

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

Magdalena Perić

**Polimorfizmi gena Toll-like receptora 2 i 4  
kod oboljelih od kroničnog hepatitisa C**

Doktorski rad

Osijek, 2012.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

Magdalena Perić

**Polimorfizmi gena Toll-like receptora 2 i 4  
kod oboljelih od kroničnog hepatitisa C**

Doktorski rad predložen  
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije  
radi stjecanja akademskog stupnja  
doktora molekularnih bioznanosti - modul biomedicina

Osijek, 2012.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku mikroorganizama i u Laboratoriju za serološku dijagnostiku Službe za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, pod vodstvom prof. dr. sc. Jerka Barbića, dr. med., u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog interdisciplinarnog doktorskog studija Molekularnih bioznanosti na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

## ZAHVALA

Ponajprije zahvaljujem svojoj majci i svom poslodavcu, Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije u Osijeku, na financiranju doktorskog poslijediplomskog studija.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Jerku Barbiću, dr. med. na beskonačnom strpljenju i suradnji te osobito na konkretnim komentarima u pravim trenucima.

Na pomoći i podršci te financiranju dijela doktorskog rada zahvaljujem ravnatelju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, dr. sc. Stjepanu Rudanu, dipl. oec.

Zahvaljujem voditeljici Službe za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, dr. Dubravki Vuković, spec. mikrobiologije s parazitologijom na podršci u začetku izrade ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem voditeljici Odjela za serološku dijagnostiku Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, mr. sc. Arlen Antolović-Požgain, spec. mikrobiologije s parazitologijom na susretljivosti i velikoj pomoći u izvođenju serološke dijagnostike te djelatnicima Odjela za serološku dijagnostiku, Dragici Georgijevski, dipl. ing. med. lab. diagn. i Mariji Pintarić, lab. teh., na pomoći u izvođenju seroloških testova.

Također zahvaljujem djelatnicama Službe za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije na pomoći u prikupljanju uzoraka i podataka, a posebno Ivanki Vorih i Nikolini Pejić.

Za statističku obradu podataka zahvaljujem Bojanu Šarkanj, dipl. ing. s Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku.

Na lektoriranju doktorskog rada zahvaljujem prijateljici doc. dr. sc. Ivani Jozić s Filozofskog fakulteta u Osijeku.

Na stručnoj podršci i strpljenju zahvaljujem svojim radnim kolegama dr. sc. Zinki Bošnjak, dipl. ing. i Svenu Burianu, lab. teh.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i podršci.

Doktorski rad posvećujem roditeljima.

## SADRŽAJ

---

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	VIII
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	IX
POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	X
1. UVOD.....	1
1.1. Građa i umnožavanje virusa hepatitisa C.....	2
1.1.1. Građa virusa hepatitisa C.....	2
1.1.2. Umnožavanje virusa hepatitisa C.....	5
1.2. Genotipovi virusa hepatitisa C.....	7
1.3. Epidemiologija infekcije virusom hepatitisa C.....	9
1.3.1. Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa C u svijetu.....	9
1.3.2. Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa C u Hrvatskoj.....	11
1.3.3. Putevi prijenosa i čimbenici rizika za nastanak infekcije hepatitisom C.....	13
1.4. Klinička slika infekcije virusom hepatitisa C.....	14
1.4.1. Akutni hepatitis C.....	14
1.4.2. Kronični hepatitis C.....	15
1.5. Liječenje hepatitisa C.....	16
1.6. Toll-like receptori.....	20
1.6.1. Toll-like receptori i njihovi ligandi.....	20
1.6.2. Građa Toll-like receptora.....	22
1.6.3. Toll-like receptor 2.....	22
1.6.4. Toll-like receptor 4.....	23
1.7. Polimorfizmi unutar gena za Toll-like receptore.....	23
1.7.1. Polimorfizmi gena <i>tlr2</i> i <i>tlr4</i> .....	24
1.8. Imunosni odgovor na virusnu infekciju.....	25
1.8.1. Prirođena imunost.....	26
1.8.2. Stečena imunost.....	27
1.9. Toll-like receptori i imunosni odgovor na infekciju virusom hepatitisa C.....	28

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA.....	31
3. ISPITANICI I METODE RADA.....	33
3.1. Ispitanici.....	33
3.2. Metode rada.....	34
3.2.1. Određivanje protutijela imunoenzimnim postupkom.....	34
3.2.1.1. Određivanje protutijela korištenjem komercijalno dostupnog test paketa Monolisa™ Anti-HCV PLUS.....	35
3.2.2. Izolacija DNA.....	36
3.2.2.1. Izolacija DNA korištenjem komercijalno dostupnog test paketa High Pure PCR Template Preparation Kit.....	37
3.2.3. Izolacija RNA.....	38
3.2.3.1. Izolacija RNA korištenjem komercijalno dostupnog test paketa High Pure System Viral Nucleic Acid Kit.....	39
3.2.3.2. Izolacija RNA korištenjem komercijalno dostupnog test paketa Amplicor HCV Specimen Preparation Kit.....	40
3.2.4. Polimerazna lančana reakcija.....	41
3.2.4.1. PCR u stvarnom vremenu.....	42
3.2.4.2. Multipleks PCR.....	43
3.2.5. Reverzna transkripcija.....	43
3.2.5.1. RT-PCR za HCV.....	43
3.2.6. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu.....	44
3.2.6.1. Kvantitativno određivanje HCV-a korištenjem komercijalno dostupnog test paketa COBAS® TaqMan® HCV Test.....	45
3.2.7. Određivanje genotipa HCV-a.....	46
3.2.7.1. Određivanje genotipa HCV-a korištenjem komercijalno dostupnog test paketa Linear Array Hepatitis C Virus Genotyping Test.....	46
3.2.8. Određivanje polimorfizama gena <i>tlr2</i> i <i>tlr4</i> na uređaju LightCycler.....	47
3.2.8.1. Određivanje SNP-a <i>tlr2</i> gena metodom real-time PCR.....	48
3.2.8.2. Određivanje SNP-a <i>tlr4</i> gena metodom multipleks real-time PCR.....	50
3.3. Statistička obrada podataka.....	52

4. REZULTATI.....	54
4.1. Obilježja ispitanika po skupinama.....	54
4.2. Seroprevalencija HCV-infekcije i aktivna replikacija HCV-infekcije.....	58
4.3. Prevalencija genotipova HCV-a.....	59
4.4. Polimorfizmi gena <i>tlr2</i> rs5743708, <i>tlr4</i> rs4986790 i <i>tlr4</i> rs4986791.....	62
4.4.1. Polimorfizam gena <i>tlr2</i> rs5743708 za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a.....	63
4.4.2. Polimorfizam gena <i>tlr4</i> rs4986790 za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a.....	69
4.4.3. Polimorfizam gena <i>tlr4</i> rs4986791 za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a.....	76
4.5. Antivirusna terapije kod oboljelih od KHC-a.....	79
4.5.1. Usporedba genotipova HCV-a prema terapijskom odgovoru.....	81
4.5.2. Usporedba genskih varijanti za polimorfizme gena <i>tlr2</i> rs5743708, <i>tlr4</i> rs4986790 i <i>tlr4</i> rs4986791 prema terapijskom odgovoru.....	84
5. RASPRAVA.....	87
6. ZAKLJUČAK.....	99
7. LITERATURA.....	102
8. ŽIVOTOPIS.....	124
PRILOZI.....	XIV

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo  
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

### Polimorfizmi gena Toll-like receptora 2 i 4 kod oboljelih od kroničnog hepatitisa C

*Magdalena Perić, dipl. ing.*

Rad je izrađen u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Osijek

Mentor: Prof. dr. sc. Jerko Barbić, dr. med

#### Sažetak

Patogeneza kroničnog hepatitisa C (KHC) uključuje cirozu i karcinom jetre koja se ne dovodi u vezu samo s neučinkovitosti antivirusne terapije ovisne o genotipu virusa već i s imunološkim odgovorom. Određeni su rizični čimbenici prijenosa HCV-a, koncentracije protutijela na HCV, aktivna virusna replikacija, virusni genotip i genske varijante za toll-u sličnim genima (TLR) 2 i 4. Visoka učestalost KHC-a utvrđena je u dobnoj skupini od 31-40 godina starosti kod muškaraca, a kod žena u dobnoj skupini od 51-60. KHC se dovodi u svezu s transfuzijom krvi i operativnim zahvatom prije 1993. godine, mišićnom boli, gubitkom apetita, intravenskim uzimanjem droge, tetovažom i body piercingom. Najučestaliji genotip HCV-a je genotip 1 dok genotipovi 5 i 6 nisu nađeni. AG- i CT-genske varijante TLR 4 gena u odnosu na druge genske varijante pokazuju smanjeni učinak antivirusne terapije.

Broj stranica: 144

Broj slika: 28

Broj tablica: 30

Broj literaturnih navoda: 252

Jezik izvornika: hrvatski

**Ključne riječi:** antivirusna terapija, genotip, genski polimorfizam, hepatitis C virus, TLR 2, TLR 4

**Datum obrane:** 12. listopad 2012.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Mario Štefanić, dr. med.
2. Prof. dr. sc. Jerko Barbić, dr. med.
3. Dr. sc. Neven Žarković, znanstveni savjetnik

**Rad je pohranjen u:**

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb  
Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14, Zagreb  
Sveučilištu u Rijeci, Riječke rezolucije 7, Rijeka  
Sveučilištu u Splitu, Livanjska 5, Split  
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek



## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University Josip Juraj Strossmayer Osijek  
Institute Ruđer Bošković, Zagreb  
University of Dubrovnik  
University Postgraduate Interdisciplinary  
Doctoral Study of Molecular Biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Biomedicine and Health  
Scientific Field: Basic Medical Sciences

### Polymorphisms in the Toll-like receptors 2 and 4 genes in chronically infected hepatitis C patients

*Magdalena Perić, BSc*

Thesis performed at Institute of Public Health for the Osijek-Baranya County, Osijek

Supervisor: *Jerko Barbić*, PhD, MD, professor

#### Abstract

Pathogenesis of chronic hepatitis C (KHC) viral infection including cirrhosis and liver cancer is not only associated with antiviral therapy ineffectiveness that is genotype depended but also with immune response. HCV transmission risk factors, concentrations of antibodies against HCV, viral load, HCV genotypes and toll-like receptor (TLR) 2 and 4 gene variants for 60 KHC patients and 40 healthy controls were determined. The highest frequency of KHC in man was found in 31-40 yr olds and in women in 51-60 yr olds. KHC was positively correlated with surgery and blood transfusion prior to 1993, muscle pain, appetite loss, intravenous drug usage, tattooing and body piercing. The most prevalent genotype was genotype 1, while genotypes 5 and 6 were not determined. AG- and CT-genetic variants of TLR4 gene had lower antiviral therapy efficiency compared to other genetic variants.

**Number of pages:** 144

**Number of figures:** 28

**Number of tables:** 30

**Number of references:** 252

**Original in:** Croatian

**Key words:** antiviral therapy, genotype, gene polymorphism, hepatitis C virus, TLR 2, TLR 4

**Date of the thesis defense:** 12. october 2012.

#### Reviewers:

1. **Doc. dr. sc. Mario Štefanić, dr. med.**
2. **Prof. dr. sc. Jerko Barbić, dr. med.**
3. **Dr. sc. Neven Žarković, znanstveni savjetnik**

#### Thesis deposited in:

National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb  
University of Zagreb, Trg maršala Tita 14, Zagreb  
University of Rijeka, Riječke rezolucije 7, Rijeka  
University of Split, Livanjska 5, Split  
University Josip Juraj Strossmayer Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## POPIS KRATICA I SIMBOLA

---

aa	aminokiselina (engl. <i>amino acid</i> )
ALT	alanin aminottransferaza
Anti-HCV	protutijela specifična za HCV
CD	biljezi stanične diferencijacije (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>copy deoxyribonucleic acid</i> )
CMV	citomegalo virus
CpG ODN	oligodeoksinukleotidi
DC-SIGN	engl. <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin</i>
ddH <sub>2</sub> O	dvostruko destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dsRNA	dvolančana ribonukleinska kiselina (engl. <i>double-stranded RNA</i> )
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
EIA	enzimimunokemijski test (engl. <i>enzyme immunoassay</i> )
ELISA	imunoenzimski test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ETR	eng. <i>end of treatment response</i>
EVR	engl. <i>early viral response</i>
HAV	virus hepatitisa A
HBV	virus hepatitisa B
HCC	hepatocelularni karcinom
HCV QS	HCV kvantitativni standard (engl. <i>HCV quantitation standard</i> )
HCV	virus hepatitisa C
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i> )
HLA	antigeni glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka (engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i> )

Hsp 60	protein toplinskog stresa 60 kDa (engl. <i>heat shock protein 60 kDa</i> )
Hsp 70	protein toplinskog stresa 70 kDa (engl. <i>heat shock protein 70 kDa</i> )
HVR	hipervarijabilna regija (engl. <i>hypervariable region</i> )
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
IC	interna kontrola
IFA	neizravna imunofluorescencija (engl. <i>indirect immunofluorescence assay</i> )
IFN	interferon
IFN- $\alpha$	interferon alfa
IL-1R	interleukin-1 receptor
IL-2	interleukin 2 (engl. <i>interleukin 2</i> )
IRES	unutarnje mjesto ulaska u ribosom (engl. <i>internal ribosomal entry site</i> )
IRFs	engl. <i>IFN regulatory factors</i>
IU/ml	internacionalne jedinice po mililitru
IVO	intravenozna ovisnost
KHB	kronični hepatitis B
KHC	kronični hepatitis C
LD	neravnoteža vezanosti gena (engl. <i>linkage disequilibrium</i> )
LDL	lipoproteinski receptor niske gustoće (engl. <i>low density lipoprotein</i> )
LPS	lipopolisaharid
LRR	leucinom bogati ponavljajući sljedovi (engl. <i>leucine-rich repeats</i> )
L-SIGN	engl. <i>liver/lymph nodespecific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin</i>
LTR	engl. <i>long term response</i>
MDA5	engl. <i>melanoma-differentiation-associated gene 5</i>
MHC	glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NCBI	Nacionalni centar biotehnoških informacija (engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
NF- $\kappa$ B	jezgrin čimbenik kappa B (engl. <i>nuclear factor kappa B</i> )

NK	prirodnoubilačke stanice (engl. <i>natural killer</i> )
NR	engl. <i>non-response</i>
NTR	nekodirajuća regija (engl. <i>nontranslated region</i> )
OFR	otvoreni okvir za čitanje (engl. <i>open reading frame</i> )
PAMP	patogenima pridruženi molekularni sljedovi (engl. <i>pathogen associated molecular patterns</i> )
PCR	polimerazna lančana reakcija (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	polietilen glikol
PEG-IFN	pegilirani interferon
PEG-IFN- $\alpha$	pegilirani interferon alfa
PGN	peptidoglikan
PPT	engl. <i>Plasma Preparation Tube</i>
PR	engl. <i>partial response</i>
PRR	receptori za prepoznavanje uzorka (engl. <i>pattern recognition receptor</i> )
RdRp	ovisna RNA polimeraza (engl. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> )
RH	Republika Hrvatska
RIA	radioimunotest (engl. <i>radioimmunoassay</i> )
RIG-I	engl. <i>retinoic-acid-inducible protein 1</i>
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RSV	respiratorni sincicijski virus
RT	reverzna transkripcija (engl. <i>reverse transcription</i> )
RT-PCR	reverzna transkripcija s polimeraznom lančanom reakcijom (engl. <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> )
RVK	reakcija vezanja komplementa
RVR	engl. <i>rapid virologic response</i>
SAD	Sjedinjene Američke Države
SCE	izmjena sestrinskih kromatida (engl. <i>unequal sister-chromatide exchange</i> )
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SR	engl. <i>sustained response</i>

SR-BI	humani receptor čistač tipa B (engl. <i>scavenger receptor B type</i> )
ssRNA	jednolančana ribonukleinska kiselina (engl. <i>single-stranded RNA</i> )
SVR	trajni virološki odgovor (engl. <i>sustained virological response</i> )
T <sub>c</sub>	citotoksični T limfociti (engl. <i>cytotoxic T cells</i> )
TCR	receptor limfocita T
T <sub>h</sub>	pomoćnički T limfociti (engl. <i>helper T cells</i> )
TLR	toll-u slični receptori (engl. <i>toll-like receptors</i> )
<i>tlr2</i>	gen toll-like receptor 2
<i>tlr4</i>	gen toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
VB	engl. <i>viral breakthrough</i>
WB	imunoblot test (engl. <i>western blot</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )
ZZJZ	Zavod za javno zdravstvo
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\gamma$	gama
$\delta$	delta
$\mu$	mikro
<	manje
>	više

## 1. UVOD

Hepatitis C (HCV) je 1975. godine prvi put prepoznat kao zasebna bolest i tada je ustanovljeno da oko 90 % slučajeva poslijetransfuzijskog hepatitisa nije uzrokovano tada poznatim virusima hepatitisa A ili B, te su oni svrstani u grupu "non-A, non-B" hepatitis <sup>177</sup>.

