F4 – ciroza jetre

Po istom scoring sistemu inflamatorna aktivnost jetre može biti:

- 0 – odsutna
- 1 - minimalna
- 2 – umerena
- 3 - teška

Kod pacijenata kod kojih su postojale kontraindikacije za izvođenje biopsije jetre procena stadijuma fibroze vršila se transkutanom elastografijom (Fibroscan) u Kliničkom Centru Srbija (15 pacijenata).

3.2 Virusološke analize

Serumski HCV RNK određivan je molekularnim tehnikama (lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu, eng. Real-time PCR), kvalitativno i kvantitativno, u virusološkoj laboratoriji KC Srbije na aparatu Roche COBAS TaqMan HCV koji ima donji limit setljivosti 50 IU/ml. Replikacija virusa određivana je pre početka terapije, nakon 12. nedelje terapije (EVR), na kraju terapije (EOT) i 24. nedelje po njenom završetku (SVR). Genotipizacija virusa takođe je rađena u virusološkoj laboratoriji KC Srbije korišćenjem LINEAR ARRAY HCV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Švajcarska), koji prepoznaje genotipove 1-6 HCV.

3.3 Terapijski protokol i lečenje

Svi pacijenti su lečeni po standardnom protokolu kombinovanom, dvojnomo terapijom tokom 48 nedelja: PEG-IFN α 2a 180 μ g/nedeljno ili PEG-IFN α 2b 1.5 μ g/kg/nedeljno s.c. i RBV u dozi od 1000 ili 1200mg/dan, zavisno od telesne težine. Ukupna dnevna doza RBV podeljena je u dve doze. Efikasnost terapije i odgovor na terapiju procenjavani su kroz rani virusološki odgovor određivanjem serumskog nivoa HCV RNK u 12. nedelji terapiji. Pacijentima koji nisu postigli EVR (pad HCV RNK za $> 2 \log_{10}$ u odnosu na bazalnu vrednost) dalja terapija je obustavljena s obzirom da je verovatnoća da ovi pacijenti postignu SVR manja od 2%. S druge strane, pacijentima koji su postigli EVR terapija je nastavljena do 48 nedelje. Na EOT kontrolisan je serumski HCV RNK – HCV RNK >50 IU/ml na EOT identifikovala je pacijente kao ne-responderi. U cilju procene postizanja SVR 24 nedelje po završetku terapije svim pacijentima je određivan serumski nivo HCV RNK. HCV RNK ≤ 50 IU/ml 6 meseci po njenom završetku znači da su pacijenti postigli SVR – responderi. Međutim, pacijenti koji su postigli virusološki odgovor na kraju terapije, ali kod kojih je nakon 6 meseci HCV RNK u serumu bio > 50 IU/ml označeni su kao relapseri (Marcellin i sar., 2012.).

Bazalne vrednosti serumske HCV RNK smatrane su visokim ako je nivo virusne replikacije > 400.000 IU/ml (European Association for the Study of the Liver, 2011.).

3.4 Određivanje IL28B genotipova

Svim pacijentima je uzimano 5 ml periferne krvi za određivanje genskih polimorfizama. Za izolovanje ukupne DNK korišćen je komercijalni kit QIAamp DNA Blood mini kit (QIAGEN, Nemačka) po uputstvu proizvođača. U genomu su ispitivana 3 polimorfizma pojedinačnog nukleotida (eng. SNP – single nucleotide polymorphism) - rs12979860, rs12980275 i rs8099917 u blizini IL28B gena na hromozomu 19. Za ispitivanje polimorfizama korišćen je SSP-PCR (eng. Sequence specific primer - PCR) metod kojim se umnožavao kratak DNK region uzvodno ili nizvodno od polimorfizma sa alel-specifičnim prajmerima (Hori i sar., 2003.).

Amplifikacija je izvođena po sledećem protokolu:

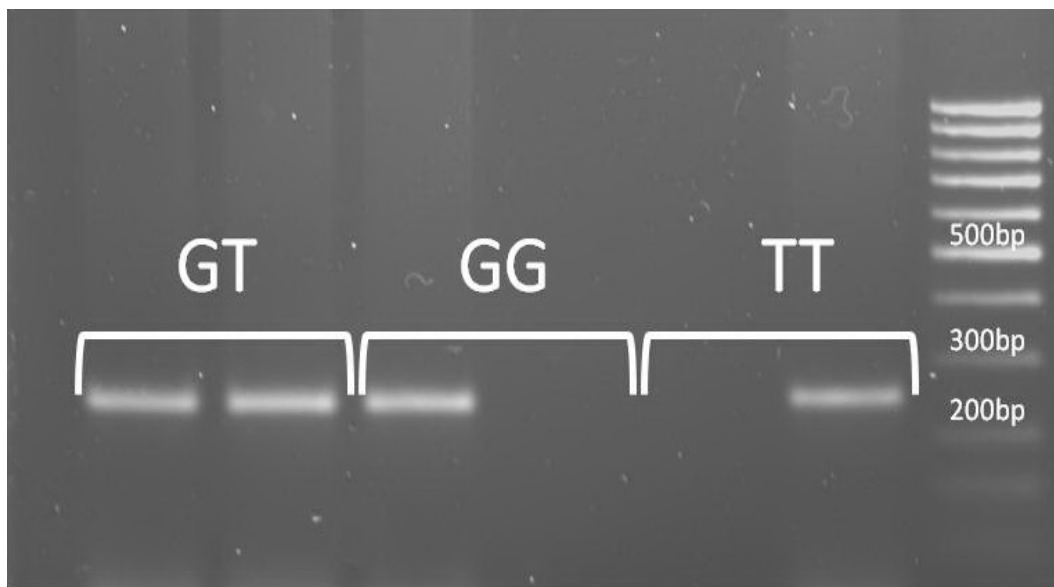
- Inicijalni ciklus na 95C – 5 minuta, zatim
- 35 ciklusa na 95C – 30s, 58C – 45s, 72C – 60s i
- 72C – 10 minuta.

Nukleotidne sekvence korišćenih prajmera i njihova veličina dati su u tabeli 2.

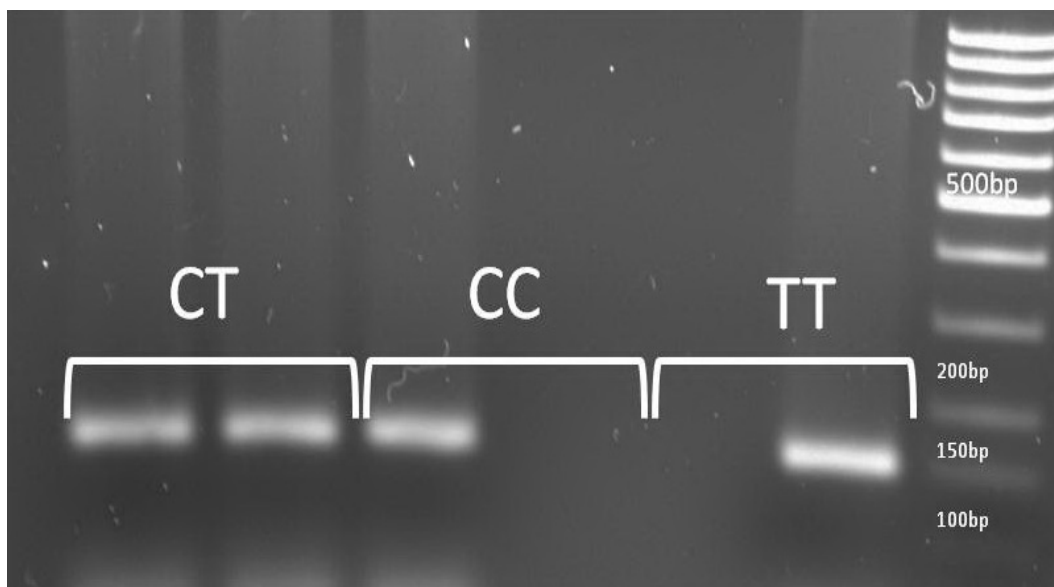
Tabela 2. Nukleotidne sekvence prajmera za genotipizaciju IL28B polimorfizama

IL28B SNP	nukleotidna sekvenca	Veličina PCR produkta
rs8099917	Gen (sense) 5'- CCCACTTCTGGAACAAATCG -3' G (antisense) 5'- CATGGTTCCAATTTGGGTGA C-3' T (antisense) 5'- CATGGTTCCAATTTGGGTGA A-3'	249 bp
rs12979860	Gen (sense) 5' -TTATCGCATACGG CTAGGC- 3' C (antisense) 5' -TGCAATTCAACCCTGGTTC G-3' T (antisense) 5' -TGCAATTCAACCCTGGTTC A-3'	153 bp
rs12980275	Gen (antisense) 5'- ATGATCATAGCTCATTGCAGC -3' A (sense) 5'- A GAAGTCAAATTCCTAGAAAC A-3' G (sense) 5'- A GAAGTCAAATTCCTAGAAAC G-3'	393 bp

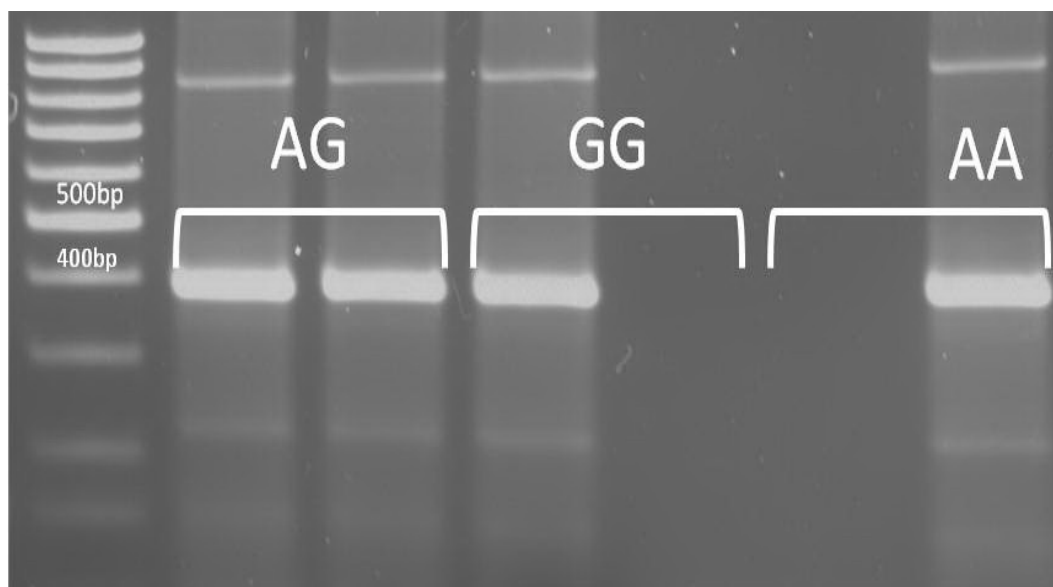
PCR produkti analizirani su u 2% agaroznom gelu uz bojenje etidium bromidom. Određivanje genotipova pojedinačnih polimorfizama vršeno je na osnovu prisustva odnosno odsustva amplifikovanih target sekvenci (slika 10, 11 i 12).



Slika 10. Polimorfizam rs8099917 – određivanje genotipova (veličina PCR produkta 249bp)



Slika 11. Polimorfizam rs12979860 - određivanje genotipova (veličina PCR produkta 153bp)



Slika 12. Polimorfizam *rs12980275* – određivanje genotipova (veličina PCR produkta 393bp)

Genske analize su rađene u virusološkoj laboratoriji Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Pre započinjanja istraživanja svi pacijenti su potpisali informisani pristanak za učešće u studiji, a zatim se pristupilo izvođenju planiranih procedura.

3.5 Statistička analiza

U cilju statističke analize dobijenih rezultata primenjene su sledeće statističke metode:

- metode deskriptivne statistike - za parametarske varijable aritmetička sredina i standardna devijacija ili medijana, odnosno frekvence i procenti za neparametarska obeležja;
- studentov T- test ili Mann – Whitney test za testiranje razlike između aritmetičkih sredina parametarskih varijabli;
- Fišerov test i χ^2 test - za utvrđivanje razlike u frekvenci i distribuciji različitih alela i genotipova u ispitivanim grupama;
- Spearman-ov test korelacije ranga – za ispitivanje povezanosti ispitivanih varijabli;
- logistička regresiona analiza (univarijantna i multivarijantna) - da bi se odredilo koji od ispitivanih faktora – godine života, pol, dužina trajanja infekcije, stepen virusne replikacije, stadijum fibroze jetre, BMI, rani virusološki odgovor

i polimorfizmi ima najveći uticaj na postizanje SVR; sve logističke korelacije između ispitivanih varijabli i SVR su najpre rađene univarijantnom analizom, a potom su svi parametri zajedno korišćeni za konstruisanje modela multivarijantne logističke regresije da bi se izvojili parametri koji sa najvećom značajnošću utiču na predikciju SVR;

- za ispitivane varijablu izračunata je senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost u odnosu na SVR korišćenjem standardnih definicija i statističkih formula.

Svaki ispitivani genski polimorfizam je pojedinačno korelisan sa ishodom terapije, odnosno postignutim stabilnim virusološkim odgovorom, kao i sva tri polimorfizma zajedno, kako bismo utvrdili koja kombinacija genotipova ima najveći značaj u predikciji SVR.

Sve statističke analize su testirane za verovatnoću veću od 95 % ($p < 0.05$).

Za statističku obradu korišćena je podrška softvera SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY, USA).

Izračunavanjem frekvence alela i distribucije genotipova procenjivano je da li se ispitivani polimorfizmi nalaze u Hardy-Weinberg-ovom ekvilibrijumu (HWE) za verovatnoću $p > 0.05$. (Rodriguez sar., 2009.) Za određivanje HWE korišćen je online calculator (OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies). Takođe je ispitivano da li postoji istovremeno nasleđivanje analiziranih polimorfizama (eng. linkage disequilibrium – LD). Za izračunavanje LD takođe je korišćen online calculator (OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies). Ispitivani polimorfizmi se nalaze u jakom LD ako je vrednost D' blizu 1 što znači da postoji njihovo istovremeno nasleđivanje.

Dobijeni rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.



4. REZULTATI

Istraživanje je obuhvatilo 136 pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 koji su lečeni po protoklu PEG-IFN/RBV tokom 48 nedelja uz praćenje od 24 nedelje. Stabilan virusološki odgovor postiglo je 80 (58.8%) pacijenata, dok SVR nije postiglo 56 (41.2%) pacijenta. Pacijenti koji su napravili relaps bolesti (21 pacijent, 15.4%) dodati su grupi koja nije odgovorila na primenjenu terapiju tj. ne-responderima. Relapsi nisu prikazani kao posebna podgrupa s obzirom da su u statističkim analizama imali iste korelacije kao i ne-responderi.

4.1 Ispitivanje razlike između respondera i ne-respondera

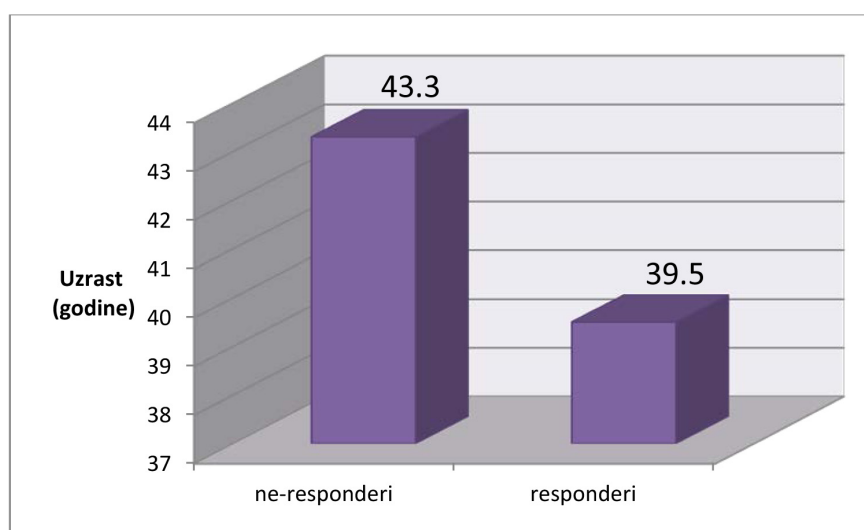
Prosečna starost ispitivanih pacijenata iznosila je 41.9±11.6 godina, najmlađi pacijent je imao 22, a najstariji 65 godina. U tabeli 3. prikazane su demografske, biohemijske, virusološke i patohistološke karakteristike ispitivanih pacijenata i statistički značajne razlike između respondera i ne-respondera.