Do velikog preokreta dolazi sredinom osamdesetih godina kada je Daniel W. Bradley zajedno sa svojim istraživačkim timom identificirao mali ribonukleinski (RNA, engl. *ribonucleic acid*) virus s ovojnicom <sup>33</sup>. U 1989. godini objavljeni su radovi o načinu izolacije komplementarne deoksiribonukleinske kiseline (cDNA, engl. *copy deoxyribonucleic acid*) iz "non-A, non-B" klona i o vrsti testa koji detektira protutijela na "non-A, non-B" virus. Od tada se "non-A, non-B" virus naziva virus hepatitisa C <sup>46</sup>.

Zbog slične građe genoma i polipeptida s drugim humanim flavivirusima, HCV je svrstan u porodicu *Flaviviridae*, rod *Hepacivirus* <sup>174</sup>. Elektronskim mikroskopom do sada je vizualizirana tek djelomična čestica virusa okruglog oblika, približnog promjera 50 nm <sup>95</sup>.

Toll-like receptori (TLR, engl. *toll-like receptors*) pripadaju skupini transmembranskih proteina uključenih u prepoznavanje molekularnih slijedova mikrobnog i viralnog podrijetla. Imaju ključnu ulogu u obrani organizma od patogena i bitan su čimbenik prirodne imunosti (engl. *innate immunity*), lokalizirani uglavnom na stanicama imunološkog sustava, ali su također uočeni i na drugim stanicama <sup>6</sup>. TLR prepoznaju različite ligande karakteristične za patogene kao što su lipoproteini, proteini, lipopolisaharidi, nukleinske kiseline. Vežanjem liganda putem TLR-a potiče se aktivacija imunoloških stanica na proizvodnju upalotvornih citokina te kostimulirajućih i adhezijskih molekula.

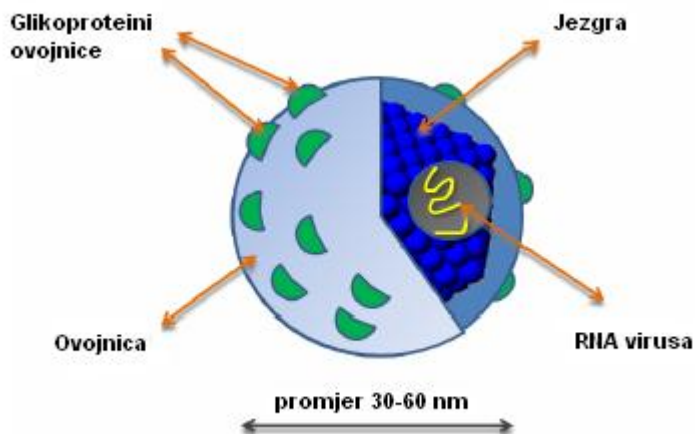
Kronična infekcija HCV-om je u 80 % slučajeva bez simptoma i dovodi se u vezu s povećanim rizikom nastanka ciroze i karcinoma jetre te povećanom smrtnosti. Za razvoj kronične infekcije najvjerojatnije je odgovoran neadekvatan imunološki odgovor domaćina. S obzirom na značaj TLR-a u oblikovanju imunološkog odgovora, pretpostavljamo da genetička raznolikost ovih receptora značajno utječe na njihovu aktivnost. Stoga rasvjetljavanje moguće veze između genskih varijanti ovih receptora

daje značajan uvid u njihovu ulogu u patogenezi bolesti. To bi moglo pomoći u prepoznavanju osoba s predispozicijom za razvoj kronične infekcije i u predviđanju odgovora na liječenje.

## 1.1. Građa i umnožavanje virusa hepatitisa C

### 1.1.1. Građa virusa hepatitisa C

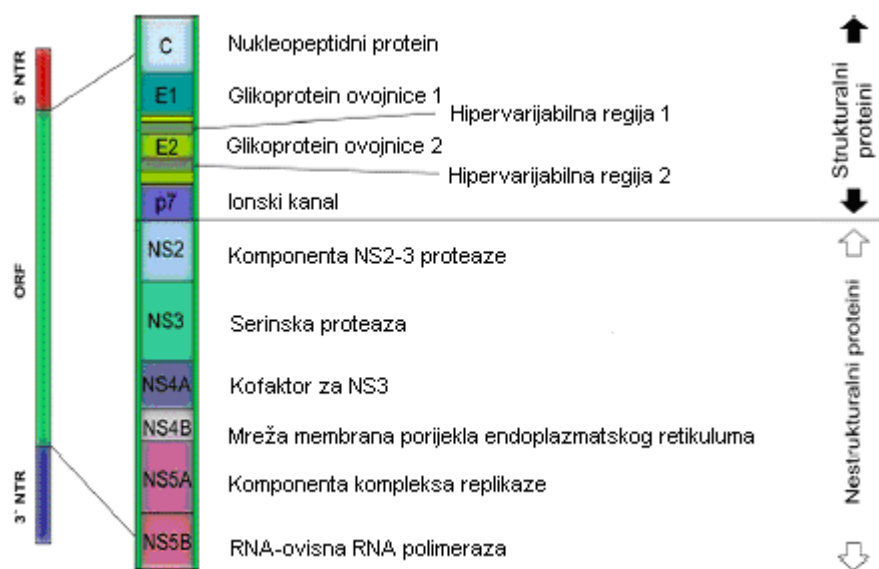
HCV je jednolančani, pozitivno usmjereni RNA virus s ovojnicom. Virusna čestica ima sferičan oblik, a veličine je oko 60 nm. Nukleokapsida je promjera 30 nm, ovijena lipidnom ovojnicom na kojoj se nalaze glikoproteinski izdanci (slika 1.1) <sup>252</sup>.



Slika 1.1. Izgled čestice HCV-a.

Izvor: Slika preuzeta od autora Grahama Colma, Structure of Hepatitis C Virus, 2008.

Genom se sastoji od 5' i 3' nekodirajućih regija (NTR, engl. *nontranslated region*) između kojih se nalazi otvoreni okvir za čitanje (ORF, engl. *open reading frame*)<sup>19</sup>. Čini ga oko 9600 baza koje kodiraju poliprotein od 3008 do 3037 aminokiselina (aa, engl. *amino acid*), (slika 1.2)<sup>48, 59</sup>. Broj aa ovisi o genotipu virusa.



Slika 1.2. Genom HCV-a.

Izvor: Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *Leukoc Biol* 2004;76:743-59.

Produkt prevođenja ORF-a je poliprotein koji se posttranslacijski cijepa pomoću virusnih i staničnih proteaza u 10 proteina. Oni uključuju strukturalne i nestrukturalne proteine<sup>61, 190</sup>.

Strukturalni proteini:

C (core) protein – sudjeluje u tvorbi nukleokapside, interferira s intracelularnim metabolizmom lipida i lipoproteina te utječe na nastanak steatoze i hepatocelularnog karcinoma (HCC)<sup>34, 59</sup>.



E1 i E2 – glikoproteini ovojnice. U području E2 glikoproteina nalaze se dvije hipervarijabilne regije, HVR-1 i HVR-2 (HVR, engl. *hypervariable region*). One čine područje najpodložnije genetskim mutacijama, a samim time mjesto najveće mogućnosti virusnog izbjegavanja obrambenim mehanizmima imunološkog sustava zaraženog pojedinca. E2 predstavlja najvarijabilniju regiju genoma i posjeduje epitope koji izazivaju stvaranje neutralizirajućih protutijela i to objašnjava perzistirajuću viremiju<sup>59, 104, 238</sup>.

p7 – ionski kanal<sup>170</sup>. Dijeli strukturalne proteine od nestrukturalnih. Ima ulogu u sazrijevanju i u oslobađanju virusa<sup>127</sup>.

Nestrukturalni proteini:

NS2 – komponenta NS2/NS3 proteaze. To je transmembranski protein koji je blisko povezan sa strukturalnim proteinima<sup>48, 59</sup>.

NS3 – serinska proteaza. Uključena je u replikaciju virusa i kao takva predstavlja ciljno mjesto antivirusne terapije<sup>48, 59</sup>.

NS4A – kofaktor za NS3<sup>61, 133</sup>.

NS4B – protein uključen u replikaciju virusa, ali je njegova točna funkcija do danas malo poznata. Predstavlja integralni protein endoplazmatskog retikuluma koji s endoplazmatskim retikulumom stanice domaćina stvara mrežu i služi kao područje interakcije virusne RNA i proteina stanice domaćina tijekom umnožavanja virusa<sup>133</sup>.

NS5A – višefunkcionalni serinski polifosforilirani protein. Ispitivanjem njegove funkcije u staničnim kulturama zaključeno je da njegove adaptacijske mutacije značajno pojačavaju učinak umnažanja virusa te da je u interakciji s različitim staničnim proteinima<sup>133</sup>.

NS5B – je ovisna RNA polimeraza (RdRp, engl. *RNA-dependent RNA polymerase*)<sup>148</sup>.

Svi nestrukturalni proteini imaju važnu ulogu u umnažanju virusa i potencijalne su ciljne točke za razvoj učinkovitih lijekova (NS5B za inhibitore polimeraza, NS3 za inhibitore proteaza). Od strukturalnih proteina, zbog svoje varijabilnosti, glikoproteini ovojnice (E1 i E2) najmanje su pouzdani kao ciljno mjesto lijekova.

### 1.1.2. Umnožavanje virusa hepatitisa C

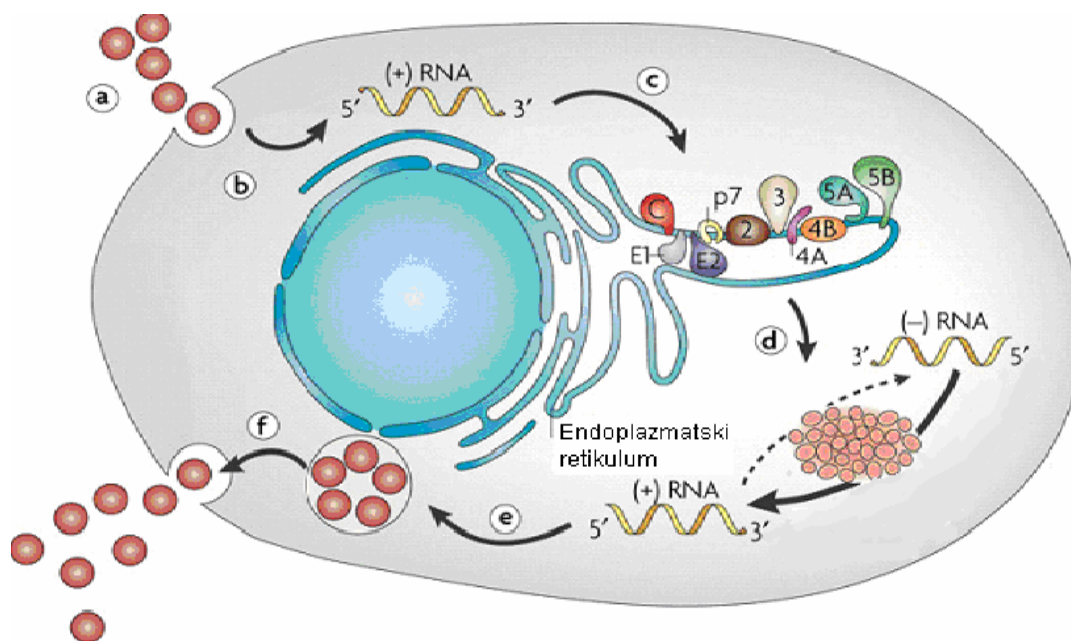
Saznanja o životnom ciklusu HCV-a temelje se uglavnom na *in vitro* istraživanjima, jer nema dobrog životinjskog modela kao niti u potpunosti učinkovite kulture stanica za ispitivanja *in vivo*. Prekretnicu u istraživanjima predstavljaju sistemi za umnožavanje dobiveni tehnologijom rekombinantne DNA: "replicon" sistemi ili rekombinantne stanične kulture hepatocita (*Huh7*)<sup>30, 128, 234</sup>. Sastoje se minimalno od nestrukturalnih regija HCV RNA (od NS3 do NS5B) ili od kompletnog genoma, sve dobiveno tehnologijom rekombinantne DNA<sup>34</sup>.

Umnožavanje HCV-a započinje vezanjem virusa za stanične receptore. Iako stanični receptori nisu točno poznati, na površini stanica dokazane su različite molekule koje se vežu s HCV-om: CD81<sup>173</sup>, lipoproteinski receptor niske gustoće (LDL, engl. *low density lipoprotein*), humani receptor čistač tipa B (SR-BI, engl. *scavenger receptor B type*)<sup>182, 183</sup>, lektini C-tipa: DC-SIGN (engl. *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin*) i L-SIGN (engl. *liver/lymph nodespecific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*)<sup>36, 225</sup>, a u novije vrijeme otkrivena su dva nova receptora Claudin-1 i Occludin<sup>87, 89</sup>.

Neki se receptori nalaze na različitim stanicama, dok su drugi specifični za pojedinu vrstu stanica. CD81 je transmembranski receptor koji pripada porodici tetraspanina, a nalazi se na mnogim humanim stanicama, uključujući hepatocite i B limfocite. CD81 se veže s HCV E2, ali je za ulazak virusa u stanicu potreban i sekundarni receptor odnosno koreceptor<sup>21, 34</sup>. SR-BI je lipoproteinski receptor visoke gustoće koji se nalazi u visokoj koncentraciji na hepatocitima i veže s HCV E2<sup>20</sup>. DC-SIGN se nalazi na dendritičkim stanicama, a L-SIGN na endotelnim stanicama jetrenih sinusoida i limfnih čvorova. Oba receptora olakšavaju ulazak HCV-a u stanicu<sup>21</sup>.

Virus ulazi u stanicu receptorom posredovanom endocitozom<sup>4</sup>. Zbog niskog pH u endosomu dolazi do konformacijskih promjena proteina ovojnice, fuzije virusa s membranom endosoma (djelovanjem E1) te otpuštanja RNA u citoplazmu<sup>34, 69</sup>. HCV RNA na 5' kraju sadrži kompleksnu strukturu tzv. IRES (engl. *internal ribosomal entry site*) koja djeluje kao unutarnje mjesto ulaska u ribosom i kontrolira početak prevođenja genoma<sup>24</sup>.

Genom djeluje kao glasnička ribonukleinska kiselina (mRNA, engl. *messenger ribonucleic acid*) i prevodi se u poliprotein. Strukturni se proteini cijepaju pomoću staničnih proteaza (signalna peptidaza), a nestrukturalni proteini pomoću virusne NS2-NS3 proteaze i NS3 serinske proteaze<sup>158</sup>. Nestrukturalni proteini NS3-NS5B se spajaju i tvore kompleks replikaze, na intracitoplazmatskim membranama, koja kodira sintezu negativnog lanca RNA, a on služi kao kalup za sintezu pozitivnog lanca genoma. Novosintetizirana genomska RNA spaja se s proteinom kapside i tvori nukleokapsidu. Virus dobiva ovojnicu pupanjem kroz unutarstanične vezikule, a iz stanice se oslobađa egzocitozom ili lizom (slika 1.3)<sup>19</sup>.



Slika 1.3. Umnožavanje virusa hepatitisa C.

a) vezanje HCV-a za stanični receptor i ulazak u stanicu; (b) svlačenje HCV-a i otpuštanje u citoplazmu; (c) prevođenje u poliprotein pomoću IRES-a; (d) replikacija RNA; (e) sastavljanje HCV-a; (f) sazrijevanje HCV-a i izlazak iz stanice

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

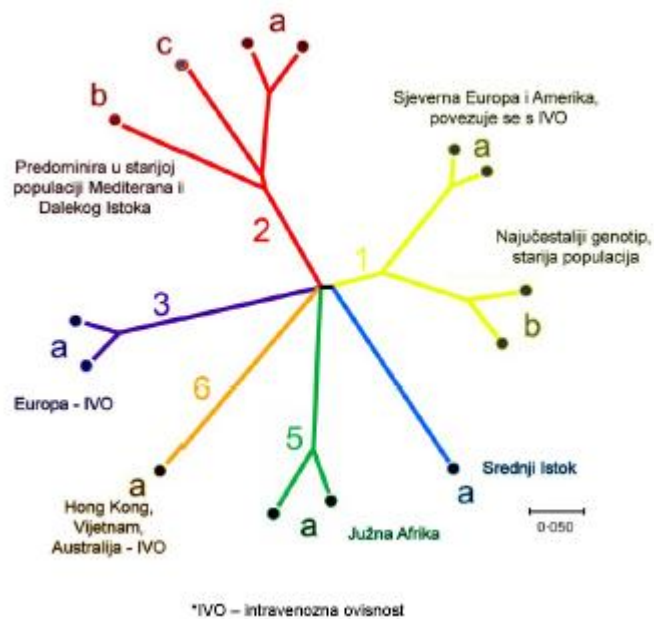
Hepatociti su primarno mjesto umnožavanja virusa i sadrže veliku količinu HCV RNA ( $10^8 - 10^{11}$  kopija/gram tkiva), što je dokazano *in situ* hibridizacijom. Virus se nalazi u citoplazmi hepatocita i ne ugrađuje se u genom stanice domaćina<sup>128</sup>. Međutim, novije su studije pokazale da se virus nalazi i u bilijarnom epitelu te mononuklearnim stanicama periferne krvi koje mogu poslužiti kao rezervoar za ponovnu reaktivaciju nakon prestanka liječenja. Umnožavanje virusa je vrlo brzo (približno  $10^{12}$  virusnih čestica na dan) s vremenom poluživota 3-5 sati<sup>19</sup>.

## 1.2. Genotipovi virusa hepatitisa C

Izolati HCV-a iz različitih dijelova svijeta pokazuju značajnu genetsku različitost. Razlog je najvjerojatnije u velikom virusnom obrtaju i u nemogućnosti adekvatnog čitanja izmjena. Genetska heterozigotnost virusa prvi je put uočena usporedbom molekularne sekvence HCV-a iz Japana s prototipom iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD). Međusobna je podudarnost iznosila 79 %<sup>95</sup>. Sekvencioniranjem uzastopnih uzoraka u kronično zaraženih pojedinaca izmjerena je prosječna učestalost mutacije od  $1,44 \times 10^{-3}$  izmjena baza nukleotida po jednoj lokalizaciji na genomu u godini dana<sup>156</sup>. Posljedično brzini mutacija, do danas je u svijetu poznato oko 90 vrsta virusa, a međusobno se razlikuju prema rasporedu aa.

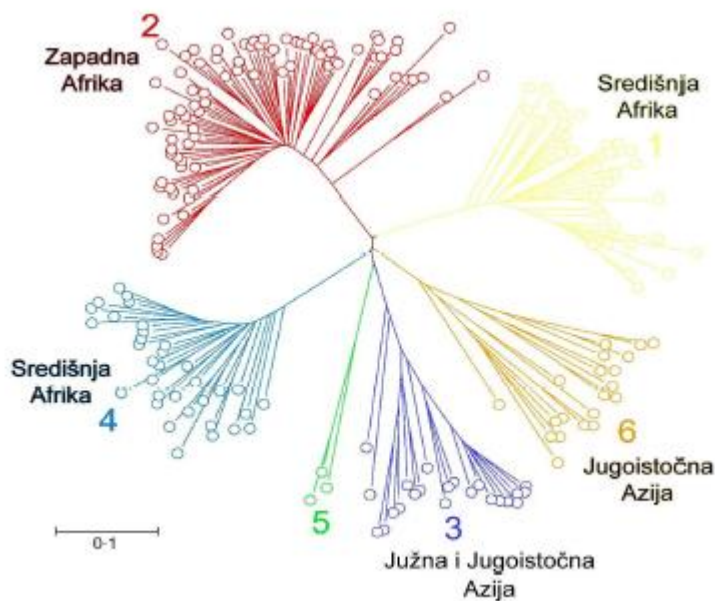
U cilju izjednačavanja oznaka različitih tipova i podtipova 1994. godine prihvaćen je model klasifikacije HCV-a. Prema glavnom filogenetskom stablu razlikuje se 6 glavnih tipova, nazvanih genotipovi i 90 podtipova. Genotipovi se označavaju arapskim brojevima od 1 do 6, a podtipovi pojedinih genotipova malim slovima "od a do c". Pojedini se genotipovi u nukleotidnom slijedu razlikuju 31-33 %, dok se podtipovi razlikuju oko 20-25 %<sup>207</sup>.

Pomoću filogenetskih analiza i teorijom populacijske genetike procijenjena je starost i raširenost različitih genotipova. Ovim je modelom prikazano da je genotip 1 nastao unutar zadnjih sto godina, dok su genotipovi 4 i 6 nekoliko puta stariji. Dokazano je i da su genotipovi 3 i 6 već dugo prisutni u populaciji Jugoistočne Azije<sup>237</sup>.



Slika 1.4. Filogenetsko stablo razvijenih zemalja.

Izvor: Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. J. General Virology 2004;85:3173-88.



Slika 1.5. Filogenetsko stablo nerazvijenih zemalja.

Izvor: Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. J. General Virology 2004;85:3173-88.

Podjela na genotipove važna je zbog epidemiološkog praćenja, jer se različita filogenetska stabla nalaze u razvijenim i nerazvijenim područjima svijeta (slika 1.4 i 1.5).

Pretpostavlja se da je HCV značajno duže prisutan u afričkoj i azijskoj populaciji što je glavni uzrok velike filogenetske širine u nerazvijenim zemljama<sup>206</sup>.

Prevalencija pojedinih genotipova različita je u različitim dijelovima svijeta. Genotipovi 1, 2 i 3 rasprostranjeni su po cijelome svijetu<sup>248</sup>. Genotipovi 1a i 1b su najučestaliji i čine 60 % infekcija uzrokovanih HCV-om<sup>243</sup>. Osim karakteristične geografske rasprostranjenosti, pojedini su podtipovi nađeni i u specifičnim rizičnim skupinama. U Europi, Americi i većem dijelu Azije, 40-80 % HCV-infekcija uzrokovano je genotipom 1. Genotipovi 1a i 1b najčešći su u SAD-u i u Europi<sup>248</sup>. Genotip 1b je najučestaliji u Japanu<sup>216</sup>. Genotip 2 prevladava u Sjevernoj Americi, Europi i Japanu. Genotip 3 raširen je u intravenoznih korisnika droga na području Europe i SAD-a<sup>171, 187</sup>, a zastupljen je i na Indijskom poluotoku<sup>50</sup>. Genotip 4 najčešći je u centralnoj i sjevernoj Africi<sup>2, 151</sup> i na Srednjem Istoku<sup>42, 50</sup>, genotip 5 gotovo isključivo u Južnoj Africi<sup>39, 208</sup> te genotip 6 u jugoistočnoj Aziji<sup>97</sup>.

Prema rezultatima objavljenih istraživanja provedenih u Republici Hrvatskoj (RH) pokazalo se da su najčešći genotipovi 1 (58,8 %) i 3 (35,6 %), a najučestaliji je podtip 1b (37,4 %). Učestalost genotipova 2 i 4 je niska (2,2 %, odnosno 3,4 %), dok genotipovi 5 i 6 nisu dokazani<sup>232</sup>.

### **1.3. Epidemiologija infekcije virusom hepatitisa C**

#### **1.3.1. Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa C u svijetu**

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organization*) infekcija HCV-om ima pandemijske razmjere, a zabilježena je gotovo u svim dijelovima svijeta (tablica 1.1). Pretpostavlja se da je kronično zaraženo oko 2,2 % svjetske populacije (oko 170 milijuna ljudi), od kojih su 5 milijuna u zapadnoeuropskim državama<sup>180</sup>, 62 milijuna na zapadnom Pacifiku (Daleki Istok i

Azija), 32 milijuna u jugoistočnoj Aziji, a 21 milijun na istočnom Mediteranu <sup>138</sup>. Godišnje se registrira 3 do 4 milijuna novo zaraženih pojedinaca <sup>12</sup>. Za razliku od drugih hepatotropnih virusa u koje spadaju hepatitis A (HAV), hepatitis B (HBV), Epstein-Barr virus (EBV) i citomegalovirus (CMV), velika većina zaraženih HCV-om oboljet će od kronične bolesti, a time imati i predispoziciju za razvoj komplikacija bolesti. HCV je uzrok 27 % ciroza i 25 % HCC-a na svijetu <sup>172</sup>. Danas je infekcija HCV-om jedan od glavnih uzroka transplantacije jetre u SAD-u <sup>169</sup>.

Tablica 1.1. Broj osoba zaraženih virusom hepatitisa C

Izvor: Sy T, Jamal MM (2006) Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. Int. J. Med. Sci. 3(4): 41-46

regija	ukupna populacija (milijuni)	prevalencija HCV (%)	zaražena populacija (milijuni)
Afrika	602	5,3	31,9
Amerika	785	1,7	13,1
Istočni Mediteran	466	4,6	21,3
Europa	858	1,03	8,9
Jugoistočna Azija	1500	2,15	32,3
Zapadni Pacifik	1600	3,9	62,2
UKUPNO	5811	3,1	169,7

Seroprevalencija HCV-infekcije razlikuje se po regijama. Prema podacima iz literature, područja s najnižom prevalencijom (0,1 %) su Velika Britanija i Skandinavija. U centralnoj Africi je najviša prevalencija HCV-a i iznosi 6,3 % <sup>212</sup>, slijede je Azija i Australija, a nešto niža prevalencija je u Americi, Indoneziji te sjevernoj i zapadnoj Europi. Država s najvišom prevalencijom (22 %) je Egipat. U Egiptu se prijenos HCV-infekcije povezuje s višestrukim korištenjem staklenih šprica tijekom nacionalne kampanje vezane uz borbu protiv shistosomijaze koja se provodila od 1961. do 1986. godine <sup>70, 82</sup>.

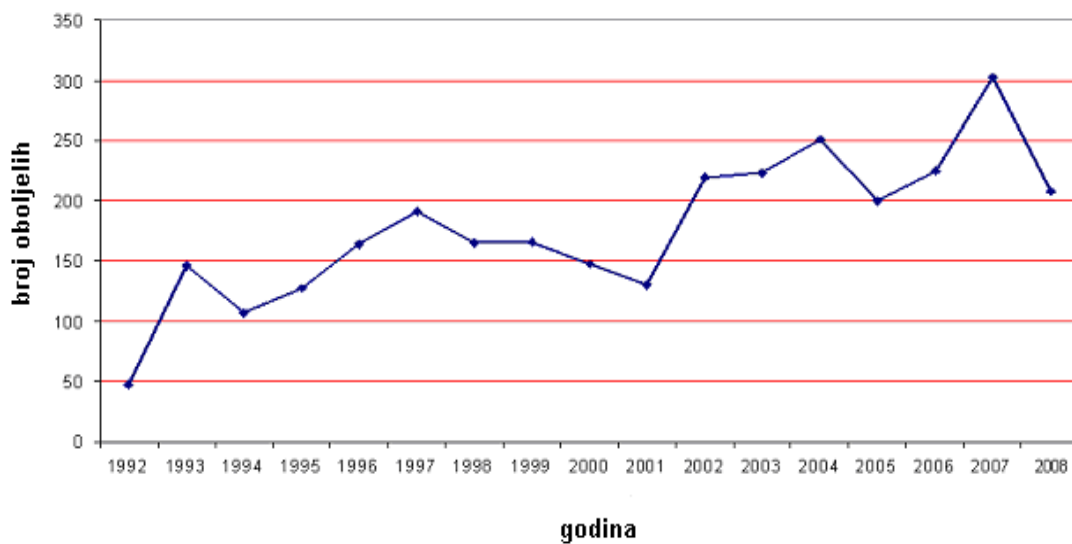
Premda Europa spada u područje s niskom prevalencijom HCV-a, u literaturi se spominje i tiha epidemija HCV-a u Italiji, Grčkoj i Španjolskoj u periodu između Drugog svjetskog rata i 1975. godine<sup>204</sup>. U Belgiji seroprevalencija iznosi 0,87 %, u Ujedinjenom Kraljevstvu i sjevernoj Italiji 3,2 % dok središnja i južna Italija imaju višu prevalenciju (8,4-22,4 %). Među ruskim vojnicima prevalencija HCV-om iznosi 1,5 %, u Francuskoj 1,3 % dok je najniža u Mađarskoj 0,73 %<sup>212</sup>.

Uz geografske razlike, u prevalenciji HCV-infekcije postoje i dobno specifične razlike. Npr. SAD, Australija, Italija i Španjolska pripadaju skupini država s podjednakom prevalencijom HCV-infekcije (1-1,9 %). U Italiji i Španjolskoj prevalencija HCV-a se povećava s dobi te je najveći broj zaraženih u dobi iznad 50 godina<sup>12</sup>. U SAD-u najviša prevalencija HCV-a (dvije trećine svih infekcija) zabilježena je u dobnim skupinama od 30-49 godina<sup>16</sup>. U nekim zemljama kao što su Italija, Japan i Kina postoje hiperendemska područja u kojima je prevalencija HCV-infekcije čak dvadeset puta viša nego u općoj populaciji te dvostruko viša od prevalencije u istim dobnim skupinama u ostalim dijelovima države<sup>12</sup>.