Tabela 3. Demografske, biohemijske, virusološke i patohistološke karakteristike ispitivanih pacijenata

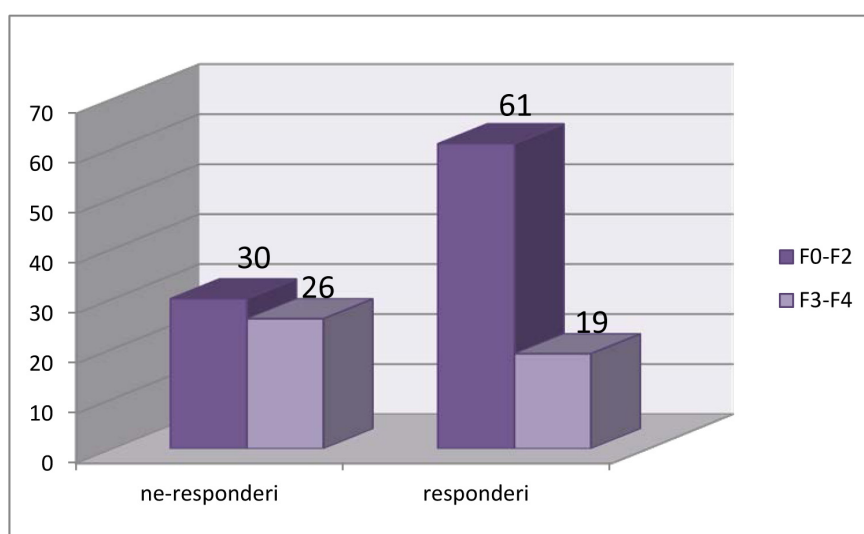
	Ukupno pacijenata n=136	Ne-responderi n=56 (41.2%)	responderi n=80(58.8%)	P
Pol muški/ženski (n,%)	72(52.9)/64(47.1)	27(48.2)/29(51.8)	45(56.2)/35(43.8)	NS
Starost, godine ($\bar{x} \pm SD$)	41.9±11.6	45.3±12.4	39.5±10.5	0.004
AST, IU L ⁻¹ (mediana, IQR)	51 (30)	51 (43)	50 (25)	NS
ALT, IU L ⁻¹ (mediana, IQR)	73 (54)	68.5(59)	77.5(52)	NS
BMI, kg m ² ⁻¹ ($\bar{x} \pm SD$)	26±4	26.3±3.5	25.1±4.4	NS
HCV RNK nivo, IU mL ⁻¹ (mediana, IQR)	988628 (2193628)	1221111 (1982253)	821500 (2473305)	NS
HCV RNK nivo, log IU mL ⁻¹ (mediana,IQR)	5.9(0.8)	6.1 (0.6)	5.9 (0.9)	NS
HCV RNK nivo ≥400 000 IU mL ⁻¹ (n,%)	97(71.3)	43(76.8)	54(67.5)	NS
Histološka aktivnost (n, %)				
0-1	99 (72.8)	34(60.7)	65(75)	0.000
2-3	22 (16.2)	17(39.3)	5(25)	
Stadijum fibroze (n, %)				
F0-F2	91 (66.9)	30(53.6)	61 (76.3)	0.006
F3-F4	45 (33.1)	26(46.4)	19(23.7)	
Dužina trajanja infekcije, godine (mediana, IQR)	5(7)	5 (8)	3.5 (7)	NS

AST - aspartat aminottransferaza, ALT- alanin aminottransferaza, BMI – body mass index, SD - standardna devijacija, IQR-interkvartilni opseg, NS – nema statističke značajnosti >0.05

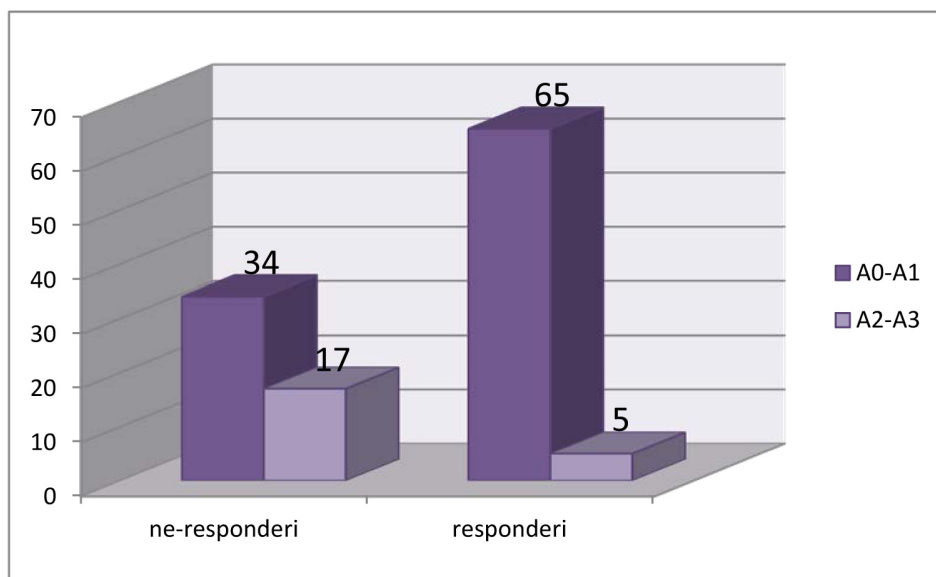
Metodama analitičke statistike su testirane razlike između dve grupe ispitanika u odnosu na njihove demografske, biohemijske, virusološke i patohistološke karakteristike. Mlađe životno doba, niži stadijum fibroze jetre (F0-F2) i naročito niži stepen nekroinflamatorne aktivnosti (A0-A1) bili su povezani sa povoljnim ishodom na terapiju (uzrast: $t=2.92$, $p=0.004$, $p<0.05$, slika 13. ; stadijum fibroze: $\chi^2=7.65$, $p=0.005$, $p<0.05$, slika 14.; nekroinflamatorna aktivnost: $\chi^2=13.60$, $p=0.000$, $p<0.05$, slika 15.). Između ove dve grupe ispitanika nije bilo značajne razlike u nivou bazalne viremije kao ni u odnosu na biohemijske analize (AST, ALT), BMI i dužinu trajanja infekcije.



Slika 13. Razlika u starosnoj strukturi između pacijenata koji su odgovorili na terapiju i onih koji nisu. $t=2.92$, $p=0.004$, $p<0.05$.



Slika 14. Razlika u stadijumu fibroze jetre između pacijenata koji su postigli SVR i onih koji nisu. $\chi^2=7.65$, $p=0.006$, $p<0.05$.



Slika 15. Razlika u nekroinflamatornoj aktivnosti jetre između dve grupe ispitanika – pacijenata koji su postigli SVR i onih koji nisu. $\chi^2=13.60$, $p=0.000$, $p<0.05$.

4.2 Određivanje IL28B genotipova i njihova distribucija

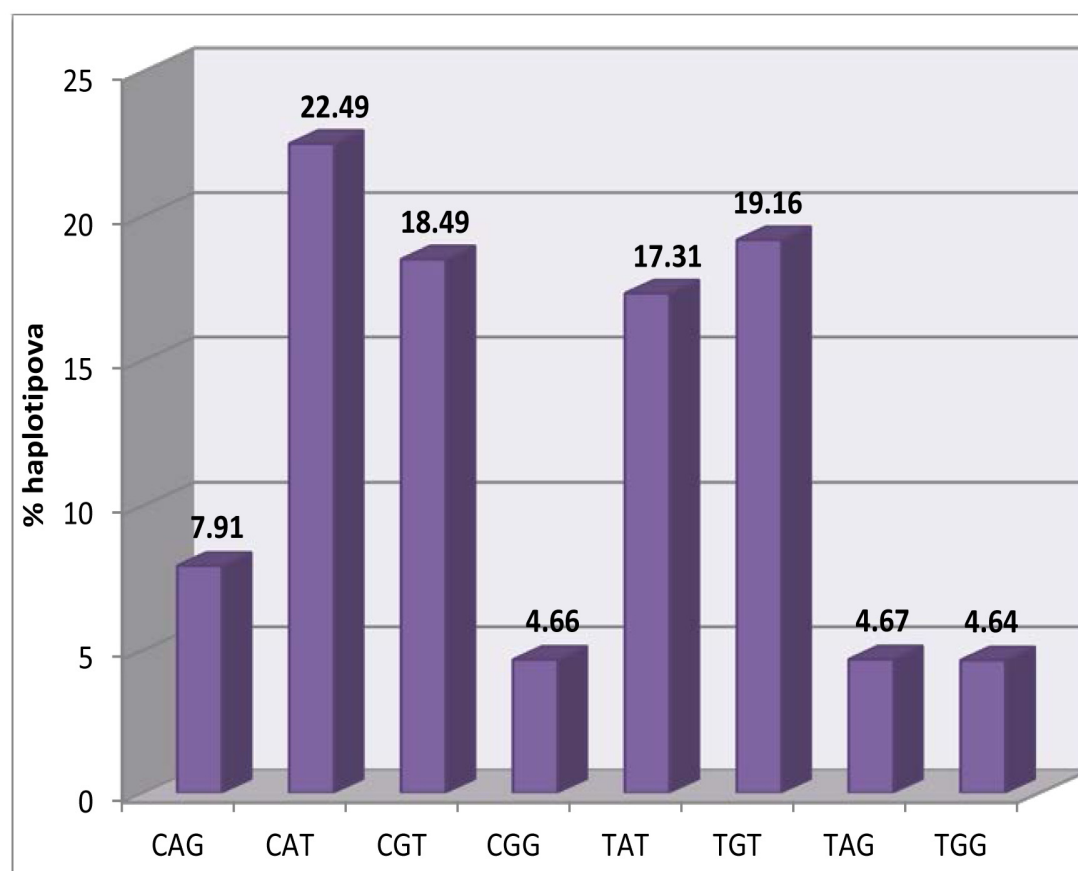
Distribucija IL28B genotipova sva tri ispitivana polimorfizma je u skladu sa Hardy-Weinberg-ovim ekvilibrijumom (tabela 4.).

Tabela 4. Distribucija IL28B genotipova ispitivanih polimorfizama i Hardy-Weinberg equilibrium

IL28B polimorfizam	genotip (%)	χ^2	P
rs8099917	TT(63.2)	3.09	0.07
	GT(28.7)		
	GG(8.1)		
rs12979860	CC(24.3)	3.33	0.06
	CT(58.8)		
	TT(16.9)		
rs12980275	AA(23.5)	2.72	0.09
	AG(58.1)		
	GG(18.4)		

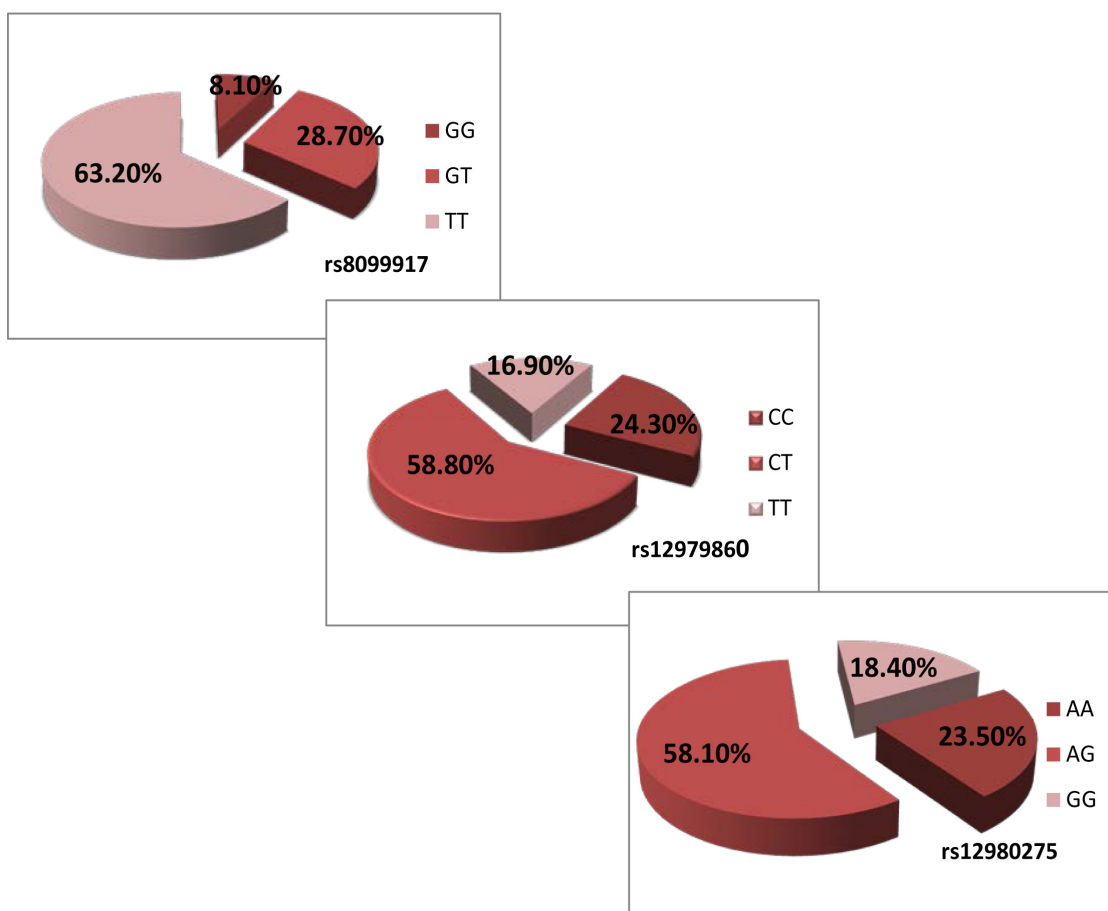
Prisutno je svih 8 haplotipova, s tim što najveću frekvencu ima haplotip C/A/T 22.49%, a potom T/G/T 19.16% i C/G/T 18.48% (slika 16).

Između analiziranih polimorfizama ispitivan je LD, odnosno verovatnoća njihovog zajedničkog nasleđivanja. U ovom istraživanju LD između ispitivanih polimorfizama je dosta slab (rs12979860/rs12980275 $D'=0.381$, $r^2=0.139$; rs12979860/rs8099917 $D'=0.133$, $r^2=0.004$; rs12980275/rs8099917 $D'=0.151$, $r^2=0.006$).



Slika 16. Frekvencija haplotipova

Analizom distribucije IL28B genotipova ispitivanih polimorfizama rs8099917, rs12979860 i rs12980275 vidi se da najveću prevalencu ima homozigot TTrs8099917 (63.2%), odnosno heterozigoti CTrs12979860 (58.8%) i AGrs12980275 (58.1%) (slika 17).