### **1.3.2. Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa C u Hrvatskoj**

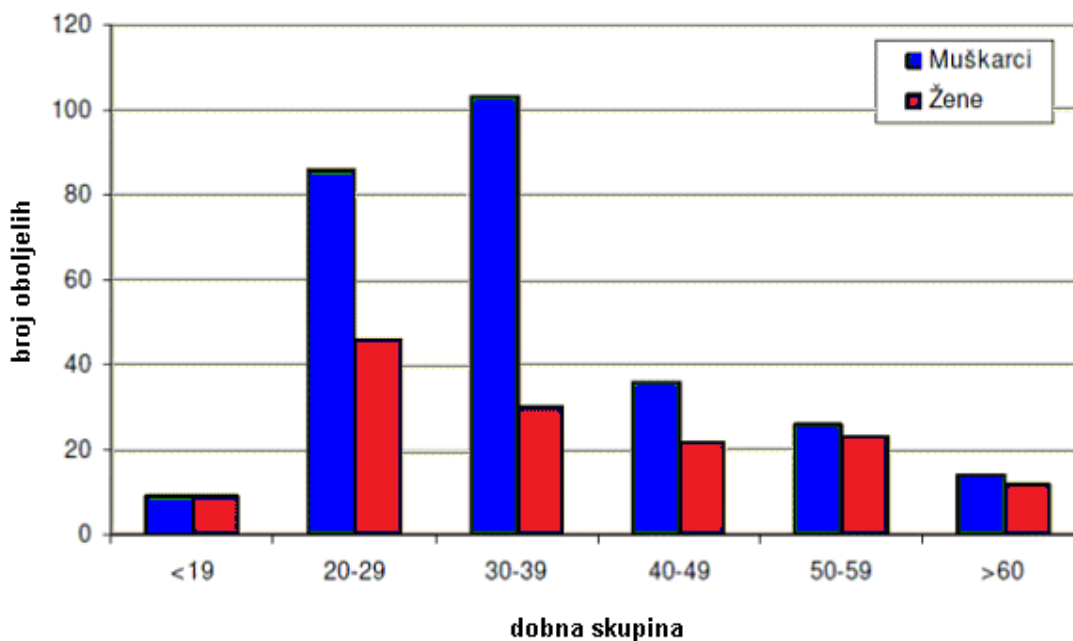
Prijavljivanje HCV-a u RH obvezno je od 1992. godine. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) u Hrvatskoj se godišnje prijavljuje oko 200 zaraženih HCV-om i približno isti broj kroničnih nosilaca virusa (slika 1.6). Procijenjuje se da ima oko 1 % osoba pozitivnih na HCV u općoj populaciji te stoga Hrvatska spada u zemlju niske prevalencije. Broj registriranih slučajeva hepatitisa C tijekom 2006. godine u RH prema dobi i spolu prikazuje slika 1.7. Od ukupnog broja zaraženih HCV-om, muškaraca je bilo 65,8 %, a žena 34,2 % (omjer 1,9 : 1). Najviše je bilo oboljelih u dobnim skupinama od 20-29 i 30-39 godina (31,7 % odnosno 31,9 %).





Slika 1.6. Prijave virusnog hepatitisa C u Hrvatskoj (1992-2008).

Izvor: Služba za epidemiologiju zaraznih bolesti, Hrvatski zavod za javno zdravstvo.



Slika 1.7. Broj oboljelih od hepatitisa C u Hrvatskoj prema dobi i spolu.

Izvor: Služba za epidemiologiju zaraznih bolesti, Hrvatski zavod za javno zdravstvo.

### 1.3.3. Putevi prijenosa i čimbenici rizika za nastanak infekcije hepatitisom C

HCV najčešće se unosi u ljudski organizam preko krvi (transfuzija krvi ili krvnih pripravaka) i drugim parenteralnim načinima kao npr. pri hemodijalizi, uštrcavanju droga i tetoviranju <sup>174</sup>. Početkom 1993. godine u Hrvatskoj je uvedeno obvezno testiranje krvi dobrovoljnih davatelja na protutijela specifična za HCV (anti-HCV) i od tada su transfuzije kao uzročnik prijenosa HCV-a epidemiološki gotovo isključene.

Danas je najučestaliji prijenos infekcije intravensko uzimanje droga, korištenjem zajedničkih šprica i igala. To je najvažniji rizični čimbenik za nastanak HCV-infekcije u razvijenim zemljama. Prema pojedinim istraživanjima prevalencija HCV-om među narkomanima iznosi 48-90 % <sup>78</sup>. Opisana je i učestalija pojava HCV-infekcije u osoba koje rabe kokain za ušmrkavanje, vjerojatno zbog zajedničke uporabe pribora kontaminiranog krvlju <sup>12</sup>. Mogući put prijenosa je i korištenjem inficiranog pribora prilikom tetovaža ili body piercinga.

Prijenos seksualnim putem je moguć, ali jako rijetko. HCV je češći kod promiskuitetnih heteroseksualaca i muških homoseksualaca, a ove dvije grupe su obično i pokazatelj rizika od spolnog prijenosa bolesti. Rizik od seksualnog prijenosa HCV-a je veći ako je osoba istovremeno zaražena virusom humane imunodeficiencije (HIV, engl. *human immunodeficiency virus*) <sup>88</sup>. Potencijalni mehanizam neseksualnog prijenosa virusa kod osoba koje žive u istom kućanstvu uključuje kontakt sluznica sa zaraženom krvlju ili predmetima koji sadrže takvu krv ili korištenje zajedničkih higijenskih predmeta (četkica za zube, britvica) <sup>119</sup>.

Učestalost infekcije kod zdravstvenih radnika koji dođu u kontakt sa zaraženom krvlju ne prelazi 1 % <sup>124</sup>. Rizik od uboda oštricama manji je od rizika nakon uboda šupljim iglama, najvjerojatnije zato jer se u šupljini igle nalazi veća količina krvi.

Prijenos virusa tijekom porođaja (tzv. perinatalni put) događa se kod prosječno 5 % djece rođene od majke pozitivne na HCV što ovisi o stupnju viremije majke u vrijeme poroda.

Rizik je otprilike dvostruko veći ako je majka istovremeno zaražena HCV-om i HIV-om. Iako je HCV izoliran iz majčinog mlijeka, nikada nije opisan prijenos infekcije dojenjem <sup>185</sup>.

Među rizične čimbenike za razvoj HCV-a svakako valja uvrstiti transplantaciju organa, ali i izloženost različitim intenzivnim dijagnostičkim i terapijskim postupcima. Svaka hospitalizacija, čak i bez primjene transfuzije, rizik je za nastanak HCV-infekcije. Osobito su rizični pojedini odjeli, među kojima prednjače odjeli za hemodijalizu. Na hemodijalizi postotak anti-HCV pozitivnih bolesnika kreće se u rasponu od 3,4 % u Nizozemskoj, do čak 80 % u Egiptu. Jednako tako, u odjele povišena rizika mogu se uvrstiti i pedijatrijski hematološko-onkološki odjeli. Prema jednoj poljskoj studiji, prevalencija HCV-infekcije među djecom koja se liječe na takvom odjelu, iznosila je čak 42,2 %. Kao dodatni čimbenik rizika za prijenos HCV-a, opisan je i kontaminirani stomatološki pribor nakon obrade osoba pozitivnih na HCV <sup>120</sup>.

Prema podacima iz literature, u čak 30-50 % zaraženih ne može se sa sigurnošću utvrditi put prijenosa <sup>223</sup>.

#### **1.4. Klinička slika infekcije virusom hepatitisa C**

HCV se pojavljuje u obliku akutne ili kronične infekcije (slika 1.8). Vrijeme inkubacije nakon izloženosti virusu je prosječno 7 tjedana <sup>94</sup>. Do pojave genskog materijala virusa u krvi, odnosno HCV RNA, dolazi za 2 tjedna nakon zaraze virusom HCV-a. To je ujedno i prvi test koji postaje pozitivan <sup>29</sup>. Prosječno vrijeme do pojave protutijela specifičnih za HCV iznosi 8 do 9 tjedana <sup>159</sup>.

##### **1.4.1. Akutni hepatitis C**

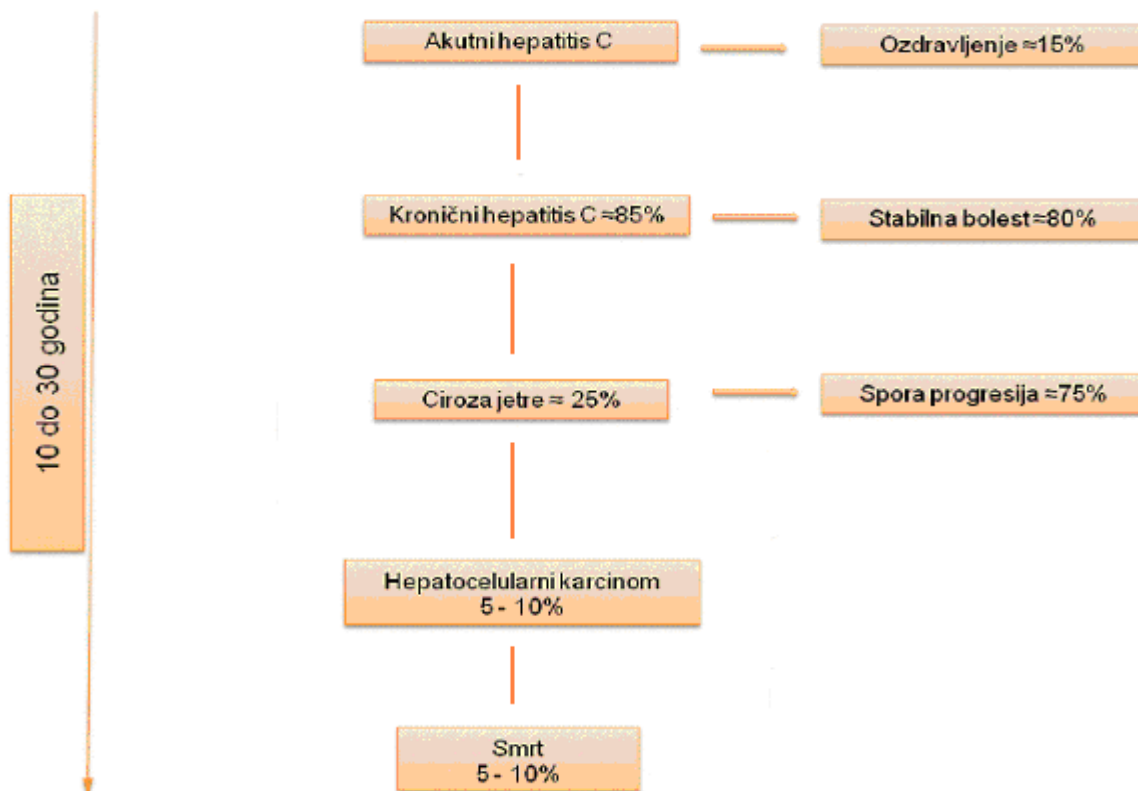
Akutna HCV-infekcija u većini slučajeva protječe asimptomatski i u kliničkoj se praksi rijetko prepoznaje, jer samo trećina bolesnika ima nespecifične simptome poput umora, mučnine i tupe boli u desnome gornjem abdominalnom kvadrantu dok se žutica javlja samo u 20 % oboljelih <sup>159</sup>. Laboratorijski je karakteriziran povišenim transferazama i to 10 do 20 puta iznad normalnih vrijednosti. U slučaju spontanog ozdravljenja dolazi do normalizacije laboratorijskih i kliničkih parametara kao i do

eliminacije genskog materijala virusa iz krvi <sup>194</sup>. HCV-infekcija nestaje nakon akutne faze u oko 15 % zaraženih, a ako aktivno umnažanje virusa traje duže od 6 mjeseci razvije se kronična bolest <sup>94</sup>.

#### **1.4.2. Kronični hepatitis C**

Kronični hepatitis C (KHC) razvije oko 85 % zaraženih. Klinički je tijekom KHC-a varijabilan, najčešće progresivan. Pretpostavlja se da manje od 20 % bolesnika tijekom bolesti ima nespasificirane simptome kao što je umor, slabost, mučnina, gubljenje apetita i bolovi u mišićima dok su aminotransferaze normalne ili tek blago povišene. Oko 80 % zaraženih osoba razvije perzistentnu infekciju s dugotrajnom viremijom koja može dovesti do nastanka fibroze i ciroze jetre u oko 20-30 % zaraženih unutar 20 godina <sup>94, 200</sup> i HCC-a u oko 2-5 % zaraženih <sup>228</sup>. Premda KHC pokazuje veoma polaganu i podmuklu progresiju bolesti, težina KHC-a je veća, a progresija prema kroničnoj bolesti jetre ubrzanija u bolesnika koji uz KHC imaju i druge lezije jetre kao što je alkoholna bolest jetre, kronični hepatitis B (KHB) ili HIV <sup>32, 200</sup>.

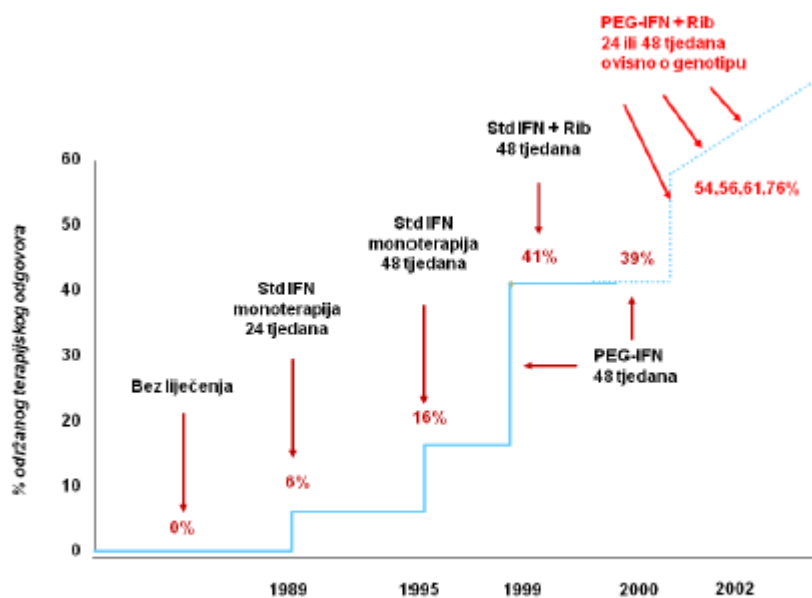
Kao rizični faktori za razvoj progresivne bolesti jetre navode se starija dob pri stjecanju infekcije (više od 40 godina), muški spol, prekomjerno konzumiranje alkohola i koinfekcija virusom HIV-a ili HBV-a <sup>44, 134</sup>. Unatoč znatnoj stopi progresije KHC-a i unatoč činjenici da završni stadij KHC-a može dovesti do zatajenja jetre, dugotrajna je prognoza KHC-a u većine bolesnika relativno benigna.



Slika 1.8. Prirodni tijek bolesti.

## 1.5. Liječenje hepatitisa C

Od otkrića HCV-a primjenjivani su različiti protokoli liječenja (slika 1.9). U samom početku liječenje se sastojalo u monoterapiji standardnim oblicima interferona-alfa (std. IFN- $\alpha$ ) u različitim dozama i u različitim frekvencijama aplikacije (svakodnevno ili svaki drugi dan). Ovakvim se protokolom učinkovita eliminacija virusa postizala samo u 20 % liječenih. Učinkovitost interferona (IFN) kao lijeka korištenog u monoterapiji udvostručena je dodavanjem ribavirina u terapiju <sup>139</sup>. Daljni napredak postignut je pegilacijom molekule IFN- $\alpha$  (PEG-IFN- $\alpha$ ). Tako je postignuta ujednačena serumaska koncentracija IFN- $\alpha$ .



IFN= interferon; Std= standardni; PEG= pegilirani; Rib= ribavirin

Slika 1.9. Napredak u liječenju kroničnog hepatitisa C.