Slika 17. Distribucija IL28B genotipova rs8099917, rs12979860 i rs12980275

Statističkim analizama CCrs12979860 i AA rs12980275 su izdvojeni kao povoljni genotipovi za ishod terapije (CCrs12979860: $\chi^2=9.51$, $p=0.002$, $p<0.05$; AArs12980275: $\chi^2=4.52$, $p=0.03$, $p<0.05$) dok se TTrs8099917 nalazi na granici statističke značajnosti ($\chi^2=3.82$, $p=0.05$). Ako se pogleda SNP rs8099917 može se videti da genotip GG ima daleku veću prevalencu u grupi ne-respondera u poređenju sa responderima što mu daje značajnu ulogu kao negativnom prediktoru u odnosu na ishod terapije ($\chi^2=4.91$, $p=0.03$, $p<0.05$). Slična situacija

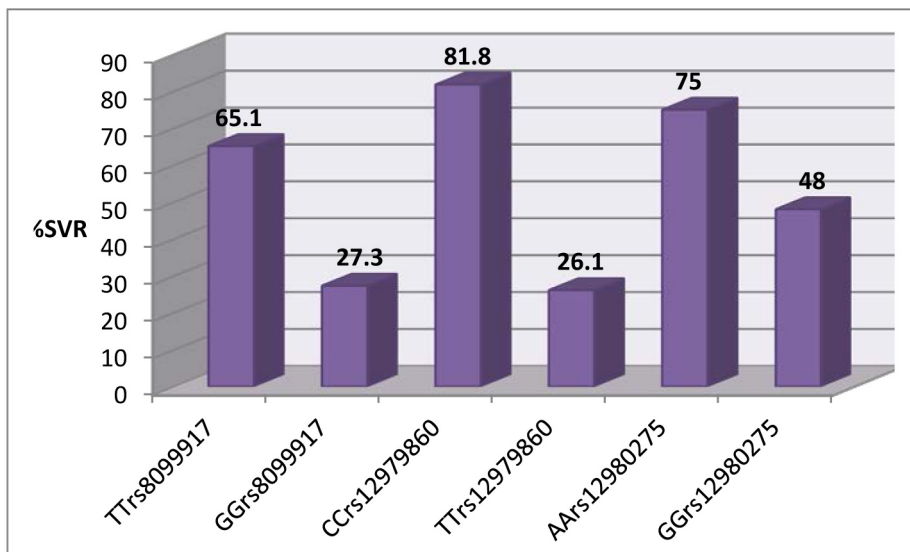
bila je i sa TT genotipom rs12979860. Njegova prevalenca bila je značajno viša u grupi onih koji nisu postigli SVR te se i on kao i GGrs8099917 može smatrati negativnim prediktorom odgovora na primenjenu terapiju ($\chi^2=12.25$, $p=0.000$, $p<0.05$) (tabela 5.).

Tabela 5. Distribucija IL28B genotipova ispitivanih polimorfizama i razlika između ne-respondera i respondera

IL28B polimorfizam	Ukupno	Ne-responderi	responderi	P
	n=136	n=56 (41.2%)	n=80 (58.8%)	
rs8099917 (n,%)				
GG	11(8.1)	8(14.3)	3(3.8)	0.03
GT	39(28.7)	18(32.1)	21(26.2)	NS
TT	86(63.2)	30(53.6)	56(70.0)	0.05
rs12979860 (n,%)				
CC	33(24.3)	6(10.7)	27(33.7)	0.002
CT	80(58.8)	33(58.9)	47(58.8)	NS
TT	23(16.9)	17(30.4)	6(7.5)	0.000
rs12980275 (n,%)				
AA	32(23.5)	8(14.3)	24(30.0)	0.03
AG	79(58.1)	35(62.5)	44(55.0)	NS
GG	25(18.4)	13(23.2)	12(15.0)	NS

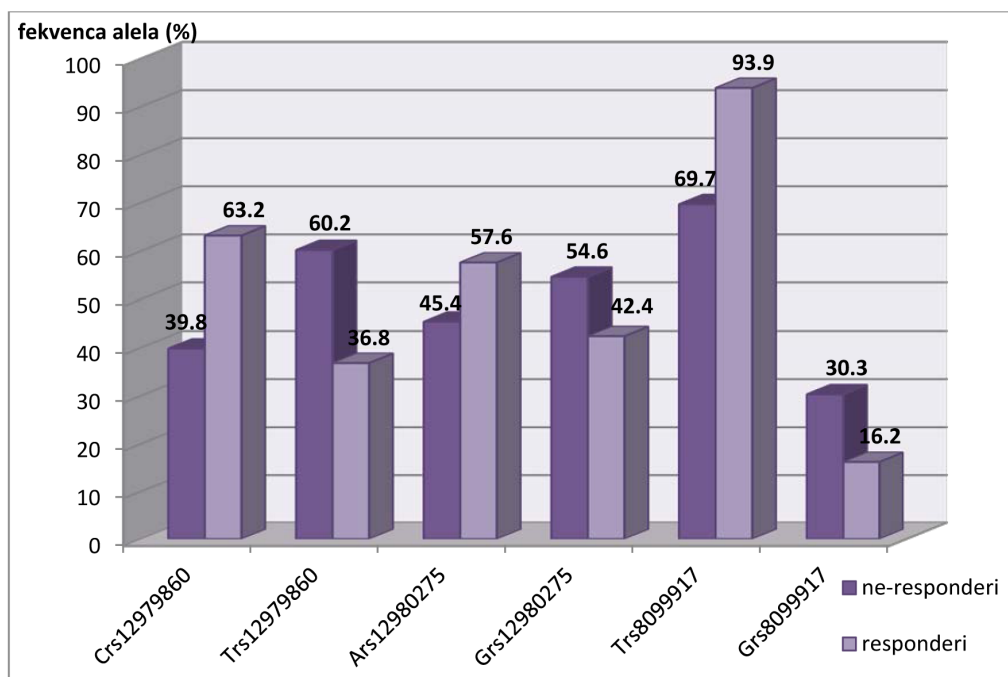
Slika 18. pokazuje razliku u ishodu terapije u odnosu na prisustvo povoljnih, odnosno nepovoljnih genotipova ispitivanih polimorfizama. Jasno se vidi da CCrs12979860 ima 3 puta veću šansu da postigne stabilan virusološki odgovor u poređenju sa TTrs12979860 (81.8% vs. 26.1%). Slično je i sa AArs12980275. Pacijenti sa AArs12980275 imaju 1.5 puta veću šansu da odgovore na terapiju u poređenju sa onima koji imaju GGrs12980275 – 75% vs. 48.0%. Analizom SNP rs8099917, može se videti da je procenat SVR kod pacijenata sa TT genotipom 65.1%, dok je kod onih sa genotipom GG % SVR 2.3 puta manji – 65.1% vs. 27.3%.

Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom



Slika 18. Procenat (%) SVR u odnosu na povoljne i nepovoljne genotipove ispitivanih polimorfizama

Frekvencija C alela polimorfizam rs12979860 iznosila je 54.1% i bila je viša u grupi pacijenata koji su postigli SVR u poređenju sa grupom pacijenata koja nije odgovorila na terapiju (63.2% vs. 39.8%). Analizom polimorfizma rs12980275, može se videti da je frekvencija A alela 52.5% i viša je u grupi respondera u poređenju sa ne-responderima (57.6% vs. 45.4%) dok je na mestu polimorfizma rs8099917 dominantan T alel sa ukupnom frekvencom od 77.8%. Među bolesnicima koji su imali povoljan terapijski ishod njegova zastupljenost je bila viša nego među onima koji nisu odgovorili na primenjenu terapiju (83.8% vs. 69.7%) (slika 19).



Slika 19. Frekvencija alela ispitivanih polimorfizama u odnosu na ishod terapije

4.3 Ispitivanje međusobne povezanosti prediktivnih faktora stabilnog virusološkog odgovora

Ispitivano je postojanje međusobne povezanosti prediktivnih faktora SVR. Svaki od demografskih, biohemijskih i histoloških parametara, kao i nivo bazalne viremije upoređivani su međusobno, ali i u odnosu na ispitivane polimorfizme - pojedinačne i njihove kombinacije.

Ispitivanjem povezanosti između stepena težine patohistološkog oštećenja jetre – nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze jetre, i genotipova IL28B otkrivena je povezanost između težine fibroze jetre i prisustva nepovoljnog genotipa GGr8099917, tj. lakšem stadijumu fibroze odgovaralo je prisustvo GGr8099917 premda se ta povezanost nalazi na granici statističke značajnosti ($\rho = -0.15$, $p = 0.07$). Kao što je i očekivano viša serumska aktivnost AST povezana je sa većim stepenom nekroinflamatorne aktivnosti jetre ($\rho = 0.26$, $p = 0.003$, $p < 0.05$), dok je teži stadijum fibroze u pozitivnoj korelaciji sa dužinom trajanje infekcije ($\rho = 0.26$, $p = 0.008$, $p < 0.05$).

Serumska aktivnost AST je u negativnoj korelaciji sa prisustvom TTr8099917 – niža serumska aktivnost AST povezana je sa postojanjem povoljnog TTr8099917 genotipa, s tim što se ta povezanost nalazi na granici statističke značajnosti ($\rho = -0.17$, $p = 0.05$).

Negativna povezanost je prisutna i između nivoa bazalne viremije i nepovoljnog genotipa GGr8099917 – niža bazalna viremija povezana je sa prisustvom nepovoljnog genotipa ($\rho = -0.23$, $p = 0.007$, $p < 0.05$).

Nije utvrđeno prisustvo statistički značajne povezanosti između genotipova ostalih ispitivanih polimorfizama i nivoa bazalne viremije, kao ni između ispitivanih polimorfizama i dužine trajanja infekcije i patohistoloških parametara.

4.4 Prediktivna vrednost ispitivanih parametara u odnosu na SVR

Godine pacijenata, patohistološke karakteristike, pojedinačni polimorfizmi i njihove međusobne kombinacije su analizirane univarijantnim i multivarijantnim logističkim modelom radi procene njihovog značaja u predikciji SVR. Ovim modelom obuhvaćeni su sledeći parametri: starost pacijenata, histološka aktivnost nekroze i inflamacije, stadijum fibroze jetre i pojedinačni polimorfizmi: CCr12979860, TTr12979860, AAr12980275, GGr8099917 i TTr8099917 kao i njihove kombinacije, takozvani IL28B profili:

- **non- rs8099917GG i rs12980275AA i non-rs12979860TT**
- **rs8099917TT ili rs12980275AA ili rs12979860CC**

Na osnovu univarijantne logističke regresione analize dolazi se do sledećih rezultata (tabela 6):

- starosna dob pacijenta je statistički značajan prediktivni faktor ishoda primenjene terapije (RR 0.96; 95% CI 0.93-0.99, p=0.005, p<0.05);

- patohistološki parametri su statistički pouzdani prediktori SVR: nekroinflamatorna aktivnost pokazuje visoko značajnu povezanost sa SVR (RR 0.15; 95% CI, 0.52-0.45, p=0.001, p<0.05), kao i stadijum fibroze (RR 0.36, 95% CI 0.17-0.75, p=0.006, p<0.05);

- rs12979860CC (RR 4.24; 95% CI 1.62-11.15, p=0.003, p<0.05) i rs12980275AA (RR 2.57; 95% CI 1.06-6.25, p=0.037, p<0.05) su statistički pouzdani prognostički faktori odgovora na terapiju, dok se rs8099917TT (RR 2.02; 95% CI 0.99-4.11, p=0.05) nalazi na granici statistički značajnosti;

- s druge strane, rs12979860TT (RR 0.19; 95% CI 0.07-0.51, p=0.001, p<0.05) i rs8099917GG (RR 0.23; 95% CI 0.06-0.92, p=0.038, p<0.05) takođe pokazuju značajnu statističku povezanost sa ishodom terapije, naročito rs12979860TT koji ima visoku statističku značajnost u odnosu na SVR, ali i rs12979860TT i rs8099917GG su negativni prediktori odgovora na terapiju;

- kombinacije ispitivanih polimorfizama, tj. IL28B profili: **a) non - rs8099917GG i rs12980275 AA i non - rs12979860TT** i **b) rs8099917TT ili rs12980275AA ili rs12979860CC** imaju značajnu ulogu u predikciji SVR naročito profili **rs8099917TT ili rs12980275AA ili rs12979860CC** koji su pokazali visoku statističku značajnost u predikciji odgovora na terapiju (RR 4.53; 95% CI 1.93-10.6, p=0.001, p<0.05), dok je statistička značajnost profila **non - rs8099917GG i rs12980275AA i non-rs12979860TT** nešto niža, ali i dalje statistički značajna (RR 3.4; 95% CI 1.19-9.70, p=0.02, p<0.05).

IL28B profili **non - rs8099917GG i rs12980275AA i non - rs12979860TT** predstavljaju kombinaciju povoljnog rs12980275AA genotipa, uz potpuno odsustvo nepovoljnih genotipova rs8099917GG i rs8099917TT, i prisutvo makar jednog C alela na poziciji rs12979860 i barem jednog T alela na poziciji rs8099917. Njihova prevalenca u ispitivanoj populaciji je 18.4%. Takvih kombinacija ima 4:

- rs12979860 CC i rs12980275 AA i rs8099917 TT;
- rs12979860 CC i rs12980275 AA i rs8099917 TG;
- rs12979860 CT i rs12980275 AA i rs8099917 TT;
- rs12979860 CT i rs12980275 AA i rs8099917 TG;

Prisustvo jednog C alela na poziciji rs12979860 i jednog T alela na poziciji rs8099917 zajedno sa rs12980275AA ukazuje na značajnu prediktivnu vrednost

ovih alela. Od navedenih kombinacija IL28B profila **non - rs8099917GG** i **rs12980275AA** i **non-rs12979860TT** najzastupljenija je kombinacija rs8099917TT i rs12980275AA i rs12979860CC koja je prisutna kod 10 pacijenata (7.4%).

Analizom IL28B profila **rs8099917TT** ili **rs12980275AA** ili **rs12979860CC** vidi se da predstavlja kombinaciju makar jednog povoljnog genotipa ispitivanih polimorfizama. Prevalenca ovih profila u ospotivanoj grupi pacijenata iznosi 76.5%. Među bolesnicima koji su postigli SVR 87.5% je imalo neki od ovih profila. Prisustvo makar jednog povoljnog genotipa ispitivanih polimorfizama značajan je prediktor SVR.

Takvih kombinacija ima u ovom istraživanju ima 16:

- rs12979860 CC ili rs12980275 AA ili rs8099917 GG;
- rs12979860 CC ili rs12980275 AG ili rs8099917 GG;
- rs12979860 CC ili rs12980275 AA ili rs8099917 GT;
- rs12979860 CC ili rs12980275 AA ili rs8099917 TT;
- rs12979860 CC ili rs12980275 AG ili rs8099917 GT;
- rs12979860 CT ili rs12980275 AG ili rs8099917 TT;
- rs12979860 CT ili rs12980275 GG ili rs8099917 GT;
- rs12979860 CC ili rs12980275 GG ili rs8099917 TT;
- rs12979860 CT ili rs12980275 AA ili rs8099917 GG;
- rs12979860 CT ili rs12980275 AA ili rs8099917 TT;
- rs12979860 CT ili rs12980275 AA ili rs8099917 GT;
- rs12979860 CT ili rs12980275 AG ili rs8099917 TT;
- rs12979860 CT ili rs12980275 GG ili rs8099917 TT;
- rs12979860 TT ili rs12980275 AA ili rs8099917 TT;
- rs12979860 TT ili rs12980275 AG ili rs8099917 TT;
- rs12979860 TT ili rs12980275 GG ili rs8099917 TT.

Od svih navedenih kombinacija genotipova ispitivanih polimorfizama najveću prevalencu ima IL28B profil **rs12979860CT** ili **rs12980275AG** ili **rs8099917TT** - 35 pacijenata odnosno 25.7% što se moglo i očekivati, jer analizom distribucije genotipova unutar pojedinačnog polimorfizma se vidi da su frekvence genotipova pojedinačnih polimorfizama rs12979860CT, rs12980275AG i rs8099917TT veće u poređenju sa frekvencama drugih genotipova.

U multivarijantnom logističkom regresionom modelu za predikciju SVR analizirani su oni prognostički faktori za koje je statistička značajnost u univarijantnoj analizi bila manja od 0.05. Međutim, iako su pojedinačni polimorfizmi rs12979860CC, rs12979860TT, rs12980275AA, rs8099917GG i rs12979860TT u univarijantnoj analizi pokazali statističku značajnost manju od 0.05 oni nisu

Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom

uključeni u multivarijanti model jer su sadržani u IL28B profilima i na taj način analizirani u multivarijantnom modelu.