Od početnih 6 % izliječenih, danas je moguće izliječiti i do 2/3 novootkrivenih zaraženih pojedinaca. Današnji zlatni standard liječenja KHC-a diljem svijeta predstavlja kombinacija PEG-IFN- $\alpha$  i ribavirina. Prema dosadašnjim smjernicama liječenje bolesnika s HCV-genotipom 1, 4, 5, 6 provodi se u trajanju od 48 tjedana, a s genotipom 2 i 3 u trajanju od 24 tjedna. Ovakovim protokolom izliječenje se postiže, ovisno o genotipu, u 54-76 % liječenih. Preostala trećina do polovica neizliječenih ima, usprkos terapiji, trajno aktivnu bolest uz mogućnost progresije prema komplikacijama bolesti odnosno razvoju ciroze jetre <sup>211</sup>.

Osnovni cilj liječenja virusnog hepatitisa je eradicacija infekcije odnosno prevencija progresije bolesti. Eradicacijom infekcije postiže se smanjenje broja nositelja koji su rezervoar HCV-a u općoj populaciji. Kod akutnog hepatitisa osnovni cilj liječenja je eradicacija virusa uz smanjenje mogućnosti progresije infekcije u kroničnu, dok se kod KHC-a eradicacijom virusa nastoji reducirati upalna aktivnost i prevenirati razvoj

ciroze jetre <sup>160</sup>. Cilj je postizanje trajnog virološkog odgovora (SVR, engl. *sustained virological response*) koji je definiran nemjerljivošću HCV RNA u serumu ili plazmi 24 tjedna nakon provedene terapije <sup>211</sup>.

Postoji nekoliko oblika odgovora na terapiju koji su u stručnoj literaturi prihvaćeni kao termini na engleskom jeziku i koji se diljem svijeta koriste radi lakše kategorizacije oboljelih od HCV-a. Prvi oblik odgovora razumijeva normalizaciju ALT-a (alanin aminotransferaza) i nemjerljivost HCV RNA u serumu ili plazmi na završetku terapije (ETR, eng. *end of treatment response*). Drugi oblik jest cilj svake provedene terapije, a obilježava ga normalni nalaz ALT-a i nemjerljiv HCV RNA na završetku terapije te najmanje 6 do 12 mjeseci nakon završetka terapije (SR, engl. *sustained response*). Slijedeći je oblik odgovora obilježen normalnim nalazom ALT-a i nemjerljivim HCV RNA, ali u tom slučaju 18 mjeseci nakon završene terapije (LTR, engl. *long term response*). Četvrti je oblik odgovora na terapiju postignut ako HCV RNA nije mjerljiva nakon četiri tjedna terapije (RVR, engl. *rapid virologic response*), a peti oblik odgovora obilježava pad bazalne razine HCV RNA za 100 ili više puta (2 logaritma) ili nemjerljiv HCV RNA nakon 12 tjedana terapije (EVR, engl. *early viral response*). Slijedeći je terapijski odgovor nepoželjan, a podrazumijeva trajno povišene vrijednosti ALT-a i trajno prisutnu viremiju tijekom terapije (NR, engl. *non-response*). Djelomičan odgovor (PR, engl. *partial response*) obilježen je redukcijom ALT-a ispod dvostruke vrijednosti od normalne te smanjenjem ili privremeno nemjerljivim HCV RNA. Zadnji oblik odgovora na terapiju jest onaj u kojem dolazi do normalizacije ALT-a i nemjerljivosti HCV RNA s kasnijim povišenjem ALT-a i ponovnom pojavom viremije uz primjenu kontinuirane terapije (VB, engl. *viral breakthrough*) <sup>215</sup>.

U liječenju HCV-a koriste se IFN, pegilirani interferon (PEG-IFN) i ribavirin. Postoje tri klase IFN-a: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) i gama ( $\gamma$ ), a samo je IFN- $\alpha$  učinkovit u terapiji virusnog hepatitisa <sup>160</sup>. Antiviralna aktivnost IFN-a prvi je put opisana 1957. godine kada je IFN-om postignuta inaktivacija virusa influence, ali za liječenje HCV-a počinje se primjenjivati tek 34 godine kasnije <sup>72</sup>.

PEG-IFN jest kemijski modificirani IFN dobiven kovalentnim vezanjem polietilen glikola (PEG) na IFN. Tim je postupkom produljen njegov poluživot, a time i njegova učinkovitost što dovodi do mnogo duže cirkulacije lijeka u serumu <sup>160</sup>.

Ribavirin je podudaran gvanozinu koji inhibira replikaciju niza RNA i deoksiribonukleinske kiseline (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) virusa. Mehanizam djelovanja razumijeva pražnjenje unutarstaničnog trifosfata izravnim sprečavanjem inozin monofosfat dehidrogenaze, sprečavanje 5'-cap strukture viralne mRNA te inhibiciju o virusu ovisne RNA polimeraze<sup>215</sup>.

Zahvaljujući preporukama Hrvatske konsenzus-konferencije o virusnom hepatitisu iz 2005. godine omogućena je dostupnost PEG-IFN-a svim oboljelima od HCV-a u RH. Svi bolesnici s KHC-om su potencijalni kandidati za antivirusnu terapiju. Nužno je prisustvo HCV RNA u serumu ili plazmi i histološka verifikacija jetrenog oštećenja, a u obzir se uzima i dob bolesnika, oboljenje od druge bolesti (komorbiditat), kontraindikacija za provođenje terapije te motiviranost bolesnika. Liječenje je uspješno u polovice bolesnika s genotipom 1 i u oko 80 % bolesnika s genotipom 2 i 3<sup>214</sup>.

Bez terapije rizik za razvoj ciroze je u 10-godišnjem razdoblju u blagom KHC-u do 5 %, a u teškom i preko 60 %<sup>214</sup>.

Razvoj novih lijekova poput specifičnih inhibitora i cjepiva unaprijediti će liječenje oboljelih od KHC-a i upotpuniti dosadašnje spoznaje o načinu liječenja oboljelih od HCV-a. Ligandi TLR-ova proučavaju se kao mogući pomagači u sastavljanju jednog takvog učinkovitog lijeka<sup>132</sup>.



## 1.6. Toll-like receptori

### 1.6.1. Toll-like receptori i njihovi ligandi

Receptor Toll otkriven je u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća. Znanstvenici Christiane Nusslein-Volhard i Eric Wieschaus su za to otkriće dobili Nobelovu nagradu iz fiziologije i medicine 1995. godine. Naziv je dobio prema njemačkoj riječi "toll" što znači *izvanredno, fantastično*<sup>22</sup>. Nobelovu nagradu 2011. godine dobili su Bruce A. Beutler i Jules A. Hoffmann za otkriće da TLR-i prepoznaju velik broj mikroorganizama i aktiviraju prirodni imunološki odgovor, te Ralph M. Steinman koji je otkrio da dendritičke stanice aktiviraju i reguliraju stečenu imunost (engl. *acquired immunity*).

Receptor Toll ima ključnu ulogu u embrionalnom razvoju i pokretanju prirodne imunosti u obrani od infekcija. U sisavaca je pronađena homologna obitelj receptora i nazvani su TLR. To su evolucijski očuvani transmembranski proteini uključeni u prepoznavanje molekularnih sljedova mikrobnog i viralnog podrijetla<sup>81</sup>. Čine obitelj od 10 proteina u čovjeka i 13 u miša. Različiti članovi obitelji TLR-a imaju različitu ulogu u obrani organizma od patogena<sup>6</sup>. Obitelj TLR-a prepoznata je kao ključna komponenta u prepoznavanju mehanizma upalnih reakcija kod sisavaca uzrokovanih mikroorganizmima. Predstavljaju prvu liniju antimikrobne obrane tako što aktiviraju prirodenu imunost<sup>126</sup>. Lokalizirani su uglavnom na stanicama imunološkog sustava, ali su također uočeni i na drugim stanicama.

To je skupina receptora koji domaćinu omogućuju prepoznavanje velikog broja patogenima pridruženih molekularnih sljedova (PAMP, engl. *pathogen associated molecular patterns*) kao što je bakterijski flagelin, polipeptidi, glikoproteini, virusna RNA, DNA i razni drugi (tablica 1.2)<sup>22, 195</sup>. Prepoznaju i cijeli niz liganda domaćina koji nastaju razaranjem različitih vrsta stanica u upalnim procesima domaćina<sup>221</sup>. Razlikuju se upravo po toj specifičnosti prema ligandu.

Tablica 1.2. TLR-i, njihovi ligandi i podrijetlo liganda<sup>7, 54, 74</sup>

TLR	ligandi	podrijetlo liganda
TLR 1	triacil lipopeptid topivi čimbenici	bakterije i mikobakterije <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR 2	lipoprotein/lipopeptidi peptidoglikan (PGN) lipoteihoična kiselina lipoarabinomanan fenol-solubilni modulin glikolipidi porini zimosan Hsp 70 (Heat shock protein) HCV-jezgra, nestrukturalni protein	brojni patogeni Gram-pozitivne bakterije Gram-pozitivne bakterije Mikobakterije <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Troponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> gljive domaćin HCV HCV
TLR 3	dvolančana RNA	virusi
TLR 4	lipopolisaharidi (LPS) taksol fuzijski protein Hsp 60 Hsp 70 oligosaharidi hijaluronske kiseline fibrinogen proteini virusne ovojnice	Gram-negativne bakterije biljke respiratorni sincijski virus (RSV) <i>Chlamydia pneumoniae</i> domaćin domaćin domaćin virusi
TLR 5	flagelin	bakterije
TLR 6	diacil lipopeptidi lipoteihoična kiselina zimosan	mikoplazme Gram-pozitivne bakterije gljive
TLR 7	imidazokinolini loksoribini bropirimini jednolančana RNA	sintetički spojevi sintetički spojevi sintetički spojevi virusi
TLR 8	imidazokinolini jednolančana RNA	sintetički spojevi virusi
TLR 9	oligodeoksinukleotidi (CpG ODN)	bakterije i virusi
TLR 10	nepoznato	nepoznato

### 1.6.2. Građa Toll-like receptora

TLR-i i obitelj interleukin-1 receptora (IL-1R) imaju vrlo sličnu citoplazmatsku domenu koja se naziva Toll/IL-1R (TIR) domena. To je evolucijski očuvana domena od približno 200 aa<sup>7, 63</sup> koja posreduje u provođenju signala vezanjem adaptorskih proteina s homolognom regijom<sup>140</sup>. TIR domena građena je od 5 petlji, 5  $\beta$ -nabranih ploča i 5  $\alpha$ -zavojnica koje ih međusobno povezuju u organiziranu strukturu građenu od tri podjedinice: Box1, Box2 i Box3<sup>244</sup>. Podjedinica Box1 je ista kod svih TLR-a, dok podjedinica Box2 sadrži tzv. BB-petlju koja je nužna za prijenos signala. U njoj se nalazi konzervirani slijed aa koji sadrži prolin. Kada nastane mutacija u genu *tlr4* dolazi do zamjene prolina histidinom što dokida prijenos signala. Podjedinica Box3 također je nužna za funkciju TLR-a, sadrži određene aa koje su prepoznate kao veoma važne u prijenosu signala<sup>35</sup>.

TLR-i i IL-1R razlikuju se po građi izvanstanične domene. Receptor IL-1R sadrži imunoglobulinu sličnu domenu (Ig-like domain), dok je osnovna građevna jedinica izvanstaničnog dijela TLR-a proteinski slijed građen od 19 do 25 leucinom bogatih ponavljajućih slijedova (LRR, engl. *leucine-rich repeats*). Svaka podjedinica LRR građena je od 24-29 aa i sadrži leucinom bogat slijed i konzervirani slijed bogat hidrofobnim aa<sup>7, 26</sup>.

LRR imaju potkovičastu strukturu koja je prisutna u velikom broju proteina eukariota i omogućuje im prepoznavanje širokog spektra liganda<sup>113</sup>.

### 1.6.3. Toll-like receptor 2

Od svih TLR-a i vjerojatno od svih receptora za prepoznavanje uzorka (PRR, engl. *pattern recognition receptor*) TLR2 prepoznaje najveći broj liganda<sup>102</sup>. Ti ligandi uključuju peptidoglikan<sup>142, 198</sup>, bakterijske lipoproteine<sup>5, 10</sup>, lipoteihoičnu kiselinu<sup>181</sup>, fenol-solubilni modulini iz bakterije *Staphylococcus epidermidis*<sup>84</sup>, glikolipide, porine, zimosan iz gljiva<sup>229</sup>, Hsp 70<sup>221</sup> i proteine HCV-a<sup>74</sup>. Prepoznaje DNA herpes virusa i RNA RSV-a, HCV-a i virusa ospica<sup>51</sup>. TLR2 stvara heterodimere s TLR1 ili TLR6, jer

samostalno ne prepoznaje PAMP-ove <sup>161, 217</sup>. Ti TLR2 kompleksi su sposobni prepoznati viruse, uključujući virus ospica, CMV i HCV <sup>49, 62</sup>. Gen *tlr2* nalazi se na dužem kraku kromosoma 4 (4q31-32) i kodira protein od 784 aa s 19 LRR <sup>178</sup>. Molekularna težina mu je 84 kDa <sup>186</sup>.

#### 1.6.4. Toll-like receptor 4

Prvo zapažanje da humani TLR-i mogu funkcionirati kao PRR-i proisteklo je opisom humanog receptora koji je istovjetan receptoru Toll u vinskoj mušici, sada poznatom kao TLR4 <sup>141</sup>. TLR4 je prvi otkriven i njegova osnovna uloga je prepoznavanje velikog broja sastavnih dijelova gram-negativnih bakterija kao što je LPS <sup>52, 81, 102</sup>. TLR4 prepoznaje i taksol iz gljiva, fuzijski protein podrijetlom iz RSV-a <sup>92, 117</sup>, Hsp 60 i Hsp 70 <sup>221</sup>, fibrinogen, proteine virusne ovojnice HCV-a <sup>74</sup>, DNA herpes virusa i RNA virusa ospica <sup>51</sup>.

Gen *tlr4* nalazi se na dužem kraku kromosoma 9 (9q32-33) i kodira protein od 839 aa s 22 LRR. Molekularna težina mu je 90 kDa, a najrodniji je TLR1 i TLR6 <sup>186</sup>. TLR4 stvara heterodimere s TLR5 koji vjerojatno povećavaju njegovu aktivnost i s TLR1 koji mu inhibiraju aktivnost <sup>146, 210</sup>.

#### 1.7. Polimorfizmi unutar gena za Toll-like receptore

Raznolikost genoma čovjeka, koja se zasniva na polimorfizmima, omogućuje razlikovanje osoba jednu od druge, ali isto tako i pronalaženje gena odgovornih za nastanak nasljednih bolesti <sup>98, 145</sup>. Aleli ili genske varijante su različiti oblici istog gena. Nekoliko tisuća gena se može nalaziti na jednom kromosomu, a položaj gena na kromosomu zove se lokus.

Svaka promjena strukture genomske DNA koja se odnosi na pojavu više od jednog alela na istom lokusu, uočena u više od 1 % ukupne populacije, naziva se genski polimorfizam <sup>71, 98</sup>. Postojanje više alela na nekom lokusu u određenom trenutku

ispitane populacije posljedica je spontanih mutacija. Mutacija je proces pri kojemu se remeti redoslijed nukleotida. Može zahvatiti jedan ili više nukleotida što uzrokuje promjene u redoslijedu aa, odnosno strukturi proteina. Genske (točkaste) mutacije, koje predstavljaju izmjenu jednog nukleotida, dovode do promjena unutar jednog gena, dajući nove alelne oblike. Osim točkastih mutacija, uzrok polimorfizma su i umetanje (insercija) i ispadanje (delecija) određenog broja nukleotida mehanizmima pogrešnog sparivanja baza zbog iskliznuća dijela slijeda (engl. *slipped-strand mispairing*), neujednačen "crossing-over" te izmjena sestrinskih kromatida (SCE, engl. *unequal sister-chromatide exchange*)<sup>17, 125</sup>. Polimorfizam jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) je polimorfizam u kojem je jedan od nukleotida (A, T, G ili C) zamijenjen drugim uzrokujući promjenu u slijedu DNA, a najčešće se koristi u populacijskim studijama<sup>230, 240</sup>. SNP-ovi smješteni unutar kodirajuće regije mogu, ali i ne moraju, utjecati na slijed aa u proteinu (engl. *non-synonymous SNP*, odnosno *synonymous SNP*)<sup>197</sup>. U populaciji 70 % SNP-ova ima frekvenciju manju od 5 % te se nazivaju rijetki SNP-ovi<sup>60</sup>.

### 1.7.1. Polimorfizmi gena *tlr2* i *tlr4*

Različiti SNP-ovi unutar gena *tlr2* i *tlr4* povezani su s raznim bolestima kao što su zarazne bolesti, autoimune bolesti i ateroskleroza, a neki su polimorfizmi povezani i sa smanjenom funkcionalnom aktivnošću navedenih receptora.

Unutar gena *tlr2* opisana su 24 polimorfizma od kojih njih 13 rezultira promjenom aa dok je unutar gena *tlr4* opisano 35 polimorfizama<sup>75</sup> od kojih su dvije mutacije istražene u izradi ovog doktorskog rada. To su rs4986790 (A896G, D299G) i rs4986791 (C1196T, T399I) koji rezultiraju promjenom aa i povezani su s mnogim patološkim stanjima različite etiologije i s rezistentnošću virusa i bakterija kao npr. *Legionella pneumophila*<sup>90</sup>. Navedeni polimorfizmi povezani su i s pojavom malarije za vrijeme trudnoće, te s mnogim drugim neinfektivnim bolestima uključujući autoimune bolesti, astmu i karcinome<sup>144</sup>. TLR4 rs4986790 povezan je s

kardiovaskularnim bolestima, posebice sa ishemijskom bolesti srca <sup>31</sup>, ali nije povezan s aterosklerozom <sup>93</sup>.

Polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 (G2258A, R753Q) uzrokuje smanjeni odgovor receptora na lipopeptide bakterija, a polimorfizam gena *tlr4* smanjeni odgovor na liposaharid gram-negativnih bakterija. Homozigoti za polimorfizam gena *tlr2* povezani su s odbacivanjem transplantata i smrtnosti poslije transplantacije jetre kod oboljelih od KHC-a, dok to nije dokazano za polimorfizme gena *tlr4* rs4986790 i rs4986791 <sup>65</sup>. Polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 povezuje se s povećanom osjetljivošću na tuberkulozu <sup>155</sup>, a u međusobnoj je povezanosti sa srčanom restenozom i lajmskom bolesti koju uzrokuje bakterija *Borrelia burgdorferi* <sup>196</sup>, te sa stafilokoknom infekcijom <sup>131</sup>. Lorenz i suradnici su u svom radu prikazali da se polimorfizmi gena *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791 nalaze u neravnoteži vezanosti gena (LD, engl. *linkage disequilibrium*), odnosno da su lokusi ovisni jedan o drugome u nasljeđivanju <sup>130</sup>. Zbog niske razine rekombinacije u određenoj genskoj regiji tijekom dugog razdoblja može doći do toga da se aleli nekih polimorfizama uvijek nasljeđuju zajedno. U praksi to znači da se prisutnošću određenog alela jednog polimorfizma može predskazati prisutnost alela drugog polimorfizma s kojim se nalazi u LD-u.

Polimorfizmi gena TLR mogli bi utjecati na njihovu funkcionalnu aktivnost u smislu obrane od patogena, a hipotetski možda i u odgovoru na terapiju.

## 1.8. Imunosni odgovor na virusnu infekciju

Virusi se, za razliku od bakterija, mogu razvijati samo u stanicama, pa to utječe i na oblik imunoreakcije tijekom virusnih infekcija. Prije nego što uđu u stanicu i nasele se u njezinu citosolu, virusi reagiraju s receptorima na staničnoj membrani. O vrsti tih receptora ovisi citotropnost nekih virusa, tj. njihova sklonost da ulaze u određene vrste stanica. Zaražene stanice najčešće propadaju, ali one mogu i preživjeti, proizvodeći neprestano nove viruse. Na oblik imunoreakcije utječe i rasprostranjenost virusne infekcije. Reakcija može biti lokalizirana na mjestu ulaska virusa, no može se odigravati i u većim dijelovima organizma, što je obično posljedica prodora virusa u

krv ili u limfni sustav. Osim toga, ishod imunoreakcije može biti različit. Virusna infekcija može posve nestati, no neki virusi nakon akutne faze bolesti ostaju pritajeni u organizmu te poslije nekog vremena uzrokuju ponovne infekcije (npr. virus herpesa). Ima virusa koji unatoč imunoreakciji opstaju i uzrokom su trajnih infekcija (npr. HBV i HCV) <sup>14</sup>.

### 1.8.1. Prirođena imunost

Prirođena imunost predstavlja filogenetski drevni oblik reagiranja organizma na mikroorganizme. Ona nije specifično usmjerena baš protiv tog antigena koji narušava antigenski integritet, niti ostavlja sjećanje na njega. Predstavlja zapravo prvu crtu obrane i od rođenja osigurava vrlo dobru zaštitu protiv većine mikroorganizama. Tek ako antigen prodre kroz tu zaštitu, pojavljuje se stečena imunost. Stečena imunost ne djeluje neovisno o nespecifičnoj imunosti, već je, naprotiv, ona nadograđena na prirođenu imunost i usko je s njom povezana. Prirođena se imunost temelji na anatomskim, fiziološkim, fagocitnim zaprekama i na upali. Na učinkovitost prirodne obrane utječu brojni čimbenici, kao što su: spol, dob, genska podloga, prehrana, razne bolesti jedinke te primjena immunosupresijskih i imunostimulacijskih tvari <sup>220</sup>. Temelji prirodne otpornosti većinom su ugrađeni u organizam genetički ili epigenetički. Tu obranu možemo razmatrati na lokalnoj i sistemnoj razini. Lokalna se obrana obavlja pretežito strateški na mjestu ulaska antigena, tj. na površini organizma (koži i sluznicama). Sustavna se prirođena imunost ponajprije odvija fagocitozom i različitim molekulama u izvanstaničnoj tekućini. Katkada se i ne radi o nekoj posebnoj aktivnosti, već naprosto zbog građe tijela mikroorganizam ne može prodrijeti u tkiva. Također, kad im to i uspije, tkiva mogu biti nepovoljan okoliš za opstanak i razvoj uljeza jednostavno zbog svojih svojstava, npr. stupnja oksigenacije, temperature, metaboličkih tokova, kemijskog sastava i sl. Npr. virus štećenak vrlo je patogeničan i uglavnom smrtonosan uzročnik bolesti u pasa, ali uopće nije štetan za čovjeka. To je stoga što ljudske stanice nemaju podoban površinski receptor koji bi u njih uveo virus. Navedeni primjer najbolje oslikava genetičku imunost, koja je svojstvena određenom

ustrojstvu organizma, dakle vrsti. Ponekad su prirodna protutijela, koja se stvore bez zamijećenoga prijašnjeg dodira s antigenom u svih pripadnika jedne vrste, temelj prirodnoj imunosti koju onda nazivamo prirodnom (normalnom) imunošću <sup>220</sup>.

Ključnu ulogu u pokretanju prirodne imunosti ima receptorski sustav TLR-a. Ti receptori prepoznaju zajedničke molekularne strukture na različitim klicama. Naime, mnoge klice imaju zajedničke, vitalno značajne strukture, odnosno PAMP-ove, koji su filogenetski sačuvani i ne mijenjaju se u različitim vrstama i rodovima klica. TLR u obliku homodimera, a kadšto u obliku heterodimera vežu pripadne PAMP-ove i pobuđuju stanice aktivacijom sustava jezgrina čimbenika kappa B (NF- $\kappa$ B engl. *nuclear factor kappa B*) na proizvodnju upalotvornih citokina te kostimulirajućih i adhezijskih molekula. To prepoznavanje je grupno-specifično (za razliku od prepoznavanja u stečenoj imunosti gdje se prepoznaju antigenske razlike u jednoj aa), što znači da jedan od tih receptora prepoznaje neke oblike PAMP-ova, a druge ne. Jednom prepoznatoj klici s pomoću TLR-sustava suprotstavljaju se izvršni mehanizmi prirodne imunosti i upale <sup>137</sup>.

### 1.8.2. Stečena imunost

U osnovi stečene imunosti složena je limfocitna aktivacija, diferencijacija i recirkulacija, a uglavnom je usmjerena protiv proteinskih antigena. Pokretanje reakcije zahtijeva imunopreradbu i imunopredočavanje u sklopu molekula antigena glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka (HLA, engl. *Human Leukocyte Antigen*), a specifičnost receptora nastaje rekombinacijom i somatskim mutacijama izvornih gena V, D i J. Osim receptorskog signala preduvjet pobude je interakcija putem drugog signalnog puta (CD28:B7) između limfocita i imunopredočnih stanica. U prvotnom kontaktu s novim antigenom procesi prepoznavanja, staničnih novačenja i utkivljenja, te staničnih dioba i diferencijacije događaju se u vremenu reda veličine nekoliko dana (4-10 dana). Stoga je kinetika reagiranja i postizanja učinaka sporija u odnosu na prirodenu imunost i upalnu reakciju. S druge strane, stečena imunost ima sposobnost biološke memorije specifičnih antigenskih determinanti, što je osnova



trajnije zaštite i cijepljenja protiv pojedinih klica. Stečena imunost prepoznaje antigene mikroba (kao i prirodna imunost), druge egzogene antigene, te antigene vlastitog promijenjenog tkiva i tumorske antigene. Vrlo visoka specifičnost stečene imunosti očituje se kao prepoznavanje razlike u jednoj aa ili pak haptenskoj modifikaciji postraničnog ostatka endogenog proteina<sup>137</sup>.

Na temelju efektorskih mehanizama razlikujemo dva oblika stečene imunosti: humoralni i stanični. Ulazak bilo kojeg antigena potiče stvaranje obaju oblika imunosti, ali često izrazito prevladava jedan oblik, ovisno o antigenu i načinu imunizacije. Humoralna imunost jest imunost posredovana protutijelima. Protutijela se stvaraju nakon ulaska nekog antigena u organizam, bilo slobodnoga topljivog, bilo vezanog na površinu neke čestice. Stanična imunost jest imunost posredovana stanicama, pretežito limfocitima T i makrofagima. Ona se obično razvija pri ulasku nekih unutarstaničnih bakterija, virusa, stanica transplantata ili tumora. Osnovni izvršni mehanizam sastoji se u izravnom citotoksičnom izvanstaničnom djelovanju limfocita T ili učinku njihovih humoralnih produkata (citokina) koji na najrazličitije načine pridonose uništenju ciljnih stanica<sup>219</sup>. Prvi je korak u uspostavljanju stečene imunosti na infekcije aktivacija djevičanskih limfocita T.

### **1.9. Toll-like receptori i imunosni odgovor na infekciju virusom hepatitisa C**

HCV je glavni uzročnik bolesti jetre zbog kontinuirane upale koja aktivira domaćinov imunološki sustav. Mehanizam kojim HCV izbjegava ili aktivira imunološki sustav još nije posve jasan. TLR-i su bitan čimbenik oblikovanja imunološkog odgovora domaćina, jer omogućuju stanicama prepoznavanje patogena te preko adaptorskih unutarstaničnih proteina aktiviraju signalne kinaze koje fosforiliraju unutarstanične proteine i aktiviraju molekule važne za transkripciju različitih proteina kao što su citokini.

TLR spada u skupinu PRR receptora u koje su uključeni RIG-I (engl. *retinoic-acid-inducible protein 1*) i MDA5 (engl. *melanoma-differentiation-associated gene 5*) koji se nalaze u citoplazmi i aktiviraju transkripcijske faktore IRFs (engl. *IFN regulatory*

*factors*) i NF- $\kappa$ B, što rezultira proizvodnjom IFN-a i upalotvornih citokina koji stimuliraju imuni odgovor na infekciju <sup>192, 236, 246, 247</sup>. Pomoćnički T limfociti (Th, engl. *helper T cells*) izlučuju citokine kojima stimuliraju ili aktiviraju ostale stanice. Th se nakon prepoznavanja antigena diferenciraju iz naivnih Th limfocita (Th0) u upalne (Th1) i u pomoćničke (Th2) limfocite. Th1 limfociti luče IFN- $\gamma$ , interleukin 2 (IL-2) i čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ , engl. *tumor necrosis factor alpha*) koji aktiviraju makrofage i citotoksične T limfocite (Tc, engl. *cytotoxic T cells*) te su osobito važni pri reakcijama na viruse <sup>64</sup>. S druge strane, Th2 limfociti proizvode slijedeće interleukine: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13, kojima stimuliraju B limfocite na proizvodnju antitijela <sup>135</sup>.

TLR, RIG-I i MDA5 imaju glavnu ulogu u prepoznavanju liganda podrijetlom iz različitih virusa, uključujući DNA, ssRNA (engl. *single-stranded RNA*), dsRNA (engl. *double-stranded RNA*) i glikoproteine <sup>109</sup>. Primjer TLR liganda podrijetlom iz virusa je dsRNA, koja čini genom virusa i nastaje tijekom životnog ciklusa većine RNA virusa, ali ne nastaje u eukariotskim stanicama, te ssRNA koja se razlikuje od staničnih citoplazmatskih ssRNA transkripata po svojoj lokaciji unutar endosoma i visokog sadržaja gvanozina i uridina <sup>1</sup>. RIG-I je unutarstanični receptor za dsRNA koji djeluje kao posrednik tijekom replikacije RNA virusa <sup>201, 209</sup>. TLR2 i TLR4 prepoznaju PAMP-ove, odnosno proteine HCV-a te dolazi do aktivacijskih signala u stanici koja otpušta protuupalne citokine <sup>110</sup> i kostimulacijske molekule kao što su CD80 i CD28 koje potiču aktivnost drugih stanica imunološkog sustava što čini TLR ključnim elementom prirođene imunosti <sup>73, 103, 153, 176</sup>.

Strukturalni C protein i nestrukturalni NS3 protein mogu potaknuti prirođeni imunološki odgovor domaćina što dovodi do otpuštanja protuupalnih citokina, pa su zbog toga receptori aktivirani HCV-proteinima mogući terapijski cilj <sup>43</sup>.

TLR2 i TLR4 nalaze se na stanicama imunološkog sustava i preko njih stanica prepoznaje HCV i luči IFN koji stimulira stvaranje antivirusnih enzima i dovodi stanicu u protuvirusno stanje. No, ako dođe do promjena na receptoru kao što je SNP, to može rezultirati oslabljenim stvaranjem i izlučivanjem IFN-a i nemogućnošću inhibiranja replikacije virusa.