Multivarijantni logistički regresioni model je pokazao da najveću statističku značajnost u predikciji SVR imaju:

- IL28B profili: **rs8099917TT** ili **rs12980275AA** ili rs12979860CC – RR 6.75; 95% CI 2.42-18.78, p=0.000, p<0.05;
- Histološka aktivnost – RR 0.19; 95% CI 0.06-0.62, p=0.006, p<0.05;
- Starosna dob pacijenta – RR 0.95; 95% CI 0.92-0.99, p=0.02, p<0.05.

U multivarijantnom logističkom regresionom modelu prisustvo makar jednog povoljnog genotipa ispitivanih polimorfizama se pokazao kao nezavisni prediktor SVR. Statističku značajnost imaju i histološka aktivnost i mlađe životno doba, ali je ona slabija u poređenju sa ispitivanim IL28B profilima (tabela 6).

Tabela 6. Logistička regresiona analiza faktora povezanih sa SVR

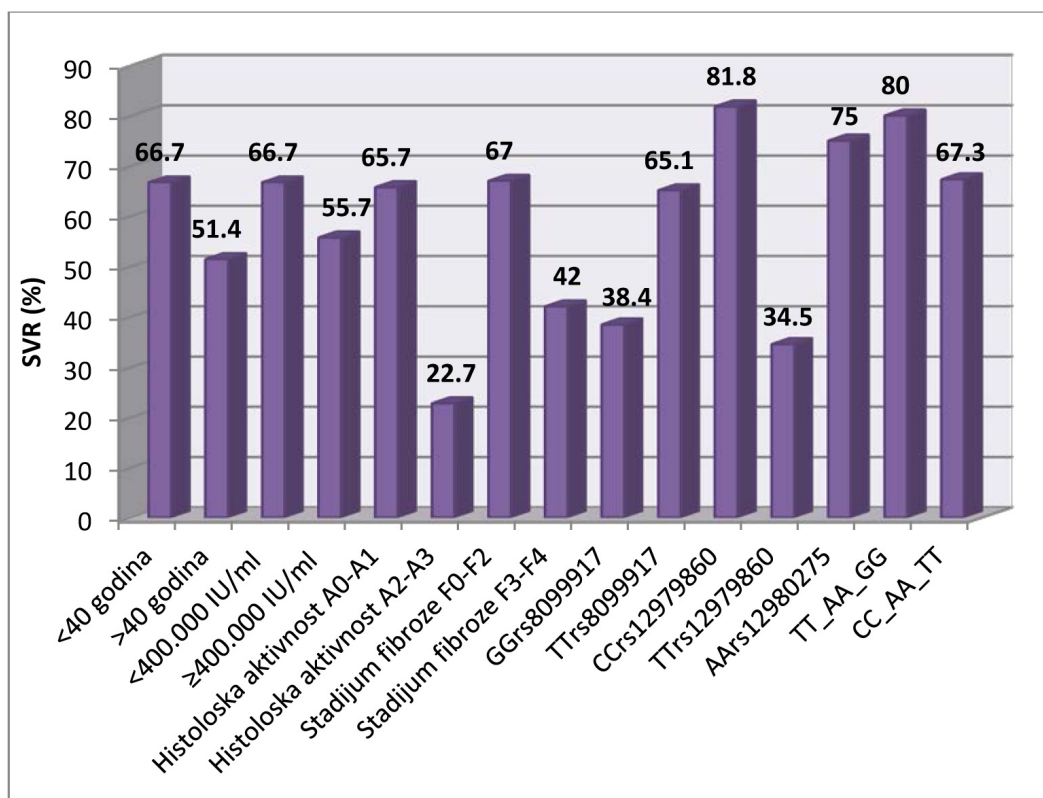
parametar	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	P	RR	95% CI	P	RR	95% CI
Uzrast, godine ($\bar{x} \pm SD$)	0.005	0.96	0.93-0.99	0.02	0.95	0.92-0.99
Histološka aktivnost	0.001	0.15	0.52-0.45	0.006	0.19	0.06-0.62
Stadijum fibroze	0.006	0.36	0.17-0.75	/	/	/
rs12979860 CC	0.003	4.24	1.62-11.15	/	/	/
rs12979860 TT	0.001	0.19	0.07-0.51	/	/	/
rs12980275 AA	0.037	2.57	1.06-6.25	/	/	/
rs8099917 GG	0.038	0.23	0.06-0.92	/	/	/
rs8099917 TT	0.052	2.02	0.99-4.11	/	/	/
non- rs8099917 GG i rs12980275 AA non-rs12979860 TT	0.02	3.4	1.19-9.70	/	/	/
rs8099917 TT ili rs12979860 CC ili rs12980275 AA	0.001	4.53	1.93-10.6	0.000	6.75	2.42-18.78

RR – relativni rizik, 95% CI- interval poverenja

Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom

Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da su prisustvo povoljnih genotipova, mlađe životno doba, niži stepen nekroinflamatorne aktivnosti i niži stadijum fibroze jetre značajni faktori u predikciji SVR.

Među ispitivanim faktorima kao nezavisni prediktori SVR su se izdvojili IL28B profili - **rs8099917TT** ili **rs12980275AA** ili **rs12979860CC** koji u sebi sadrže makar jedan povoljan genotip ispitivanih polimorfizama (slika 20).



Slika 20. Ishod terapije (% SVR) u odnosu na značajne prediktore odgovora na terapiju

Ispitivani su senzitivnost (Sn), specifičnost (Sp), pozitivna (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV) pojedinačnih polimorfizama i njihovih kombinacija, tj. IL28B profila. Analizom pojedinačnih polimorfizama i njihovih povoljnih genotipova, najjaču PPV ima **rs12979860CC** - 81.8%, a potom i **rs12980275AA** - 75.0%. Ispitivanjem kombinacije polimorfizama, IL28B profila, oni profili koji u sebi sadrže **rs12980275AA** uz odsustvo nepovoljnih genotipova **rs8099917GG** i **rs12979860TT** (**non-rs8099917GG** i **rs12980275 AA** i **non-rs12979860 TT**) imaju najjaču PPV - 80.0%.

IL28B profili **non-rs8099917GG** i **rs12980275AA** i **non-rs12979860TT** u poređenju sa profilima **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs12980275AA** imaju jaču PPV (80% vs. 67.3%) što je razumljivo, jer PPV zavisi od broja ispitanika,

Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom

tj. PPV je jača kada je broj ispitanika manji. S obzirom da postoje 4 kombinacije **non-rs8099917GG** i **rs12980275AA** i **non-rs12979860TT**, a 16 **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs12980275AA**, shodno tome i broj pacijenata koji imaju neku od kombinacija drugog profila je veći. Frekvencija **non-rs8099917GG** i **rs12980275AA non-rs12979860TT** iznosi 18.4%, tj. ovi profili su prisutni kod 25 pacijenata, dok je frekvencija profila **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs12980275AA** 76.5%, odnosno prisutni su kod 104 pacijenta. Zato je PPV **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs12980275AA** slabija iako su se pokazali najboljim prediktorom SVR u multivarijantnoj analizi.

S druge strane, najveću NVP imaju nepovoljni genotipovi **rs12979860TT** (73.9%) i **rs8099917GG** (72.7%).

Tabela 7. *Senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost ispitivanih polimorfizama – pojedinačnih i njihovih kombinacija*

	parametar	Sn (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)
Pozitivni prediktor	rs12979860CC	33.8	89.3	81.8	48.5
	rs12980275AA	30	85.7	75	46.2
	rs8099917TT	70	46.4	65.1	52
	non-rs8099917GG i rs12980275AA i non-rs12979860TT i	25.1	91.1	80	45.9
	rs8099917TT ili rs12979860CC ili rs12980275AA	87.5	39.3	67.3	68.8
Negativni prediktor	rs12979860TT	92.5	30.4	65.5	73.9
	rs8099917GG	96.2	14.3	61.6	72.7

Sn – senzitivnost, Sp - specifičnost, PPV – pozitivna prediktivna vrednost, NPV – negativna prediktivna vrednost

5. DISKUSIJA

Cilj terapije hroničnog C hepatitisa je prevencija razvoja komplikacija, što se postiže eradikacijom virusa iz organizma tj. postizanjem stabilnog virusološkog odgovora. Kod pacijenata lečenih kombinovanom terapijom zabeležen je značajan pad mortaliteta i morbiditeta. Naročito je smanjena incidenca HCC (Bruno i sar., 2001., Camma i sar., 2001.). Smatra se da bolesnici koji postignu SVR ostaju HCV RNK negativni najmanje narednih 5 godina (Zeuzem i sar., 2004., Manns i sr., 2008., Swain i sar., 2007.).

SVR pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 određen je većim brojem faktora kako od strane samog virusa tako i od strane domaćina. Genetski faktori kao prediktori odgovora na terapiju dospeli su u fokus interesovanja 2009. godine kada je u Studijama ispitivanja celog genoma (eng. GWAS – Genome Wide Association Studies) uvrđeno postojanje većeg broja polimorfizama pojedinačnog nukleotida na 19. hromozomu, u blizini gena koji kodira *IL28B* i uočena njihova povezanost sa SVR. Ovi polimorfizmi su odgovorni za postojanje više genotipova *IL28B* od kojih zavisi spontana eliminacija virusa C hepatitisa, razvoj hronične bolesti, ali i ishod terapije interferonom i ribavirinom (Ge i sar., 2009, Suppiah i sar., 2009., Tanaka i sar., 2009., Rallón i sar., 2012.).

Iako je utvrđeno postojanje većeg broja polimorfizama u blizini gena koji kodira *IL28B*, 3 polimorfizma su se izdvojila kao najvažnija u prognozi ishoda primenjene terapije. Dok neki autori ne prave značajnu razliku između rs12979860 i rs8099917 kao prediktora SVR, po drugima postoji jasna razlika između ova dva polimorfizma (Rauch i sar., 2010., Suppiah i sar., 2009., Tanaka i sar., 2009., Thomas i sar., 2009., Ge i sar., 2009., Thompson i sar., 2010.). Rauch i sar., Suppiah i sar., Tanaka i sar., izdvajaju rs8099917 kao najjači prediktor ishoda na primenjenu kombinovanu terapiju, dok Thomas i sar., Ge i sar. i Thompson i sar. akcenat stavljaju na rs12979860 koji je po njihovim istraživanjima najbolji i nezavisni prediktor SVR. Smatra se da se među pripadnicima bele rase sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 koji imaju inicijalni nivo viremije <600.000 IU/ml i niži stadijum fibroze (METAVIR F0-F2), SVR kreće između 52% i 86% u zavisnosti od *IL28B* genotipa (Thompson i sar., 2010.). rs12980275 nije toliko ispitivan koliko prethodna dva, ali prema podacima iz literature autori se slažu da ovaj SNP ima važnu ulogu u prognozi terapijskog ishoda (Bochud i sar., 2012., Lagging i sar., 2011., Tanaka i sar., 2009.).

Razumevanje odnosa polimorfizama i SVR može imati bitne kliničke implikacije pre svega u terapijskom smislu – dužina trajanja terapije, dvojna vs. trojna terapija i prognoza bolesti. Tačan mehanizam kojim polimorfizmi utiču na tok i ishod terapije

PEG-IFN/RBV još uvek nije do kraja istražen i nije dovoljno jasan. Takođe nije dovoljno poznato da li svaki od pojedinačnih polimorfizama utiče na ishod terapije ili je ishod terapije određen samo nekim od njih. Zbog toga je ovo istraživanje upravo i imalo za cilj da ispita ulogu pojedinačnih polimorfizama *IL28B* i njihovih kombinacija na ishod standardne, dvojne terapije.

5.1 Značaj, distribucija i prevalenca *IL28B* genotipova u predikciji SVR

Najčešći put transmisije virusa među ispitanicima koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem bila je intravenska primena psihoaktivnih supstanci (35.3%), a među njima je najviše bilo osoba mlađih od 40 godina (85.4%). 19.1% ispitanika inficiran je transfuzijom kontaminirane krvi. S obzirom da je 80-tih godina prošlog veka transfuzija krvi bila čest put transmisije virusa očekivano je da najveći broj inficiranih ovim putem bude stariji od 40 godina (73.1%). Uprkos dobro uzetoj anamnezi, u čak 44.9% pacijenata, put infekcije nije moga biti utvrđen.

U ovom istraživanju SVR je postiglo 58.8% što je u saglasnosti sa rezultatom koji su objavili Delić i sar. 2012., (60.7%), ali različito u odnosu na rezultate drugih autora – oko 40% (Manns i sar., 2001., Fried i sar., 2002., Hadziyannis i sar., 2004., McHutchison i sar., 2004., Marcellin i sar., 2012.). Ovako dobar ishod terapije bi se mogao objasniti činjenicom da se radi o prethodno nelečenim pacijentima koji su pokazali visok stepen kooperativnosti i motivisanosti za lečenje. Uključivanju terapije prethodili su razgovori sa pacijentima i njihovim porodicama tokom kojih su im predočeni svi rizici koje nosi nelečena hronična C virusna infekcija, ali i mogući neželjeni efekti primenjenih lekova uz poseban osvrt na mogućnost izlečenja kao i moguć neuspeh terapije. Česte kontrole pacijenata bile su važan aspekt lečenja, naročito u prvih 12 nedelja, s obzirom da je rani virusološki odgovor, tj. rana supresija replikacije virusa snažan prediktor odgovora na primenjenu terapiju. Dobra adherentnost u ranoj fazi lečenja može biti od presudnog značaja za ukupnu adherentnost tokom čitavog perioda lečenja (Ferenci i sar., 2005.). Prema podacima iz literature može se videti da pojedini autori smatraju komplijansu jednim od najvažnijih faktora povezanih sa SVR (Beinhardt i sar., 2012., Arora i sar., 2011.). Na adherencu, odnosno komplijansu pacijenata primenjeno je pravilo „80/80/80“ – može se reći da pacijent ima dobru komplijansu ako je primo više od 80% planirane doze PEG-RBV i više od 80% planirane doze RBV, a da je dužina lečenja trajala barem 80% od planirane dužine trajanja terapije. Ukoliko se primeni pravilo „80/80/80“ SVR iznosi 63% vs. 52% ukoliko je aherenca manja od 80%

(McHutchinson i sar., 2002.). U odnosu na biohemijske parametre, pre svega na krvnu sliku – broj leukocita, trombocita i prisustvo anemije, doze lekova su po potrebi korigovane, ali svi pacijenti koji su obuhvaćeni istraživanjem primili su više od 60% predviđene doze ribavirina, jer shodno rezultatima drugih autora SVR se ne menja značajno ukoliko je kumulativna doza RBV veća od 60% (Reddy i sar., 2005).

Analizom podataka iz literaure drugih autora, može se reći da je uspešnost kombinovane terapije statistički značajno različita među etničkim grupama (Jacobson i sar., 2007., Yu i sar., 2008., Rodriguez-Torres i sar., 2009.). Najbolji odgovor je u zemljama Azije gde je SVR preko 60% (Huang i sar., 2013.), a potom među pripadnicima bele rase, 46% i među Latinoamerikancima, 41%. Najniži SVR se beleži među crnom rasom, svega 19% (Thompson i sar., 2010.). Različit odgovor na primenjenu terapiju u svetu, praćen je i različitom distribucijom i prevalencom *IL28B* genotipova koji se smatraju važnim inicijalnim prediktorima SVR kod pacijenata sa genotipom 1 HCV (Ge i sar., 2009., Rauch i sar., 2010.).

Polimorfizam rs12979860 se nalazi 3 kbp uzvodno od *IL28B* gena i smatra se nezavisnim prognostičkim faktorom postizanja SVR kod pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 (Ge i sar., 2009., Balagopal i sar., 2010.). U istraživanju koje su sproveli Ge i sar., analizirano je 1137 pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1. U ispitivanoj grupi obolelih SVR je postiglo 77% pripadnika bele rase i 53% ispitanika crne rase koji su CCrs12979860 (Ge i sar., 2009.). U radu Thompsona i sar. SVR među belom rasom koji su CCrs12979860 iznosio je 69%, među Latinoamerikancima 56% i 48% među crnom rasom.