Unatoč činjenici da je HCV RNA okidač za RIG-I i prirodni imunološki odgovor, približno 70-80 % oboljelih od HCV-a razvije kroničnu bolest. HCV može uspješno izbjeći prirodni imunološki odgovor koji je pobuđen infekcijom, što rezultira virusnom replikacijom i kroničnom infekcijom <sup>129</sup>. TLR-i imaju središnju ulogu u aktivaciji prirodne imunosti, a posredno, kroz izražaj kostimulacijskih molekula, i proizvodnju odgovarajućih citokina u usmjeravanju Th limfocita prema Th1 odgovoru <sup>99, 140</sup>, ali isto tako mogu potaknuti i Th2 odgovor <sup>105</sup>. Stanični specifični odgovor, odnosno Th1 odgovor, ključan je u eliminaciji većine patogena.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

U Hrvatskoj se godišnje prijavljuje oko 200 osoba zaraženih HCV-om i približno isti broj kroničnih nosilaca virusa. Prema tome, Hrvatska spada u zemlju niske prevalencije, što ne umanjuje problematiku vezanu uz infekciju i terapiju KHC-a.

Trenutna problematika vezana uz HCV i kronično oboljenje svodi se na nekoliko činjenica:

- vizualizirana je tek djelomična čestica virusa, a ne kompletna virusna čestica,
- nema modela za *in vivo* istraživanja,
- funkcija proteina genoma HCV-a nije u potpunosti poznata,
- životni ciklus HCV-a nije potpuno poznat, jer se saznanja o životnom ciklusu virusa temelje na *in vitro* istraživanjima,
- stanični receptori virusa nisu potpuno poznati,
- virus je izrazito mutagen,
- mehanizam kojim HCV izbjegava ili aktivira imunološki sustav još nije posve jasan, i
- svega pola oboljelih postiže trajni virološki odgovor nakon provedene terapije.

Ne postoji apsolutno učinkovito liječenje niti cjepivo protiv HCV-a, pa je činjenica da približno 85 % zaraženih razvije KHC. To je vjerojatno posljedica neodgovarajućeg imunskog odgovora na HCV. Poznato je da polimorfizmi gena *tlr2* i *tlr4* utječu na odgovor domaćina u različitim infekcijama. Stoga je važno odrediti navedene polimorfizme, što bi moglo pomoći u prepoznavanju osoba s predispozicijom za razvoj kronične infekcije i u predviđanju odgovora na terapiju.

**Ciljevi istraživanja:**

1. odrediti prisutnost protutijela specifičnih za HCV svim ispitanicima,
2. dokazati aktivnu replikaciju HCV-a svim ispitanicima,
3. odrediti genotip HCV-a svim oboljelima od KHC-a,
4. utvrditi uspješnost terapije oboljelima od KHC-a,
5. odrediti prisutnost polimorfizama u TLR2 rs5743708, TLR4 rs4986790 i TLR4 rs4986791 svim ispitanicima, i
6. napraviti korelaciju između polimorfizama i broja virusnih kopija, genotipa, dobi, spola i nekih životnih navika kao što su ovisnost, korištenje kontracepcije, tetovaža, body piercing, hemodijaliza i određenih simptoma bolesti (bolovi u mišićima i gubitak apetita).

**Hipoteza:** polimorfizmi gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791 javljaju se češće u skupini oboljelih od KHC-a nego u kontrolnoj skupini i dovode do smanjenog učinka terapije.

### 3. ISPITANICI I METODE RADA

#### 3.1. Ispitanici

U ovo istraživanje dobrovoljno je uključeno 100 ispitanika: 40 zdravih i 60 ispitanika s već dijagnosticiranim KHC-om. Svi su ispitanici punoljetni i upoznati s protokolom i ciljevima istraživanja, a prije uključivanja potpisali su informirani pristanak. Ispitivanje se provodilo sukladno etičkim načelima i Deklaraciji iz Helsinkija iz 1975. godine te njezinim izmjenama iz 1983. godine. Provođenje istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Zavoda za javno zdravstvo (ZZJZ) Osječko-baranjske županije.

Informirani pristanak je u prilogu.

Pored dobi i spola, za sve ispitanike prikupljeni su i podatci o nekim životnim navikama kao što su ovisnost, korištenje kontracepcije, tetovaža, body piercing i podatci o određenim simptomima bolesti kao što su bolovi u mišićima i gubitak apetita (promjena tjelesne težine). Prikupljeni su podatci i o tome jesu li ispitanici imali operativni zahvat prije 1993. godine, jesu li primili transfuziju krvi ili pripravak od krvi prije 1993. godine, te jesu li hemodijalizirani.

Uzorci pune krvi i plazme prikupljeni su u ambulanti Službe za mikrobiologiju, ZZJZ Osječko-baranjske županije. Puna je krv uzeta venepunkcijom u EDTA epruvete od 3,0 mL (uz etilendiaminotetraoctenu kiselinu, EDTA kao antikoagulans), a za dobivanje plazme krv je uzeta u PPT (Plasma Preparation Tube) epruvete s gelom od 8,5 mL. Krv s EDTA skladištena je na 4°C u hladnjaku Laboratorija za molekularnu dijagnostiku mikroorganizama ZZJZ Osječko-baranjske županije. PPT epruvete s uzorcima centrifugirane su u roku do 2 sata od vađenja krvi brzinom od 2500 okretaja u minuti u trajanju od 10 minuta u centrifugi Rotanta 460 (Hettich, Njemačka) s visećim rotorom. Nakon centrifugiranja uzorka, gel u PPT epruveti napravi barijeru između eritrocita i plazme te se na taj način onemogućava zagađenje plazme slobodnim hemoglobinom. Takav uzorak skladišten je na – 20 °C u ledenici Laboratorija za molekularnu dijagnostiku mikroorganizama ZZJZ Osječko-baranjske županije do ispitivanja.

Svim ispitanicima određena je prisutnost protutijela specifičnih za HCV, prisutnost virusa kvantitativnim testom i određeni su polimorfizmi TLR2 rs5743708, TLR4 rs4986790 i TLR4 rs4986791. Ispitanicima s KHC-om određen je genotip HCV-a. Oni su podijeljeni u skupinu koja ne prima terapiju i skupinu koja prima terapiju prema postojećim terapijskim protokolima ovisno o genotipu.

Podjela oboljelih od KHC-a:

- skupina 1, neliječeni ispitanici – 27 ispitanika. U ovoj skupini kvantitativno je utvrđena visina viremije.
- skupina 2, liječeni ispitanici – 33 ispitanika. U ovoj skupini ispitanici su liječeni kombinacijom PEG-IFN- $\alpha$  i ribavirina ovisno o genotipu virusa. Ispitanicima je određen broj virusnih kopija tri puta definirano odgovarajućim terapijskim algoritmom liječenja. Kvantitativno je utvrđena visina viremije kroz vrijeme i uspješnost primjenjenog terapijskog protokola.

Kontrolnu skupinu (40 ispitanika) činili su ispitanici koji nemaju aktivnu replikaciju virusa odnosno nemaju prisutan genski materijal virusa u krvi (HCV RNA).

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Određivanje protutijela imunoenzimnim postupkom

Specifična protutijela mogu se određivati različitim metodama kao što su imunoenzimski test EIA (engl. *enzyme immunoassay*) i ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)<sup>45, 96</sup>, neizravna imunofluorescencija (IFA, engl. *indirect immunofluorescence assay*), imunoblot testovi (WB, engl. *western blot*), radioimunotest (RIA, engl. *radioimmunoassay*)<sup>245</sup>, reakcija vezanja komplementa (RVK), aglutinacija te precipitacija. Novije metode (EIA, IFA, WB) omogućuju detekciju specifičnih protutijela IgM, IgG, IgA i imaju bolju osjetljivost i specifičnost.

Danas se koriste enzimimunološke metode koje odlikuje visoka specifičnost, osjetljivost, ponovljivost te brzo i jednostavno izvođenje.

Svaki rezultat serološke pretrage treba smatrati reaktivnim odgovorom specifičnih protutijela na antigen, jer je sigurno da se protutijela stvaraju kao odgovor na antigeni poticaj.

### **3.2.1.1. Određivanje protutijela korištenjem komercijalno dostupnog test paketa Monolisa™ Anti-HCV PLUS**

#### *Načelo metode:*

Prisutnost protutijela određena je testom Monolisa™ Anti-HCV PLUS version 2, Bio-Rad, Francuska. To je test u kojemu se indirektnom imunoenzimskom metodom omogućuje određivanje protutijela specifičnih za HCV u serumu ili plazmi ispitanika. Princip metode je sljedeći: na čvrstu fazu (jažica mikrotitarske ploče) vezani su pročišćeni rekombinirani proteini nestrukturnih (NS3 i NS4) i strukturalnih regija hepatitis C genoma. Doda se uzorak s protutijelom te se inkubira da se protutijelo (ukoliko je prisutno) veže za navedene antigene uz nastanak kompleksa antigen-protutijelo. Protutijela vezana za antigen dokazuju se pomoću kozjih protutijela obilježenih peroksidazom. Nevezani konjugat se ispere puferom i doda supstrat za enzim. Nakon inkubacije doda se otopina koja zaustavlja enzimsku reakciju. Vrijednost apsorbancije određuje se spektrofotometrijski. Specifičnost testa iznosi 99,8 %<sup>166</sup>.

#### *Postupak:*

Svi reagensi iz test-paketa temperirani su 30 minuta na sobnoj temperaturi prije korištenja. Reagensi R6 i R7 homogenizirani su okretanjem nekoliko puta. Reagens R2 razrijeđen je 20 puta (1:20) u destiliranoj vodi. Radni supstrat napravljen je tako što je reagens R9 razrijeđen u reagensu R8 u omjeru 1:11. Čuvan je u mraku na sobnoj temperaturi i upotrijebljen unutar 6 sati. Jažice mikrotitarske ploče presvučene su trima pročišćenim rekombiniranim antigenima specifičnim za HCV. U njih je



dodano 80  $\mu$ l reagensa R6, pipetom volumena od 10 do 100  $\mu$ L (Research, Eppendorf) i 20  $\mu$ l plazme. Plazma i reagens se homogeniziraju te se mikrotitarska ploča inkubira 60 minuta na 40 °C u inkubatoru Binder (Njemačka). Nakon inkubiranja mikrotitarska ploča je isprana pomoću automatskog ispiraća Biochrom Asys Atlantis 2, Engleska, a preostala tekućina u jažicama je odstranjena okretanjem mikrotitarske ploče na lako upijajući papir. U svaku jažicu dodano je 100  $\mu$ l konjugata (reagens R7) nakon čega je mikrotitarska ploča inkubirana 30 minuta na 40°C u inkubatoru. Serijom ispiranja ispran je nevezani konjugat. U reakciju je dodana otopina vodikovog peroksida i kromogenog supstrata tetrametil benzidina (pripremljeni radni substrat R8 + R9), koji oksidacijom vodenog peroksida daje ružičasto obojenje. Slijedi inkubacija od 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku kako bi se razvila reakcija. Dodatkom stop-otopine (R10) ružičasto obojenje nestaje kod negativnih uzoraka ili mijenja boju u žutu kod pozitivnih uzoraka. Apsorbancija se mjeri najmanje 4 minute nakon dodatka stop otopine, a unutar 30 minuta od prekida reakcije na 450/620-700 nm na spektrofotometrijskom čitaču mikrotitarskih ploča Biochrom Asys Expert Plus, Engleska. Prisutnost ili odsutnost protutijela specifičnih za HCV određena je usporedbom vrijednosti apsorbancije svakog uzorka i izračunate CO (cut-off) vrijednosti.

### **3.2.2. Izolacija DNA**

Ukupna DNA izolirana je iz pune krvi koja je uzorkovana venepunkcijom uz antikoagulans EDTA korištenjem komercijalno dostupnog test-paketa za izolaciju ukupne genomske DNA High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

### 3.2.2.1. Izolacija DNA korištenjem komercijalno dostupnog test paketa High Pure PCR Template Preparation Kit

#### *Načelo metode:*

High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka, je jedan od najpouzdanijih, ali i najjednostavnijih izolacijskih test-paketa za izolaciju nukleinskih kiselina iz različitih uzoraka kao što su puna krv, kultura stanica i tkivo. Načelo rada zasniva se na uporabi kemikalija u samom paketu i svodi se na osnovne postupke digestije ukupne krvi s EDTA uz prisutnost proteinaze K te transferiranje uzoraka na posebnu, silikagelnu membranu. Serijom uzastopnog nanošenja pufera za ispiranje na membranu, za koju je vezana DNA i uzastopnog centrifugiranja, DNA se ispere od zaostalih proteina. U konačnici, na ispranu DNA nanosi se pufer za otapanje DNA te otopljena DNA centrifugiranjem prolazi silikagelnu membranu u sterilnu polipropilensku epruvetu. Koristeći navedeni test-paket, proizvođač je odredio prinos od 3-6 µg genomske DNA, ukoliko je 200 µl početni volumen ukupne krvi s EDTA za izolaciju <sup>164</sup>.

#### *Postupak:*

Proteinaza K otopljena je u 4,5 ml dvostruko destilirane vode (ddH<sub>2</sub>O). Pufer Inhibitor Removal Buffer pripravljen je dodatkom 20 ml apsolutnog etilnog alkohola. Pufer za ispiranje Wash Buffer pripremljen je dodatkom 80 ml apsolutnog etilnog alkohola. Vodena kupelj Dubnoft Bath-BSD/D (International PBI SpA) je uključena i temperatura je podešena na 70°C. U zagrijanu vodenu kupelj na inkubiranje je stavljen Elution Buffer. U pravilno označene sterilne mikrocentrifugalne tube od 2 ml (Eppendorf, Njemačka) dodano je 200 µl ukupne EDTA krvi, pipetom volumena od 100 do 1000 µl (Research, Eppendorf), 200 µl pufera Binding Buffer i 40 µl proteinaze K, pipetom volumena od 10 do 100 µL (Research, Eppendorf). Smjesa je dobro izmiješana na vibracijskoj mješalici EV-102 (Tehnica). Epruvete su inkubirane 10 minuta na 70°C u termobloku (Thermomixer comfort, Eppendorf). Zatim se u iste tube odmjeri 100 µl izopropanola i snažno se izmiješa na vibracijskoj mješalici. Kolone sa silikagelnim membranama se pravilno označe. Pipetom se odmjeri 540 µl dobivene

mješavine svakog uzorka na silika-membranu u koloni s epruvetom za sakupljanje, te se navedene kolone centrifugiraju 1 minutu na 8000 x g u mikrocentrifugi (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Odbace se epruvete za sakupljanje te se kolone premještaju u nove epruvete za sakupljanje. Na membranu u koloni se pipetom odmjeri 500 µL pufera Inhibitor Removal Buffer te se kolone centrifugiraju 1 minutu na 8000 x g. Odbace se epruvete za sakupljanje te se kolone premještaju u nove epruvete za sakupljanje. Na silikagelnu membranu u koloni se pipetom odmjeri 500 µL pufera za ispiranje Wash Buffer te se kolone centrifugiraju 1 minutu na 8000 x g. Odbace se epruvete za sakupljanje te se kolone premještaju u nove epruvete za sakupljanje. Još jednom se na silikagelnu membranu u koloni pipetom odmjeri 500 µL pufera za ispiranje Wash Buffer te se kolone centrifugiraju 1 minutu na 8000 x g. Odbace se epruvete za sakupljanje te se kolone premještaju u nove epruvete za sakupljanje i centrifugiraju 10 sekundi na 17000 x g. Odbace se epruvete za sakupljanje, te se kolone premještaju u sterilne, pravilno označene mikrocentrifugalne tube. Na silikagelnu membranu u koloni se pipetom odmjeri 200 µl ugrijanog pufera za otapanje DNA (Elution Buffer) te se kolone centrifugiraju 1 minutu na 8000 x g. Sadržaj dobiven u mikrocentrifugalnoj tubi je 200 µl otopljene DNA koja je pohranjena na – 20 °C.