Kombinovana terapija se pokazala manje uspešnom kod pacijenata koji su CTrs12979860 i TTrs12979860 - 33% i 27% među pripadnicima bele rase, odnosno 15% i 13% među pripadnicima crne rase (Thompson i sar., 2010.). Značajno je navesti rezultate meta - analize (Wu i sar., 2012.) kojom je analizirano 26 istraživanja u kojima su ispitivani *IL28B* polimorfizmi i SVR kod pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1, različite rasne pripadnost. Prema rezultatima ove meta – analize, pored ferkvence C alela na poziciji rs12979860 i T alela na poziciji rs8099917 i rasna pripadnost sama po sebi utiče na ishod terapije.

Ako se pogleda distribucija i prevalenca CCrs12979860 u svetu, može se videti da je najveća u zemljama Azije, čak 97.9%, u Africi je najniža i iznosi oko 23.1%, dok je među belom rasom prevalenca CCrs12979860 39% (Thomas i sar., 2010., Montes-Cano i sar., 2010., Ge i sar., 2009.). U ovom istraživanju prevalenca CCrs12979860 je 23.5% i niža je nego što je očekivano za belu rasu, ali slična

prevalenci koju su publikovali autori iz zemalja iz regiona, Italije (Lagging i sar. 2011.) – 26% i Rumunije (Sporea i sar., 2011.) - 24.3%. Analizom distribucije i prevalencije genotipova rs12979860 među ispitanicima koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem vidi se da dominira heterozigot CTrs12979860 – 59.6%, dok je najniža prevalenca homozigota TTrs12979860 – 16.9% što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima koji se odnose na prevalencu i distribuciju genotipova među pripadnicima bele rase (Ge i sar., 2009., Lagging i sar., 2011., Halfon i sar., 2011.). Među pacijentima ove studije prevalenca CCrs12979860 je značajno veća u grupi pacijenata koja je odgovorila na primenjenu terapiju u odnosu na grupu koja nije postigla SVR (33.7% vs. 10.7%, $p=0.002$) što je u saglasnosti sa ranije prikazanim rezultatima o povoljnom uticaju CCrs12979860 na ishod dvojne terapije (Ge i sar., 2009., Balagopal i sar., 2010.).

Shodno navedenoj distribuciji genotipova, ukupna frekvencija C alela polimorfizma rs12979860 je 54.1% i T alela 39.8% što je vrlo slično rezultatima koji su objavili autori iz Španije (Montes-Cano i sar., 2010.), čiji su ispitanici takođe bili pripadnici bele rase iz južne Evrope.

S obzirom da je u istraživanjima drugih autora uočena povezanost CCrs12979860 i spontanog klirensa hepatitis C virusa iz organizma (Thomas i sar., 2009., Par i sar., 2013.) relativno niska prevalenca CCrs12979860 među ispitanicima ove studije se upravo može i objasniti verovatnom spontanom eliminacijom virusa iz organizma. Prevalenca CCrs12979860 bi možda bila veća da je ispitivanje obuhvatilo i zdravu populaciju. Ge i sar. su utvrdili da je frekvencija C alela veća u opštoj populaciji nego u populaciji obolelih, što C alelu daje jednu vrstu protektivne uloge u odnosu na hroničnu C infekciju. I zaista ako se pogleda distribuciju C i T alela na poziciji rs12979860 u svetu, može se zapaziti dominacija C alela u Aziji, odnosno T alela u Africi što je u saglasnosti sa procentom stabilnog virusološkog odgovora u ovim delovima sveta (Ge i sar., 2009., Tanaka i sar., 2009.).

Analizom distribucije i prevalencije genotipova rs8099917 u ovom istraživanju može se videti da je najzastupljeniji genotip TT i njegova prevalenca iznosi 63.2%, dok najnižu prevalencu ima genotip GG – 8.1%. Dobijeni rezultati su slični rezultatima iz literature drugih autora (Ge i sar., 2009., Riva i sar., 2012., Tanaka i sar., 2009.).

Ako se pogleda frekvencija pojedinačnih alela u prethodnim istraživanjima, može se videti da je frekvencija G alela na poziciji rs8099917 najniža među pacijentima kod kojih je zabeležen spontani klirens virusa iz organizma (24%), dok je kod pacijenata sa hroničnom infekcijom koji su odgovorili na terapiju frekvencija G alela nešto

viša i iznosi 32%. Najviša je u grupi ne-respondera, 58%. (Rauch i sar., 2010.). Među bolesnicima ovog istraživanja frekvencija G alela je slična ranije objavljenim rezultatima – viša je u grupi ne-respondera (54.6%) u poređenju sa grupom bolesnika koja je odgovorila na primenjenu terapiju (42.4%). Smatra se da je prisustvo G alela povezano sa smanjenom ekspresijom IFN- λ koji ima važnu ulogu u supresiji virusne replikacije kroz JAK-STAT signalne puteve i hepatocitima čime se može objasniti izostanak odgovora na terapiju kao i prelazak u hronicitet (Tanaka i sar., 2009., Suppiah i sar., 2009.).

Dosadašnji rezultati o distribuciji genotipova rs12980275 nisu jedinstveni. Po nekim autorima (Tanaka i sar., 2009., Fattovich i sar. 2011.) najzastupljeniji je AAr12980275 dok su drugi pokazali najveću zastupljenost heterozigota AGr12980275 (Lagging i sar., 2011., Bochud i sar. 2011.). Među ispitanicima koji su analizirani u ovom radu najveća je prevalenca heterozigota AGr12980275 – 51.8%.

U ovom radu najčešći haplotip je bio C/A/T (22.49%). U istraživanju koje su sproveli Bochud i sar. u kojem su istovremeno analizirana ova tri polimorfizma, najveću frekvenciju je takođe imao haplotip C/A/T (36%), (Bochud i sar., 2012.).

Smatra se da istovremeno nasleđivanje pojedinačnih polimorfizama (eng. linkage disequilibrium – LD) zavisi od etničke i rasne pripadnosti. Izgleda da je najjači LD u zemljama Azije i to između rs12979860 i rs12980275 (Ge i sar., 2009.), odnosno između rs12980275 i rs8099917 (Suppiah i sar., 2009.). Među belom rasom LD između rs12979860 i rs12980275, rs12980275 i rs8099917, rs12979860 i rs8099917 je umeren (Ge i sar., 2009., Moghaddam i sar., 2011., Lagging i sar. 2011.). U ovom istraživanju LD između svih analiziranih polimorfizama je slab.

Ako se pogledaju do sada objavljena istraživanja, može se videti da istovremeno nasleđivanje dva „loša“ alela kod osoba sa jakim LD, na primer rs12979860T i rs8099917G, dovodi do značajno više ekspresija ISG što smanjuje verovatnoću za spontanom klirensom virusa iz organizma kao i uspeh terapijskog odgovora (Honda i sar., 2010., Urban i sar., 2010., Ahlenstiel i sar., 2010.). S druge strane, istovremeno nasleđivanje dva „dobra“ alela rs12979860C i rs8099917T može da objasni bolju eliminaciju HCV iz organizma, ređi prelazak u hronicitet i bolji odgovor na terapiju (Thomas i sar., 2010., Montes-Cano sar., 2010.).

Prema podacima iz literature drugih autora, supresija replikacije HCV kod pacijenata sa CCrs12979860 lečenih PEG-IFN/RBV je značajno efikasnija u poređenju sa supresijom replikacije virusa kod CT i TTrs12979860 što korelira sa višim procentom SVR (Thompson i sar., 2010., Lindh i sar., 2011., Stattemayer

i sar., 2011.). Među pacijentima koji su ispitivani u ovom istraživanju, bolesnici sa CCrs12979860 su imali visok procenat SVR - 81.8% dok je kod pacijenata sa TTrs12979860 procenat SVR iznosio 26.1%. Dobijeni rezultati su slični podacima iz literature drugih autora – 61.7% vs. 21% (McCarthy i sar., 2010.), 69% vs. 27% (Thomson i sar., 2010.), 80% vs. 40% (Balagopal i sar., 2010.), i 82% vs. 33% u istraživanju koji su objavili Ge i sar. 2009. godine. Može se reći da ovako visok procenat SVR bolesnika sa CCrs12979860 jasno izdvaja ovaj polimorfizam kao dobar prediktor ishoda terapije. Analizom frekvence C alela se vidi da je viša među responderima u poređenju sa ne-responderima (63.2% vs. 39.8%).

U istraživanju koji su objavili Bochud i sar. 2011., zastupljenost TTrs12979860 je veća u grupi ne-respondera nego u grupi respondera, 48% vs. 66%, zbog čega se TTrs12979860 može smatrati dobrom prognostičkim faktorom izostanka odgovora na primenjenu terapiju. Među ispitanicima ove studije prevalenca TTrs12979860 je takođe bila viša u grupi ne-respondera u poređenju sa responderima – (30.4 % vs. 7.5%, $p=0.000$)

Analizom distribucije *IL28B* genotipova rs8099917 među ispitanicima ovog rada, može se videti da je prevalenca TTrs8099917 viša u grupi bolesnika koji su odgovorili na terapiju nego u grupi ne-respondera, 70% vs. 53.6% ($p=0.05$), ali se ta razlika nalazi na granici statističke značajnosti. Kod pacijenta koji su imali TTrs8099917 procenat SVR je bio 2 puta veći u poređenju sa onima koji su imali GGr8099917 (65.1% vs. 27.3%). Međutim, prevalenca GGr8099917 je bila značajno viša u grupi onih koji nisu odgovorili na terapiju u odnosu na one koji su postigli SVR (14.3% vs. 3.8%, $p=0.03$) zbog čega se može smatrati dobrim prediktorom neuspeha terapije što je pokazano i u literaturi drugih autora (Tanaka i sar., 2009, Rauch i sar., 2010, Riva i sar., 2012, Smith i sar., 2011.). Analizom njihovih rezultata se vidi da je frekvencija G alela na poziciji rs8099917 značajno viša u grupi ne-respondera u poređenju sa grupom respondera (75.5% vs. 9.4%) zbog čega se označava kao risk alel (Tanaka i sar., 2009.).

U dosadašnjim ispitivanjima genotip AArs12980275 se pokazao kao „povoljan“ genotip, tj. kao dobar prognostički faktor odgovora na standardnu terapiju (Tanaka i sar., 2009., Bochud i sar., 2011.). Prevalenca A alela na poziciji rs12980275 među pacijentima koji nisu odgovorili na terapiju izosila je 12%, dok je bila značajno viša u grupi koja je postigla SVR – 74.3% (Tanaka i sar., 2009.).

Rezultati ovog rada ne odstupaju od ranije objavljenih rezultata za SNP rs12980275. Procenat AArs12980275 u grupi respondera bila je značajno viša u poređenju sa grupom ne-responderima (30.0% vs. 14.3%, $p=0.03$).

Prema dosadašnjim istraživanjima se vidi da postoji niža ekspresija ISG kod pacijenata sa „povoljnim“ genotipom uz pozitivnu korelaciju sa SVR i vice versa (Abe i sar., 2010., Sarasin-Filipowicz i sar., 2008.).

Sumirajući rezultate koji se odnose na prevalencu i distribuciju *IL28B* genotipova ispitivanih polimorfizama i njihov odnos prema SVR može se reći da su među bolesnicima sa hroničnim C hepatitisom genotip 1, u našoj zemlji, najčešći heterozigoti CTrs12979860 i AGrS12980275 kao i homozigot TTrs8099917. Prisustvo CCrs12979860 i AArS12980275 je povezano sa dobrim odgovorom na kombinovanu terapiju, tj. njihovo prisustvo korelira sa visokim procentom SVR (81.8% vs. 75.0%) zbog čega su oni okarakterisani kao povoljni genotipovi. Povoljan genotip je i TTrs8099917, s tim što je njegova statistička značajnost niža u poređenju sa CCrs12979860 i AArS12980275. Nepovoljni genotipovi su TTrs12979860 i GGrS8099917.

Prema rezultatima ovog istraživanja može se reći da pacijenti sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 koji se leče kombinovanom, dvojnomo terapijom, sa povoljnim *IL28B* genotipom, imaju visoku verovatnoću da postignu SVR, dok prisustvo nepovoljnih *IL28B* genotipova značajno smanjuje verovatnoću izlečenja.

Kao i ranije objavljeni rezultati drugih autora (Jacobson i sar., 2011., Poordad i sar., 2011.) i rezultati ovog istraživanja se slažu da pacijente sa povoljnim genotipom treba lečiti kombinovanom terapijom PEG-IFN/RBV. Međutim, ako bi se kod pacijenata koji su CCrs12979860 primenila trojna terapija, uzimajući u obzir principe odgovorom vođene terapije, kod pacijenata koji postanu HCV RNK negativni nakon 1-2 nedelje od početka terapije, ukupnu dužinu lečenja bi bilo moguće skratiti na 12 nedelja, a da se pri tome SVR ne smanji značajno (Shiffman i sar., 2012.).

Kod pacijenata sa nepovoljnim *IL28B* genotipom treba razmotriti terapijsku opciju zasnovanu na primeni inhibitora proteaze ili inhibitora polimeraze uz PEG-IFN/RBV. (Jacobson i sar., 2011., Poordad i sar., 2011.). Trojnom terapijom sa boceprevirom ili telaprevirom kod prethodno nelečenih bolesnika koji su CTrs12979860 ili TTrs12979860 uspeh terapije se može udvostručiti i procenat SVR se povećati na 70% (Thompson i sar., 2012.). Dodavanjem boceprevira bolesnicima bele rase koji su CCrs12979860 SVR je iznosio 80%, a kod onih koji su CTrs12979860 i TTrs12979860 71% odnosno 59% (Poordad i sar., 2011.). Analizom rezultata primene telaprevira u kombinaciji sa PEG-IFN/RBV može se videti da je terapijski odgovor bio bolji, tj. procenat SVR se povećao na 90% kod pacijenata sa povoljnim CC genotipom, odnosno na 71% i 73% kod pacijenata

sa CT i TT genotipovima (Jacobson i sar., 2011.). Odgovorom vođena terapija uz primenu PI i PEG-IFN/RBV može da poveća procenat SVR u poređenju sa dvojnou terapijom - 68% vs. 40% u grupi prethodno nelečenih pacijenta nezavisno od *IL28B* genotipa (Poordad i sar., 2011.).

Određivanjem *IL28B* statusa može se pretpostaviti verovatnoća ishoda primenjene terapije, ali dosadašnja ispitivanja ne preporučuju jasno da li pacijente sa povoljnim genotipom treba lečiti standardnom terapijom ili pak u terapiju uključiti i neki od inhibitora proteaze čime bi se mogla skratiti dužina lečenja (Ghanny i sar., 2011.).

5.2 Značaj *IL28B* profila u predikciji SVR

S obzirom da je ukupna prevalenca povoljnih genotipova CCrs12979860 i AA rs12980275 niska, a da se distribucija TTrs8099917 između respondera i non-respondera nalazi na granici statističke značajnosti teško je reći koji je od navedenih polimorfizama nabolji prediktor SVR. Zbog toga je napravljena kombinacija genotipova ispitivanih polimorfizama, tj. *IL28B* profili koji su korelirani sa SVR. U univarijantnoj logističkoj analizi kao bolji prediktor SVR u poređenju sa pojedinačnim polimorfizmima su se najpre izvojila 4 *IL28B* profila koja u sebi sadrže AAr12980275 u kombinaciji sa makar jednim C alelom na poziciji rs12979860 i makar jednim T alelom na poziciji rs8099917 odnosno potpuno odsustvo nepovoljnih genotipova TTrs12979860 i GGr8099917. Analizom i drugih kombinacija genotipova ispitivanih polimorfizama kao najbolji prediktori SVR su se pokazali *IL28B* profili koji u sebi sadrže makar jedan povoljan genotip ispitivanih polimorfizama - **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs129875AA**. Takvih kombinacija bilo je 16.

Shodno rezultatima drugih autora (Clak i sar., 2011., MacCarthy i sar., 2010.) pacijenti koji su nosioci CCrs12979860 imaju veću šansu da postignu virusološki odgovor (oko 80%) i samim tim te pacijente treba ohrabriti i motivisati kako bi istrajali u terapiji. S druge strane, oni su potencijalni kandidati za kraće trajanje terapije čime bi se izbegla pojava eventualnih neželjenih efekata lekova i cena lečenja bi bila manja. Međutim, gledajući rezultate ovog istraživanja, uspeh terapije nije ograničen samo na pacijente koji su nosioci CCrs12979860 već se odnosi i na one koji imaju bilo koji povoljan genotip na jednom od ova tri ispitivana polimorfizma. S druge strane, kod pacijenata koji su nosioci nepovoljnih genotipova TTrs12979860 i GGr8099917, treba razmotriti druge terapijske opcije, odnosno uvođenje trojne terapije sa nekim od inhibitora proteaze, s obzirom da je verovatnoća da će standardnom, dvojnou terapijom postići SVR niska i manja je od 40%.

Slično ranijim rezultatima (Halfon i sar., 2011., Riva i sar., 2012., Thomas i sar., 2009., Ge i sar., 2009., Suppiah i sar., 2009., Tanaka i sar., 2009.) analizom pojedinačnih polimorfizama, najveću PPV imaju CCrs12979860 i AArs12980275, 81.8 vs. 75%. Pozitivna prediktivna vrednost CCrs12979860 u ovom istraživanju viša je u poređenju sa rezultatima Lagginga i sar. (81.8% vs. 66%), verovatno zbog niže frekvence CC genotipa u ovoj grupi pacijenata, ali niža u poređenju sa rezultatima Riva i sar. kod kojih je PPV CCrs12979860 čak 95%. Ovako visok PPV (95%) u njihovom istraživanju može se objasniti činjenicom da su ispitivani i pacijenti sa genotipom 4 HCV. Ako se uporedi sa rezultatom drugih autora pozitivna prediktivna vrednost TTrs8099917 među ispitivanim bolesnicima je nešto niža (Riva i sar., 2012.), 65.1% vs. 74%.

U istraživanju koje su sproveli Halfon i sar., 2010., PPV CCrs12979860 iznosila je 72%, i 63% za TTrs8099917. Kombinujući ova dva genotipa PPV za SVR se nije značajno promenila, odnosno iznosila je 70%. Do sličnih rezultata se došlo i u ovom istraživanju - kombinovanjem dva ili više povoljna genotipa, PPV se nije značajno povećala. U rezultatima koje su objavili Fattovich i sar., 2012. godine, kombinovanje starosne dobi i AArs129875 nije bitno uticalo na PPV. Sličan rezultat je dobijen i u ovom istraživanju.

IL28B profili, tj. kombinacije genotipova: **non-rs8099917GG** i **rs12980275AA** i **non-rs12979860TT** i **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs129875AA** pokazuju visoku PPV, 80% vs 67.3%. Iako su se profili **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs129875AA** pokazali kao najjači prediktori stabilnog virusološkog odgovora u multivarijantnoj logističkoj analizi, njihova PPV je niža u poređenju sa PPV profila **non-rs8099917GG** i **rs12980275AA** i **non-rs12979860TT**. To nije iznenađujuće s obzirom da postoje samo 4 kombinacije profila **non-rs8099917GG** i **rs12980275AA** i **non-rs12979860TT**, dok je broj kombinacija profila **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs129875AA** 16. Shodno tome je i broj pacijenata sa **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs129875AA** profilima veći, a PPV je jača ako je broj ispitanika manji.

U ranijim istraživanjima SNP rs8099917 je označen kao najjači prediktor neuspeha terapije (Tanaka i sar., 2009., Rauch i sar., 2010., Riva i sar., 2012., Smith i sar., 2011.). To je potvrđeno i rezultatima ovog istraživanja - NPV GG rs8099917 je 96.2% i TT rs12979860 92.5% što je slično rezultatima drugih autora.

Prema Halfonu i sar. 2011., određivanje pojedinačnog *IL28B* genotipa SNP rs8099917 ili rs12979860 je dovoljno za predikciju neuspeha terapije hroničnog C hepatitisa genotip 1. Zbog toga što SNP rs8099917 ima veću prevalencu u odnosu

na SNP rs12979860 među pripadnicima bele rase, po Halfonu i sar. dovoljno je odrediti samo SNP rs12979860 s obzirom da ima bolju prediktivnu vrednost stabilnog virusološkog odgovora u odnosu na SNP rs8099917.

Analizom pojedinačnih polimorfizama i njihovih kombinacija, može se zaključiti da su se *IL28B* profili **rs8099917TT** ili **rs12979860CC** ili **rs129875AA** pokazali kao najjači prediktori SVR, dok su se pojedinačni polimorfizmi GGr8099917 i TTr8099917 izdvojili kao nabolji prediktori neuspeha kombinovane terapije.

5.3 Značaj demografskih, biohemijskih, virusoloških i patohistoloških parametara u predikciji SVR

U ovom istraživanju ispitivan je uticaj demografskih, biohemijskih, virusološki i patohistoloških faktora na predikciju SVR. Dobijeni rezultati pokazuju da je efekat kombinovane terapije bolji kod pacijenata mlađe životne dobi, tj. kod osoba mladih od 40 godina (SVR: 66.7% vs. 51.4%), ali nije dokazano da je ta razlika statistički značajna ($p=0.08$), dok je po rezultatima koje su objavili Delić i sar., 2012. značajnost daleko veća (SVR: 84.3% vs 59.1%, $p<0.0005$). Odstupanje koje postoji između ovog istraživanja i istraživanju koje su sproveli Delić i sar. posledica je mlađe starosne strukture ispitanika koji su obuhvaćeni njihovim istraživanjem. Međutim, ono što je nesumnjivo, u ovom radu je prisutna statistički značajna razlika ($p=0.004$) u starosnoj strukturi respondera i ne-respondera. Prema literaturi drugih autora starosna dob bolesnika se i smatra jednim od prediktora SVR (Ge i sar., 2009., Suppiah i sar., 2009., Tanaka i sar., 2009.).

Od mnogih faktora koji mogu imati uticaj na ishod terapije razmatran je i uticaj bazalne viremije (viral load). Početno definisanje i diferencijacija između visoke i niske viremije je dovelo do preporuke da početni prag za visoku viremiju bude 800.000 IU/ml (Pawlotsky i sar., 2000.). Međutim, najnovije preporuke za graničnu vrednost viremije u predikciji SVR je nivo viremije od 400.000 IU/ml (European Association for the Study of the Liver, 2011.).

Smatra se da najveći broj obolelih sa hroničnim C hepatitisom ima nivo viremije između 5×10^4 i 5×10^6 IU/ml (Terrault i sar., 2005.). Tokom trajanja bolesti stepen virusne replikacije je uglavnom stabilan (Nguzen i sar., 1996.). Serumski nivo HCV RNK najverovatnije ne utiče na težinu bolesti i ne korelira sa nastankom komplikacija bolesti. Međutim, kod pacijenata kod kojih je bolest uznapredovala, tj. kod onih sa terminalnom fazom bolesti jetre, nivo HCV RNK je značajno niži u poređenju sa pacijentima kod kojih se ciroza jetre nije razvila. Zašto je to tako još

uvek nije dovoljno jasno, ali jedno od mogućih objašnjenja je postojanje manjeg broja hepatocita kod bolesnika sa terminalnom fazom bolesti jetre što za posledicu ima i smanjenu produkciju virusa (Duvoux i sar., 1999.).

Najvažniji klinički značaj bazalnog nivoa viremije je njegova prediktivna vrednost na ishod terapije. Iako su istraživanja pokazala da je inicijani nivo HCV RNK nezavisni prediktor SVR kod pacijenata koji se leče kombinovanom terapijom PEG-IFN/RBV (McHutchinson i sar., 1998., Poynard i sar., 1998., Manns i sr., 2001., Fried i sar., 2002., Hadziyannis i sr., 2004.), njegova prediktivna vrednost na SVR u poređenju sa genotipom virusa i *IL28B* genotipovima je značajno slabija (McHutchinson i sar., 1998., Poynard i sar., 1998., Manns i sr., 2001., Fried i sar., 2002., Hadziyannis i sr., 2004., Ge i sar., 2009., Thompson i sar., 2010.).

Kod ispitanika koji su obuhvaćeni ovim ustraživanjem viši procenat SVR je postignut među bolesnicima koji su imali bazalni nivo viremije <400.000 IU/ml u poređenju sa onima koji su inicijano imali viši stepen virusne replikacije - ≥ 400.000 IU/ml (66.7% vs. 55.7%), ali nije dokazana statistička značajnost.

Rezultati ovog istraživanja nesumnjivo govore da je uspeh kombinovane terapije bolji ako je stepen nekroinflatorne aktivnosti niži (65.7% vs. 22.7%, $p=0.000$), a stadijum fibroze jetre manji (67.0% vs. 42.2%, $p=0.005$). Ovi rezultati ukazuju da je rano otkrivanje hronične HCV infekcije i pravovremeno postavljanje egzaktne dijagnoze uz blagovremeno započinjanje terapije od neprocenljive važnosti za izlečenje. Svetska i naša iskustva ukazuju da je terapijski odgovor na dvojnju terapiju daleko bolji kod bolesnika sa početnom nego odmaklom bolešću jetre, odnosno ako se lečenje započne u ranoj fazi bolesti, kada još uvek nisu nastupile značajne patohistološke promene u jetri (Tan i sar., 2002., Delić i sar., 2012.).

Dakle, analizom demografskih, biohemijskih, virusoloških i patohistoloških parametara u predikciji SVR, može se reći da su mlade životno doba i niži stepen bazalne viremije, a naročito lakši stepen oštećenja jetre (niži METAVIR skor) povoljni prognostički pokazatelji odgovora na terapiju.

Ako se pogledaju rezultati drugih autora može se videti da su kod pripadnika bele rase najjači i nezavisni inicijalni prediktori (pre započinjanja terapije) SVR *IL28B* genotipovi (CCrs12979860). Niži stepen bazalne viremije i niži stadijum fibroze jetre i dalje su važni prognostički faktori odgovora na terapiju, ali slabiji u poređenju sa *IL28B* genotipovima (Ge i sar., 2009.).

Rezultati ovog istraživanja su slični do sada objavljenim rezultatima, s tim što su ovim istraživanjem analizirani i *IL28B* profili - kombinacija profila koja sadrži

makar jedan povoljan genotip ispitivanih polimorfizama ima najjaču prediktivnu vrednost i oni su nezavisni prediktori odgovora na terapiju. U multivarijantnom modelu niži stepen nekroinflamatorne aktivnosti i mlađe životno doba ostaju važni u predikciji SVR kod pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1, ali je njihova prediktivna vrednost slabija u poređenju sa *IL28B* profilima.

5.4 Korelacija biohemijskih, patohistoloških i virusoloških faktora sa ispitivanim polimorfizmima

Do sada objavljeni rezultati o uticaju *IL28B* polimorfizama na tok hroničnog C hepatitisa - stadijum fibroze jetre i nekroinflamatornu aktivnost su kontroverzni.

Serumska aktivnost AST bila je u negativnoj korelaciji sa prisustvom TTrs8099917 – niža serumska aktivnost AST je bila povezana sa postojanjem povoljnog TTrs8099917 genotipa.

Povezanost niže serumske aktivnosti AST i TTrs8099917 genotipa je očekivana, jer su oba parametra povoljni prediktori ishoda dvojne terapije. Slično ovim rezultatima (Agundez i sar., 2012.) i rezultati drugih autora su pokazali da postoji niža serumske aktivnosti γ -GT kod pacijenata sa CCrs12979860 u poređenju sa onima koji su CT ili TTrs12979860, dok je u drugom istraživanju nađena povezanost između niže serumske aktivnosti γ -GT i TTrs8099917 (Abe i sar., 2011.).

Serumska aktivnost transaminaza predstavlja marker nekroinflamatorne aktivnosti jetre (Agundez i sar., 2012.) što je potvrđeno rezultatima ovog istraživanja - viša serumska aktivnost AST prisutna je kod pacijenata sa većim stepenom nekroinflamatorne aktivnosti jetre ($p=0.26$, $p=0.003$, $p<0.05$), odnosno serumska aktivnost AST je u pozitivnoj korelaciji sa METAVIR skorom.

U ranijim istraživanjima se može videti da postoji značajna povezanost između TTrs8099917 i patohistoloških parametara – histološke aktivnosti i fibroze jetre (Abe i sar. 2011., Thompson i sar., 2010., Ciesla i sar., 2012.). Međutim, postoje autori čija ispitivanja govore suprotno, tj. autori koji nisu našli povezanost između polimorfizama i težine patohistoloških promena u jetri (Agundez i sar., 2012.). U ovom radu povezanost između ispitivanih polimorfizama i patohistološke aktivnosti nije utvrđena. Odsustvo povezanosti polimorfizama i histološke aktivnosti među ispitivanim pacijentima kao i u radu Agundeza i sar. može biti posledica činjenice da su u oba istraživanja obuhvaćeni samo pacijenti inficirani genotipom 1 virusa. Naime, u ispitivanju koje su objavili Bochud i sar. 2012. – GGr8099917 kao marker lošeg ishoda terapije je povezan sa nižim stepenom nekroze i inflamacije i blažim

stadijumom fibroze, ali kod pacijenata inficiranih non-1 genotipom HCV.

Odnos između *IL28B* genotipova i stadijuma fibroze u dosad objavljenim radovima je kontroverzan. Prema rezultatima koje su objavili Abe i sar., 2011., teži stadijum fibroze po METAVIR scoring sistemu povezan je sa prisustvom povoljnog, TTrs8099917 genotipa. Međutim, po drugim autorima (Di Marco i sar., 2012., Ciesla i sar., 2012.) teži stadijum fibroze u korelaciji je sa nepovoljnim, CT i TTrs12979860 i TG i GGr8099917 genotipovima. Analizom rezultata iz literature drugih autora (Falleti i sar. 2011.), teže oštećenje jetre je u korelaciji sa TTrs12979860. Međutim, daljom analizom podataka iz literature može se videti da drugi autori (Agundez i sar., 2012., Thompson i sar., 2010.), nisu uočili značajnu povezanost između stadijuma fibroze i rs12979860. U rezultatima ovog istraživanja postoji negativna povezanost između težine fibroze jetre i prisustva nepovoljnog GGr8099917 genotipa, premda se ta povezanost nalazi na granici statističke značajnosti ($\rho = -0.15$, $p = 0.07$). Lakši stadijum fibroze jetre prisutan je kod pacijenata sa GGr8099917.

Tačan mehanizam kojim *IL28B* genotipovi utiču na progresiju fibroze kod obolelih sa hroničnim C hepatitisom nije dovoljno jasan (Battaler i sar., 2003., Poynard i sar., 1997., Alberti i sar., 1999., Perumalswami i sar., 2006.). Ako se uzme u obzir da se u ovom istraživanju, ali i istraživanju drugih autora (Ciesla i sar., 2012.), korelacija između stadijuma fibroze i *IL28B* polimorfizama nalazi na granici statističke značajnosti, ne može se sa sigurnošću tvrditi da su *IL28B* polimorfizmi isključivo odgovorni za progresiju fibroze kod bolesnika sa hroničnim C hepatitisom.

Kao što je i očekivano, teži stadijum fibroze jetre u pozitivnoj je korelaciji sa dužinom trajanja infekcije. Naime, hronična C virusna infekcija ima progresivni tok koja uglavnom nakon 20 godina trajanja bolesti dovodi do razvoja ciroze jetre sa rizikom za razvoj HCC (Chen i sar., 2006.). U prisustvu kofaktora – konzumiranje alkohola, HIV koinfekcija, d. mellitus, infekcija u starijem životnom dobu, brzina progresije bolesti u cirozu jetre se značajno ubrzava, a time i rizik za nastanak njenih komplikacija (Hutchinson i sar., 2005., Benhamou i sar., 2001.).

Povezanost između bazalnog nivoa viremije i polimorfizama je ispitivana u većem broju studija. U nekoliko istraživanja nađena je povezanost između C alela na poziciji rs12979860 i višeg nivoa bazalne viremije (Fried i sar., 2002., Hadziyannis i sar., 2004., Manns i sar. 2001.). Viši viral load je zabeležen kod pacijenata sa povoljnim CC genotipom (McCarthy i sar., 2010. Lagging i sar., 2011. Ge i sar., 2009., Rauch i sr., 2010.). U radu Lagginga i sar. uočena je statistički značajna razlika u nivou bazalne virusne replikacije između CC i TT rs12979860, kao i između AA i GGr12980275 i između TT i GG rs8099917. Iako zvuči paradoksalno, niži

viral load je prisutan kod pacijenata sa nepovoljnim genotipovima TTrs12979860, GGrs12980275 i GG rs8099917 (Lagging i sar. 2011.). Zašto je to tako, još uvek nije objašnjeno. Ima, naravno utora koji nisu uočili ovu korelaciju (Fattovich i sar., 2012.).

Analizom rezultata ovog istraživanja zabeležen je niži viral load kod bolesnika sa GGrs8099917 ($\rho = -0.23$, $p = 0.007$, $p < 0.05$). Međutim, nije utvrđeno postojanje povezanosti između drugih ispitivanih polimorfizama i *IL28B* profila i bazalne viremije. Možda objašnjenje za ovu pojavu treba tražiti u ranije objavljenim istraživanjima koja su pokazala da postoji korelacija između bazalnog viral load-a i serumskog nivoa IFN- $\lambda 3$. Smatra se da viši stepen virusne replikacije uzrokuje ushodnu regulaciju IFN- $\lambda 3$ (Rallón i sar., 2012.). Po nekim autorima (Langans i sar., 2011.) bazalni nivo IFN- $\lambda 3$ je viši kod bolesnika sa CCrs12979860 nego kod onih sa CT ili TT. Dalje, egzogena primena IFN- α takođe dovodi do ushodne regulacije IFN- $\lambda 3$ i verovatno je uslovljena *IL28B* polimorfizmima, tj. u prisustvu povoljnih *IL28B* genotipova serumski nivo IFN- $\lambda 3$ će biti viši. Dakle, kod pacijenata sa višom bazalnom viremijom prisutan je i viši bazalni nivo IFN- $\lambda 3$, a egzogena primena IFN- α dovodi do daljeg povećanja serumskog nivoa IFN- $\lambda 3$. Nakon 4 nedelje primene PEG-IFN/RBV nivo IFN- $\lambda 3$ se povećava, posebno kod bolesnika sa CCrs12979860. Međutim, nije ustanovljena povezanost između nivoa IFN- $\lambda 3$ i SVR što se ne uklapa u model po kojem je ushodna regulacija IFN- $\lambda 3$ tokom primene IFN- α veza između *IL28B* genotipova i ishoda terapije (Rallón i sar., 2012.).



6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- ❖ među analiziranim polimorfizmima najveću prevalencu ima homozigot $TT_{rs8099917}$ 63.2%, odnosno heterozigoti $CT_{rs12979860}$ 58.8% i $AG_{rs12980275}$ 55.0%; prevalenca $CC_{rs12979860}$, $AA_{rs12980275}$ i $TT_{rs8099917}$ je veća u grupi pacijenata koji su odgovorili na primenjenu terapiju zbog čega se mogu nazvati „povoljnim“ genotipovima, dok su prevalencije $GG_{rs8099917}$ i $TT_{rs12979860}$ veće u grupi koja nije postigla odgovor na terapiju – to su „nepovoljni“ genotipovi;
- ❖ najjaču pozitivnu prediktivnu vrednost imaju $CC_{rs12979860}$ i $AA_{rs12980275}$, dok $TT_{rs12979860}$ i $GG_{rs8099917}$ imaju najjaču negativnu prediktivnu vrednost;
- ❖ najveću statističku značajnost u predikciji SVR imaju:
 - *IL28B* profili: $TT_{rs8099917}$ ili $AA_{rs12980275}$ ili $CC_{rs12979860}$
 - uzrast pacijenta
 - nekroinflamatorna aktivnost jetre
- ❖ Međusobno upoređivanje prognostičkih faktora pokazalo je da su:
 - lakši stadijum fibroze i niža bazalna viremija u korelaciji sa $GG_{rs8099917}$
 - viša serumska aktivnost AST i veći stepen nekroinflamatorne aktivnosti jetre povezani, dok je niža serumska aktivnost AST u korelaciji sa $TT_{rs8099917}$;
- ❖ na osnovu sprovedenog istraživanja može se reći da su se od analiziranih parametara kao nezavisni prediktori stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom genotip 1 koji se leče po protokolu PEG-IFN/RBV tokom 48 nedelja izdvojili *IL28B* profili koji imaju makar jedan „povoljan“ genotip - $TT_{rs8099917}$ ili $AA_{rs12980275}$ ili $CC_{rs12979860}$;
- ❖ na osnovu svih dobijenih rezultata može se reći da određivanje *IL28B* genotipova više polimorfizama pojedinačnih nukleotida ima važnu ulogu u donošenju odluke o konačnom izboru terapije (dvojna vs. trojna terapija); kod pacijenata sa makar jednim „povoljnim“ *IL28B* genotipom, može se očekivati dobar ishod standardne, dvojne terapije, dok kod bolesnika sa svim „nepovoljnim“ genotipovima, treba razmotriti uvođenje trojne terapije.

7. LITERATURA

Abe H, Hayes CN, Ochi H. i sar. IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. *Journal of Hepatology* 2011;54:1094–1101.

Abe H, Hayes CN, Ochi H. i sar. Inverse association of IL28B genotype and liver mRNA expression of genes promoting or suppressing antiviral state. *J Med Virol* 2011;83:1597-607.

Agúndez JA, García-Martin E, Maestro ML. i sar. Relation of IL28B gene polymorphism with biochemical and histological features in hepatitis C virus-induced liver disease. *PLoS One* 2012;7:e37998.

Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M. i sar. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010;52:421-9.

Alberti A, Chemello L, Benvegnù L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.*; Suppl 1:17-24.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):62S-65S.

Arima T, Takamizawa A, Mori C. i sar. A lambda gt11-cDNA clone specific for chronic hepatitis C generated from pooled serum presumably infected by hepatitis C virus. *Gastroenterol Jpn* 1989;24:545-8.

Armstrong FL, Alter MJ, McQuilan GM. i sar. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2000;31:777-82.

Arora S, Thornton K, Murata G. i sar. Outcomes of treatment for hepatitis C virus infection by primary care providers. *N Engl J Med* 2011;364:2199-207.

Asselah T, Bieche I, Narguet S. i sar. Liver gene expression signature to predict response to Pegylated interferon plus Ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2008; 57:516-524.

Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, i sar. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364:1207-17.

Balagopal A, David L. Thomas, Thio C. IL28B and the Control of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 2010;139: 1865–1876

Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatology* 2009;51:810–820.

Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003;37:493-503.

Beeson PB. Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or

plasma. Report of 7 cases. JAMA 1943;121:1332.

Beinhardt S, Staettermayer AF, Rutter K. i sar. Treatment of chronic hepatitis C genotype 1 patients at an academic center in Europe involved in prospective, controlled trials: is there a selection bias? Hepatology 2012;55:30-8.

Benhamou Y, Di Martino V, Bochet M. i sar. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. Hepatology 2001;34:283-7.

Berenguer M, Prieto M, Rayón JM. i sar. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. Hepatology 2000;32:852-8.

Biswal BK, Cherney MM, Wang M. i sar. Crystal structures of the RNA-dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggest mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors. J Biol Chem 2005;280:18202-10.

Blumberg BS, Gersley BJS, Hungerford DA. i sar. A serum antigen (Australia antigen) in Down syndrome, leukemia, and hepatitis A. Ann Intern Med 1967;66:924-31.

Bochud PY, Bibert S, Negro F. i sar. IL28B polymorphisms predict reduction of HCV RNA from the first day of therapy in chronic hepatitis C. J Hepatol 2011;55:980-988.

Bonacini M, Puoti M. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta-analysis of sexual and vertical transmission, and therapeutic issues. Arch Intern Med 2000;160:3365-73.

Bradley DW, McCaustland KA, Mori C. i sar. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. Gastroenterology 1985;88:773-9.

Bruno S, Battezzati PM, Bellati G. i sar. Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon-alfa therapy for chronic hepatitis C. J Hepatol 2001;34:748-55.

Calvaruso V, Craxi A. Extrahepatic Manifestation of Chronic HCV. U: Chronic Hepatitis C Virus. Advances in Treatment, Promise for the Future. Shiffman ML ed. Springer Science Business Media 2012:61-73.

Cammà C, Di Bona D, Schepis F. i sar. Effect of peginterferon alfa-2a on liver histology in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. Hepatology 2004;39:333-42.

Cammà C, Giunta M, Andreone P, Craxi A. Interferon and prevention of

hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol.* 2001;34:593-602.

Chen CH, Sheu JC, Wang JT. i sar. Genotypes of hepatitis C virus in chronic liver disease in Taiwan. *J Med Virol* 1994;44:234–236.

Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006;3:47-52.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ. i sar. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.

Cieśla A, Bociąga-Jasik M, Sobczyk-Krupiarz. I sar. IL28B polymorphism as a predictor of antiviral response in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2012;18:4892-7.

Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B Genomic-Based Treatment Paradigms for Patients With Chronic Hepatitis C Infection: The Future of Personalized HCV Therapies. *Am J Gastroenterol* 2011;106:38–45.

Conjeevaram HS, Fried MW, Jeffers LJ. i sar. Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. *Gastroenterology* 2006;131:470-477.

Davis GL, Alter MJ, El-Serag H, Poynard T, Jennings LW. Aging of hepatitis C virus (HCV) - infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology* 2010;138:513-21.

Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V. I sar. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1493-9.

Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP. i sar. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:645-52.

Davis GL. Chronic hepatitis C and liver transplantation. *Rev Gastroenterol Disord* 2004;4:7-17.

De Francesco R. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999;31(Suppl 1): 47–53.

Delić D, Mitrović N, Popović. i sar. Kombinovana antivirusno-imunomodulatorna terapija: primena pegilovanog interferona alfa-2a i ribavirina kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C. *Srp Arch* 2012;140:612-618.

Delić D, Simonović J, Švrtlih N. i sar. Epidemiološke karakteristike hepatitis C infekcije u Srbiji. *Medicinska istraživanja* 2008;42:37-42.

Delić D. Epidemiološke karakteristike HCV infekcije. U: Hronični virusni

hepatitis. *Zavod za udžbenike, Beograd* 2012:102-112.

Di Marco V, Bronte F, Calvaruso V. i sar. IL28B polymorphisms influence stage of fibrosis and spontaneous or interferon-induced viral clearance in thalassemia patients with hepatitis C virus infection. *Haematologica* 2012;97:679-86.

Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM. i sar. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006-7.

Dill MT, Dpung FH, Vogt JE. i sar. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 2011;140:1021-1031.

Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 2007;13:406-15.

Duvoux C, Pawlotsky JM, Bastie A. i sar. Low HCV replication levels in end-stage hepatitis C virus-related liver disease. *J Hepatol.* 1999;31:593-7.

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatology* 2011:245-264

Everhart JE, Ruhl CE. Burden of digestive diseases in the United States Part III: Liver, biliary tract, and pancreas. *Gastroenterology* 2009;136:1134-44.

Falletti E, Bitetto D, Fabris C. i sar. Role of interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype. *J Clin Immunol* 2011;31:891-9.

Fattovich G, Covolo L, Bibert S. i sar. IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:1162-1172.

Fattovich G, Giustina G, Degos F. i sar. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112:463-72.

Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005;436:967-72.

Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML. i sar. Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 2005;43:425-33.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR. i sar. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-82.

Ge D, Fellay J, Thompson AJ. i sar. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis

C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461:399-401.

Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seff LB; American Association for Study of Liver Diseases. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011;54:1433-44.

Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008;14:4300-8.

Grady BP, Prins M, van der Loeff MS. The sexual transmission rate of HCV among heterosexual couples. *Hepatology* 2013 Feb 19. doi: 10.1002/hep.26331. [Epub ahead of print]

Gupta G, Qin H, Song J. Intrinsically unstructured domain 3 of Hepatitis C virus NS5A forms a "Fuzzy Complex" with VAPB-MSP domain which carries ALS-causing mutations. *PLoS One* 2012;7:e39261.

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR. i sar. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-55.

Hagan H, Pouget ER, Williams IT. i sar. Attribution of hepatitis C virus seroconversion risk in young injection drug users in 5 US cities. *J Infect Dis* 2010; 201:378-85.

Halfon P, Bourliere M, Ouzan D. i sar. A single IL28B genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C Genotype 1 virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:931-935.

Haydon GH, Jarvis LM, Simmonds P, Hayes PC. Association between chronic hepatitis C infection and hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1995;345:928-929.

Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG. i sar. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 2000;343:1673-80.79

Honda M, Sakai A, Yamashita T. i sar. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010;139:499-509.

Hori K, Shin WS, Hemmi C, Toyo-oka T, Makino T. High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol* 2003;4:477-484.

Huang CF, Yeh ML, Hsieh MH. i sar. Clinical utility of host genetic IL-28B variants in hepatitis C virus genotype 1 Asian patients retreated with pegylated interferon plus ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1515-20.

Hutchinson SJ, Bird SM, Goldberg DJ. Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:1150-9.

Inglesby TV, Rai R, Astemborski J. *et al.* A prospective, community-based evaluation of liver enzymes in individuals with hepatitis C after drug use. *Hepatology* 1999;29:590-6.

Jacobson IM, Brown RS, Freilich B. *et al.* Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology* 2007;46:971-981.

Jensen D, Pol S. IL28B polymorphism testing in the era of direct acting antivirals therapy for chronic hepatitis C: ten years too late? *Liver Int* 2012;1478-3233.

Jia Z, Ding Y, Tian S, Niu J, Jiang J. Test of IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients treated with PegIFN and ribavirin depends on HCV genotypes: results from a meta-analysis. *PLoS One* 2012;7:e45698.

Kanwal F, Bacon BR. Does Treatment Alter the Natural History of Chronic HCV? U: *Chronic Hepatitis C Virus. Advances in Treatment, Promise for the Future.* Shiffman ML. ed. Springer Science Business Media 2012:103-112.

Kjaergard LL, Krogsgaard K, Gluud C. Interferon alfa with or without ribavirin for chronic hepatitis C: systematic review of randomised trials. *BMJ* 2001;323:1151-5.77

Krugman S, Files JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 1967;200:365-73.

Lagging M, Askarieh G, Negro F. *et al.* Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* 2011;6:e17232

Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I. *et al.* Interferon-lambda serum levels in patients with hepatitis c. *J Hepatol* 2011;54:859-65.

Laskus T, Wang LF, Radkowski M. *et al.* Exposure of hepatitis C virus (HCV) RNA-positive recipients to HCV RNA-positive blood donors results in rapid predominance of a single donor strain and exclusion and/or suppression of the recipient strain. *Journal of Virology* 2001;7:2059-66.

Lauer GM, Lucas M, Timm J. *et al.* Full-breadth analysis of CD8+ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection and early therapy. *J Virol* 2005;79:12979-88.

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.

Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009;29 (Suppl 1):74-81.

Lee DS, Sung YC, Whang YS. Distribution of HCV genotypes among blood donors, patients with chronic liver disease, hepatocellular carcinoma, and patients on maintenance hemodialysis in Korea. *J Med Virol* 1996;49:55–60.

Lehmann M, Meyer MF, Monazahian M. i sar. High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection. *J Med Virol* 2004;73:387-91.

Levine RA, Sanderson SO, Plutz-Snyder R. i sar. Assessment of fibrosis progression in untreated Irish women with chronic hepatitis C contracted from immunoglobulin anti-D. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1271-7.

Mangia A, Thompson AJ, Santoro R. i sar. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology* 2010;139:821-7.

Manns M, Lindsay K.L., Gordon S.C. i sar. Sustained virological response after peginterferon alfa -2B and ribavirin treatment predicts long-term clearance of HCV at 5-year follow up. *J Hepatology* 2008;48: S300.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC. i sar. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa - 2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-982.

Marcellin P, Cheinquer H, Curescu M. i sar. High sustained virologic response rates in rapid virologic response patients in the large real-world PROPHECY cohort confirm results from randomized clinical trials. *Hepatology* 2012; 56: 2039–2050.

Marcello MP, Grakoui A, Barba-Spaeth G. i sar. Interferons alfa and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 2006; 131:1887-1898.

McCarthy JJ, Li JH, Thompson A. i sar. Replicated Association between an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Gastroenterology* 2010;138: 2307–2314.

McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER. i sar. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485-92.

McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML. i sar. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009;361:580-93.

McHutchison JG, Manns M, Patel K. i sar. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis

C. Gastroenterology 2002;123:1061-9.

Moghaddam A, Melum E, Reinton N. i sar. IL28B genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection Hepatology 2011;53:746-54.

Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C. i sar. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. Hepatology 2010;52:33-37.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol 2007;5:453-63.

Murakami J, Nagata I, Iitsuka T. i sar. Risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus: Maternal high viral load and fetal exposure in the birth canal. Hepatol Res 2012;42:648-57.

Nakano, Tatsunori. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. Liver International 2011;32:339-45.

Nguyen TT, Sedghi-Vaziri A, Wilkes LB. i sar. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. J Viral Hepat 1996;3:75-8.

O'Brien TR. Interferon- α , interferon- λ and hepatitis C. Nature Genetics 2010;10:1048-50.

O'Farrell D, Trowbridge R, Rowlands D, Jager J. Substrate complexes of hepatitis C virus RNA polymerase (HC-J4); structural evidence for nucleotide import and de-novo initiation. J Mol Biol 2003;326:1025-35.

Ohno O, Mizokami M, Wu RR. i sar. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. J Clin Microbiol 2007;35:201-207.

Omata M, Yokosuka O, Takano S. i sar. Resolution of acute hepatitis C after therapy with natural beta interferon. Lancet 1991;338:914-5.76

Page K, Hahn JA, Evans J. i sar. Acute hepatitis C virus infection in young adult injection drug users: a prospective study of incident infection, resolution, and reinfection. J Infect Dis 2009;200:1216-26.

Pár A, Pár G, Tornai I. i sar. IL28B CC genotype: a protective factor and predictor of the response to interferon treatment in chronic hepatitis C virus infection. Orv Hetil 2013;154:1261-8.

Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C. i sar. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. Hepatology 2000;32:654-9.

Perumalswami P, Kleiner DE, Lutchman G. Steatosis and progression of fibrosis in untreated patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2006;43:780-7.

Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR. i sar. SPRINT-2 Investigators. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364:1195-206.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997;349:825-32.

Poynard T, Ratziu V, Charlotte F. i sar. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:730-9.

Prince AM, Brotman B, Grady GF. i sar. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B serum. *Lancet* 1974;2:241-6.

Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control* 1995;23:273-7.

Rahman F, Heller T, Sobao Y. i sar. Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C. *Hepatology* 2004;40:87-97.

Rallón NI, Soriano V, Naggie S, Restrepo C, McHutchison J. i sar. Impact of IL28B gene polymorphisms on interferon- λ 3 plasma levels during pegylated interferon- α /ribavirin therapy for chronic hepatitis C in patients coinfecting with HIV. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1246-9.

Rauch A, Kutalik Z, Descombes P. i sar. Genetic variations in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010;138:1138-1345.

Reddy KR, Shiffman ML, Morgan TR. i sar. Impact of ribavirin dose reductions in hepatitis C virus genotype 1 patients completing peginterferon alfa-2a/ribavirin treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:124-9.

Rigat K, Wang Y, Hudyma T. i sar. Ligand-induced changes in hepatitis C virus NS5B polymerase structure. *Antiviral Res* 2010; 88:197–206.

Riva E, Scagnolari C, Monteleone K. i sar. Interleukin-28B (IL-28B) single-nucleotide polymorphisms and interferon plus ribavirin treatment outcome in Italian chronically HCV-infected patients. *Journal of Viral Hepatitis* 2012;19:650–653.

Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am J Epidemiol* 2009;169:505-514.

Rodriguez-Torres M, Jeffers LJ, Sheikh MY. i sar. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in Latino and non-Latino whites with hepatitis C. *N Engl J Med* 2009;360:257-67.

Rosen HN. Hepatitis C pathogenesis: mechanisms of viral clearance and liver injury. *Liver Transpl* 2003;9:S35-43.

Ryder SD, Beckingham IJ. Acute hepatitis. *BMJ* 2001; 322:151-153.

Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P. i sar. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* 2006;43:1303-10.

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

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W. i sar. IL-28B, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003;4:63-68.

Shiffman ML. Response-guided therapy. U: *Chronic Hepatitis C Virus. Advances in Treatment, Promise for the Future.* Shiffman ML ed.. Springer Science Business Media 2012:159-169.

Simmonds P, Bukh J, Combet C. i sar. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962–73.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA. i sar. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391–2399.

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85: 3173-3188.

Smith KR, Suppiah V, O'Connor K. i sar. Identification of improved IL28B SNPs and haplotypes for prediction of drug response in treatment of hepatitis C using massively parallel sequencing in a cross-sectional European cohort. *Genome Med* 2011;3: 57.

Song H, Li J, Shi S. i sar. Thermal stability and inactivation of hepatitis C virus grown in cell culture. *Viol. J* 2010;7:40.

Sporea I, Popescu A, Curescu M. i sar. The correlation of IL28B genotype with sustained virologic response in Romanian patients with chronic hepatitis C. *Hepat Mon* 2011;11:975-979.

Stamenkovic G, Žerjav S, Veličković ZM. i sar. Distribution of HCV genotypes among risk groups in Serbia. *Eur J Epidemiol* 2000;16:949-54.

Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G. i sar. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nature Genetics*

2009;41:1100-1104.

Sutton AJ, Hope VD, Mathei C. i sar. A comparison between the force of infection estimates for blood-borne viruses in injecting drug user populations across the European Union: a modelling study. *J Viral Hepat* 2008;15:809-16.

Swain M, Lai M, Shiffman M. i sar. Treatment of patients with chronic hepatitis C (CHC) with peginterferon alfa-2a (40KD) (Pegasys) alone or in combination with ribavirin (copegus) results in long - lasting sustained virological response *J of Hepatology* 2007; 46:S3-S3.

Švrtlih N, Delić D, Simonović J. i sar. Hepatitis C virus genotypes in Serbia and Montenegro: the prevalence and clinical significance. *World J Gastroenterol* 2007;13:355-60.

Švrtlih N, Jevtović D, Simonović J. i sar. Older age at the time of liver biopsy is the important risk factor for advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterol* 2007;54:2324-7.

Takada A, Tsutsumi M, Zhang SC. i sar. Relationship between hepatocellular carcinoma and subtypes of hepatitis C virus: a nationwide analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:166–169.

Tan SL, Pause A, Shi Y, Sonenberg N. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:867-81.

Tanaka K, Ikematsu H, Hirohata T, Kashiwagi S. Hepatitis C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma among Japanese: possible role of type 1b (II) infection. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:742–74.

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama K. i sar. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature* 2009;41:1105-1109.

Terrault NA, Pawlotsky JM, McHutchison J. i sar. Clinical utility of viral load measurements in individuals with chronic hepatitis C infection on antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2005;12:465-72.

Tester I, Smyk-Pearson S, Wang P. i sar. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med* 2005;201:1725-31.

Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* 2008;48:418-31.

Thomas DL, Thio CL, Martin MP. i sar. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798-801.

Thompson AJ, Clark PJ, Zhu M. i sar. Genome wide association study identifies IL28B polymorphism to be associated with baseline ALT and hepatic necro-inflammatory activity in chronic hepatitis C patients enrolled in the IDEAL study. *Hepatology* 2010;52:1220A-1221A.

Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS. i sar. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010; 139:120-129.

Thompson CJ, Rogers G, Hewson P. i sar. Surveillance of cirrhosis for hepatocellular carcinoma: systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess* 2007;11:1–206.

Viladomiu L, Genescà J, Esteban JI. i sar. Interferon-alpha in acute posttransfusion hepatitis C: a randomized, controlled trial. *Hepatology* 1992;15:767-9.

Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000;20:1-16.

Wedemeyer H, Jäckel E, Wiegand J, Cornberg M, Manns MP. Whom? When? How? Another piece of evidence for early treatment of acute hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1201-3.

Wiegand J, Cornberg M, Aslan N. i sar. Fate and function of hepatitis-C-virus-specific T-cells during peginterferon - alpha 2b therapy for acute hepatitis C. *Antivir Ther* 2007;12:303-16

Wu LS, Wang H, Geng XP. Two IL28B polymorphisms are associated with the treatment response of different genotypes of hepatitis C in different racial populations: A meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2012;3:200-206.

Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:448–458.

Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K. i sar. Hepatitis C virus genotypes and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1995;76:1352–1355.

Yu ML, Chuang WL. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:336–345.

Yu MI, Dai CZ, Huang JF. i sar. Rapid virological response and treatment duration for chronic hepatitis C genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009;360:1827-1838.

Zeuzem S, Berg T, Moeller B. i sar. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Vir Hep* 2009;16:75-90.

Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J. i sar. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000;343:1666-72.

SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

AFP– alfa- feto protein
Ag – antigen
AGMA - antiglatkomišićna antitela
ALT – alanin-aminotransferaza
ALT - alanin-aminotrasferaza
AMA - antimitohondrijalna antitela
ANA - antinuklearna antitela
anti-LKM 1 - antitela na antigen jetre, bubrega i mišića)
antiTPO - antimikrozomalna antitela
AST - aspartat-aminotransferaza
At - antitelo
BMI - body mass index
C protein – protein jezgra
CD4+ - površinski molekul sa ekspresijom na T limfocitima
CD8+ - površinski molekul sa ekspresijom na T limfocitima
cEVR – kompletan rani virusološki odgovor
DRL – desni rebarni luk
EASL – Evropsko udruženje za izučavanje bolesti jetre (eng. European Association for the Study of the Liver, EASL)
ELISA – enzimoimuno test, enzimima posredovana reakcija za dokazivanje antitela ili antigena (eng. Enzyme linked immunosorbent assay)
EOT – kraj terapije (eng. end of treatment)
EVR - rani virusološki odgovor
GGT – gama glutamil transferaza
GWAS – Studije ispitivanja celog genoma (eng. Genome Wide Association Studies)
HAV – hepatitis A virus
HBsAg – hepatitis B s (površinski) antigen
HBV – hepatitis B virus
HCC - hepatocelularni karcinom
HCV – hepatitis C virus
HCV RNK – ribonukleinska kiselina hepatitis C virusa
HDV - hepatitis D virus
HEV - hepatitis E virus
HGV - hepatitis G virus
HIV – virus humane imunodeficijencije
HLA – humani leukocitarni antigen
HWE - Hardy-Weinbeg ekvilibrijumu
IFN – interferon

Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom

IFN α R – interferon alfa receptor
IFN- γ – interferon gama
IFN- λ – interferon lambda
IL – interleukin
IL28A – interleukin 28A
IL28B – interleukin 28B
IL29 – interleukin 29
IP-10 - interferon gama inducibilni protein – 10
IR - insulinska rezistencija
ISG – interferonom stimulisani geni
ISGF3- interferonom stimulisani genski faktor 3
ISRE- interferonom stimulisani element odgovora
IVDU - intravenski uživaoci droga
JAK – janus-kinaza
LD – uzajamna povezanost nukleotida (eng. linkage disequilibrium)
MHC – glavni histokompatibilni kompleks (eng. Major Hystocompatibility Complex, MHC)
NASH - nealkoholni steatohepatitis
NK ćelije – prirodne ćelije ubice (eng. natural killer cells)
NPV – negativna prediktivna vrednost
PEG – polietilen glikol
PEG-IFN - pegilovani interferon
pEVR – parcijalni rani virusološki odgovor
PI – inhibitori proteaze
PPV – pozitivna prediktivna vredost
RBV – ribavirin
Real-time PCR - lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
RGT - odgovorom vođena terapija (eng. respons guided therapy)
RNK – ribonukleinska kiselina
RVR - brzi virusološki odgovor
s.c. – potkožno (eng. subcutaneusly)
Sn- senzitivnost
SNP - polimorfizam pojedinačnog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism)
Sp – specifičnost
SSP-PCR - Sequence specific primer – PCR
STAT – provodnik signala i aktivator transkripcije
SVR – stabilan virusološki odgovor
TE - tranzitorna elastografija
TNF- α – tumor nekrotišući faktor alfa

BIOGRAFIJA

Jelena Z. Đorđević, rođena je 12. 02. 1974.godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu i prirodno-matematičku gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1992. godine i diplomirala 7. decembra 1998. godine sa prosečnom ocenom 9.46. Postdiplomske studije iz Digestivih bolesti obavila je na Medicinskom fakulteru u Beogradu. Magistarsku tezu pod nazivom „Korelacija ezofagogastričnih variksa i portne hipertenzivne gastropatije kod pacijenata sa cirozom jetre“ čije je mentor Prof. dr R. Ješić i komentor Prof. dr B. Bapćević, odbranila je 5. aprila 2006. godine. Specijalistički ispit iz Interne medicine položila je 2004. godine sa odličnim uspehom i stekla zvanje specijaliste interne medicine.

Od 2000. godine zaposlena je na Klinici za Interne bolesti Kliničko bolničkog Centra „Zvezdara“, a od 2004. godine na Kliničkom Odeljenju za gastroenterologiju i hepatologiju.

Tromesečno stručno usavršavanje na Odeljenju gastroenterologije i hepatologije u John Radcliff bolnici u Oxfordu obavila je 2010. godine.

Dr Jelena Đorđević je autor i koautor radova na nekoliko domaćih i međunarodnih kongresa. Autor je i koautor nekoliko radova štampanih u domaćim i časopisima od međunarodnog značaja.

Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora
pacijenata sa hroničnim C hepatitisom

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а ЈЕЛЕНА ЂОРЂЕВИЋ

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЗНАЧАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА IL28B У ПРЕДИКЦИЈИ
СТАБИЛНОГ ВИРУСОЛОШКОГ ОДГОВОРА ПАЦИЈЕНАТА СА ХРОНИЧНИМ C
ХЕПАТИТИСОМ

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

У Београду, 20/02/2014

Потпис докторанда

Ђорђевић

Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ЈЕЛЕНА ЂОРЂЕВИЋ

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада ЗНАЧАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА ИЛ-28Б У ПРЕДИКЦИЈИ СТАБИЛНОГ ВИРУСОЛОШКОГ ОДГОВОРА ПАЦИЈЕНАТА СА ХРОНИЧНИМ Ц ХЕПАТИТИСОМ

Ментор ПРДФ. ДР ПЕТАР СВОРЦАН

КОМЕНТОР ДОС. ДР ИВАНА ЛАЗАРЕВИЋ

Потписани ЈЕЛЕНА ЂОРЂЕВИЋ

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 20/02/2014

Ђорђевић

Značaj genskih polimorfizama IL28B u predikciji stabilnog virusološkog odgovora pacijenata sa hroničnim C hepatitisom

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ЗНАЧАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА ИЛ-28Б У ПРЕДИКЦИЈИ СТАБИЛНОГ ВИРУСОЛОШКОГ ОДГОВОРА ПАЦИЈЕНАТА СА ХРОНИЧНИМ Ц ХЕПАТИТИСОМ
која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 20/02/2014