Izolirana DNA je dalje korištena za određivanje SNP-ova.

### **3.2.3. Izolacija RNA**

HCV RNA izolirana je iz plazme ispitanika uzete venepunkcijom u PPT epruvete korištenjem dva komercijalno dostupna test paketa, High Pure System Viral Nucleic Acid Kit (Roche) i Amplicor HCV Specimen Preparation Kit (Roche).

### 3.2.3.1. Izolacija RNA korištenjem komercijalno dostupnog test paketa High Pure System Viral Nucleic Acid Kit

#### *Načelo metode:*

High Pure System Viral Nucleic Acid Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka, je izolacijski test-paket za izolaciju nukleinskih kiselina iz seruma ili plazme. Načelo rada zasniva se na uporabi kemikalija u samom paketu, a svodi se na postupak izolacije nukleinskih kiselina uz prisutnost proteinaze K te transferiranje nukleinskih kiselina na silikagelnu membranu. HCV RNA se izolira iz plazme ispitanika pomoću lize virusnih čestica s lizirajućim reagensom iz kita, nakon čega slijedi precipitacija RNA izopropilnim alkoholom i otapanje u diluentu. Serijom uzastopnog nanošenja pufera za ispiranje na membranu i uzastopnog centrifugiranja, RNA se ispere od zaostalih nevezanih supstanci kao što su soli i proteini. Na ispranu RNA nanosi se pufer za eluiranje te otopljena RNA centrifugiranjem prolazi silikagelnu membranu u nosač za eluciju <sup>163</sup>.

#### *Postupak:*

Vodena kupelj Dubnoft Bath-BSD/D (International PBI SpA) je uključena i temperatura je podešena na 50°C. Termoblok (Thermomixer comfort, Eppendorf) je uključen, temperatura je podešena na 70°C i u njega je stavljen na inkubiranje pufer za eluciju (ELB). Radni pufer za uklanjanje inhibitora (IRB) pripremljen je dodatkom 20 ml 96-100 %tnog etanola. Radni pufer za ispiranje (WASH) pripremljen je dodatkom od 50 ml 96-100 %tnog etanola i 30 ml deionizirane vode. Liofilizirana RNA (CAR) otopljena je dodatkom od 500 µl pufera za eluciju. Proteinaza K (PK) otopljena je dodatkom od 5 ml pufera za eluciju. HCV-kvantitativni standard (HCV QS, engl. *HCV quantitation standard*) izmiješan je prije uporabe na vibracijskoj mješalici EV-102 (Tehnica). HCV QS neinfektivni je RNA transkript redosljedom baza nalik ciljnoj sekvenci koji je dodan svakom uzorku kao dio lizirajućeg reagensa. Standard se dodaje u poznatoj koncentraciji, izraženoj u internacionalnim jedinicama po mililitru (IU/ml), a služi utvrđivanju virusnog titra.

Radni lizirajući reagens za 12 uzoraka pripremljen je na sljedeći način:

LYS pufer	7.0 ml
CAR	140 µl
C-TAQ QS	56 µl
PK	1,4 ml

Promiješan je okretanjem 10-15 puta.

U pravilno označeni transparentni nosač dodano je 625 µl pripremljenog radnog lizirajućeg reagensa, pipetom volumena od 100 do 1000 µl (Research, Eppendorf) i 500 µl uzorka plazme i kontrola. Nosač je vorteksiran 10 sekundi na vibracijskoj mješalici te inkubiran 10 minuta na 50°C u vodenoj kupelji. Nakon dodatka izopropanola i serije centrifugiranja u centrifugi Rotanta 460 (Hettich, Njemačka) s visećim rotorom dobiven je lizat. 750 µl lizata je pažljivo pipetom preneseno na nosač s filtermembranama. Nakon centrifugiranja nosača pipetom je prenesen i ostatak lizata iz transparentnog nosača na nosač s filtermembranama te je ponovljeno centrifugiranje. Nanošenjem pufera za uklanjanje inhibitora na nosač s filtermembranama, serijom uzastopnog nanošenja pufera za ispiranje i uzastopnog centrifugiranja RNA se ispere i ostane vezana za filtermembranu. Nosač s filtermembranama se prenese na nosač za eluciju i pričvrsti kukicama. U konačnici se na sredinu filtermembrane nanosi pufer za eluciju. Nosač se inkubira na sobnoj temperaturi te centrifugira. Centrifugiranjem RNA prolazi filtermembranu i ostaje u nosaču za eluciju.

Izolirana RNA je dalje korištena za kvantitativno određivanje HCV-a.

### **3.2.3.2. Izolacija RNA korištenjem komercijalno dostupnog test paketa Amplicor HCV Specimen Preparation Kit**

*Načelo metode:*

Amplicor HCV Specimen Preparation Kit, verzija 2.0, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka, je izolacijski test-paket za izolaciju RNA iz seruma ili plazme.

Načelo rada zasniva se na uporabi kemikalija u samom paketu, a svodi se na postupak izolacije HCV RNA pomoću lize virusnih čestica s lizirajućim reagensom uz prisutnost interne kontrole (IC). IC je neinfektivni RNA transkript veličinom i redosljedom baza nalik ciljnoj sekvenci, a služi kao kontrola izolacije i umnožavanja. Nakon lize virusnih čestica slijedi precipitacija RNA s izopropilnim alkoholom i otapanje u diluentu <sup>165</sup>.

*Postupak:*

Pripremljen je 70 %tni alkohol (za 12 uzoraka: 11 ml 95 % etanola i 4 ml destilirane vode). Radni lizirajući reagens (Working Lysis Reagent) pripremljen je tako što je u bočicu pufera (HCV LYS) dodana interna kontrola (HCV IC) koja je prije uporabe dobro izmiješana na vibracijskoj mješalici EV-102 (Tehnica). U pravilno označene sterilne mikrocentrifugalne tube od 2 ml (Eppendorf, Njemačka) dodano je 200 µl već pripremljenog radnog lizirajućeg reagensa, pipetom volumena od 100 do 1000 µl (Research, Eppendorf) i 200 µl plazme. Smjesa u tubama je dobro izmiješana na vibracijskoj mješalici i inkubirana 10 minuta na 60°C u termobloku (Thermomixer comfort, Eppendorf). Dodavanjem izopropanola i 70 %tnog alkohola te serijom uzastopnog centrifugiranja u mikrocentrifugi (Centrifuge 5417R, Eppendorf) dobiven je talog u kojem se nalazi HCV RNA. Talog je otopljen dodatkom 200 µl pufera za otapanje (HCV DIL), razbijanjem taloga sterilnim filter-nastavkom od 200 µl i snažnim miješanjem na vibracijskoj mješalici.

Izolirana RNA je dalje korištena za određivanje genotipa HCV-a.

#### **3.2.4. Polimerazna lančana reakcija**

Polimerazna lančana reakcija (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) je *in vitro* metoda umnožavanja ciljnih kratkih slijedova DNA pomoću specifičnih jednolančanih oligonukleotidnih sonda, tzv. početnica (klica), uz katalitičko djelovanje termostabilne DNA polimeraze (*Taq* polimeraza). Metoda je toliko osjetljiva da može započeti od jedne molekule DNA. Krajevi slijeda DNA koji se želi umnožiti su komplementarni

početnicama. Za odvijanje PCR reakcije, osim kalupa DNA, para početnica i *Taq* polimeraze, potrebni su i nukleotidi poput deoksiadenozin-5'-trifosfata (dATP), deoksigvanozin-5'-trifosfata (dGTP), deoksicitidin-5'-trifosfata (dCTP) i deoksitimidin-5'-trifosfata (dTTP), u istom omjeru. Osim navedenog, PCR reakcija odvija se uz dodatak magnezijevih soli i pufera za PCR. PCR reakcija odvija se u 3 koraka: razdvajanje dvolančanog kalupa DNA, sparivanje (hibridizacija) početnica s DNA jednolančanim kalupom i sinteza (produljenje) lanca DNA. Sinteza DNA ili produljenje početnica uvijek se događa u smjeru ciljnog slijeda. Višekratnim, uzastopnim ponavljanjem tri navedena koraka, nakon "n" broja ponavljanja ciljni slijed umnožit će se  $2^n$  puta<sup>150, 162</sup>.

#### 3.2.4.1. PCR u stvarnom vremenu

PCR u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) je izrazito pouzdana i precizna metoda za identifikaciju i kvantifikaciju patogenog virusnog, bakterijskog ili parazitarog podrijetla. Za reakciju su potrebne vrlo male količine izolirane DNA ili RNA što omogućuje uporabu ove metode u slučajevima kada na raspolaganju imamo male i drugim metodama nedovoljne količine uzorka. U reakciji real-time PCR produkti reakcije obilježeni su fluorescentnom bojom i analiziraju se istovremeno i dok nastaju (u stvarnom vremenu). Mjerenjem fluorescencije mjerimo nastalu DNA, jer količina fluorescencije srazmjerna je količini PCR proizvoda<sup>157</sup>. Real-time PCR određuje i točku taljenja (engl. *melting point*) novonastalog proizvoda, kada se dva lanca DNA odvoje i fluorescencija naglo prestaje. Ovim provjeravamo specifičnost produkta, jer svi produkti za specifičan par početnica moraju imati istu krivulju taljenja (engl. *melting curve*) u kojoj se mjeri fluorescencija u odnosu na temperaturu. Danas se u praksi sve više koristi real-time PCR metoda koja se zasniva na korištenju neobilježenih specifičnih početnih oligonukleotida i specifično obilježene probe. Real-time PCR koristi se za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju DNA ili RNA. Apsolutnom kvantifikacijom možemo precizno odrediti broj kopija DNA ili RNA u nekom uzorku uspoređujući fluorescenciju sa standardnom krivuljom. Relativnom pak kvantifikacijom

možemo analizirati relativne promjene u količini transkripta. Real-time PCR sve veću primjenu nalazi u SNP analizi u kojoj se koriste dvije specifične i različito obilježene probe. SNP analiza koristi se u molekularnoj genetici u testiranju rizika za obolijevanje od određene bolesti te u testiranju mogućeg odgovora na terapiju kod pojedinca.

#### **3.2.4.2. Multipleks PCR**

Multipleks PCR (engl. *multiplex polymerase chain reaction*) je istovremena analiza više segmenata DNA u istom uzorku. Istovremeno se koristi više parova početnica koje moraju imati slične optimalne temperature za vezanje (podjednaka dužina i GC sastav). Nedostatak je što je optimiziranje metode vrlo složeno. Multipleks PCR se upotrebljava u mnogim područjima dijagnostike nukleinskih kiselina uključujući analizu delecije gena te analize mutacija i polimorfizama gena <sup>25, 66, 91</sup>.

#### **3.2.5. Reverzna transkripcija**

Reverzna transkripcija (RT, engl. *reverse transcription*) je metoda kojom se molekula RNA prevodi u cDNA djelovanjem enzima reverzne transkriptaze. Nakon nje obično slijedi umnažanje odsječka cDNA postupkom PCR-a pa se taj cijeli postupak naziva reverzna transkripcija s polimeraznom lančanom reakcijom (RT-PCR, engl. *reverse transcription-polymerase chain reaction*).

##### **3.2.5.1. RT-PCR za HCV**

*Postupak:*

Pripremljen je radni Master Mix prema uputama proizvođača komercijalno dostupnog test-paketa Amplicor<sup>®</sup> HCV Amplification Kit, verzija 2.0, Roche Diagnostics GmbH,



Mainnheim, Njemačka. U 700 µl HCV Master Mix-a (HCV MMX) dodano je 100 µl otopine mangana (HCV Mn<sup>2+</sup>). Za PCR reakciju ukupnog volumena od 100 µl korišteno je 50 µl pripremljenog Master Mix-a i 50 µl izolirane RNA korištenjem komercijalno dostupnog test-paketa Amplicor HCV Specimen Preparation Kit. Izolirana RNA je prvo prevedena u cDNA reverznom transkripcijom, a onda je pomoću PCR-a umnažana visoko konzervirana 5' UTR regija dužine sekvence od 244 nukleotida. Umnažanje specifičnog dijela genoma HCV-a radilo se na PCR uređaju GeneAmp PCR System 9700 sa zlatnim blokom, proizvođača Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD. Istovremeno je umnažana i interna kontrola koja je dodana svakom uzorku kao dio lizirajućeg reagensa u izolaciji HCV RNA, a služi kao kontrola izolacije i umnožavanja.

Na navedenom uređaju snimljeni su slijedeći optimizirani uvjeti RT-PCR reakcije:

HOLD program:	5 minuta (min) 50 °C
HOLD program:	30 min 62 °C
36 ciklusa ponavljanja:	0 sekundi (s) 90 °C, 25 s 58 °C
HOLD program:	91 °C (ne duže od 3 sata)

Dobiveni PCR produkti su kemijski denaturirani dodavanjem 100 µl DN pufera u cilju dobivanja jednolančanih PCR produkata i dalje su korišteni za određivanje genotipa HCV-a<sup>165</sup>.

### 3.2.6. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu zasniva se na osobini da se tijekom PCR reakcije količina DNA udvostruči u svakom ciklusu. Svakim ciklusom eksponencijalno se povećava količina DNA u uzorku, što se prati fluorescentnom bojom koja se umeće u novostvorene lance cDNA. Fluorescencija se povećava svakim ciklusom, a mjeri se u kojem ciklusu ima dovoljno cDNA da bi fluorescencija porasla iznad praga detekcije (Ct vrijednost). Što neke cDNA u uzorku ima više, ranije će se umnožiti

dovoljno da prijeđe prag detekcije, odnosno Ct vrijednost bit će niža, dok će uzorak s manje cDNA kasnije preći prag detekcije i stoga će imati višu Ct vrijednost. Kvantitativno određivanje broja kopija DNA ili RNA u nekom uzorku dobiva se usporedbom fluorescencije sa standardnom krivuljom.

Kvantitativno određivanje HCV RNA vrlo je važno u praćenju antiviralnog odgovora na primjenjenu terapiju <sup>199</sup>.

### **3.2.6.1. Kvantitativno određivanje HCV-a korištenjem komercijalno dostupnog test-paketa COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> HCV Test**

#### *Načelo metode:*

Za dokaz prisutnosti HCV-a i za određivanje broja virusnih kopija korišten je kvantitativni test COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> HCV Test, v2.0, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka. Načelo rada zasniva se na uporabi Master Mix-a i mangana koji se nalaze u samom paketu. Master Mix sadrži termostabilnu Z05 DNA polimerazu koja ima DNA polimeraznu aktivnost i aktivnost reverzne transkriptaze. Osjetljivost testa iznosi 25 IU/mL <sup>77, 163</sup>.

#### *Postupak:*

Pripremljen je radni Master Mix prema uputama proizvođača. Za PCR reakciju ukupnog volumena od 100 µl korišteno je 50 µl pripremljenog Master Mix-a i 50 µl izolirane RNA. Na automatskom analizatoru Cobas<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> 48 prvo je RNA, izolirana korištenjem komercijalno dostupnog test-paketa High Pure System Viral Nucleic Acid Kit, prevedena u cDNA reverznom transkripcijom. Nakon toga je pomoću PCR-a umnažana visoko konzervirana 5' UTR regija uz HCV-specifične početnice i HCV-kvantitativni standard. Uz kontrole i HCV-kvantitativni standard, AMPLILINK softver navedenog analizatora prema kalibracijskoj krivulji odredi visinu virusnog titra. Broj kopija HCV RNA izražen je u IU/ml sukladno međunarodnom standardu (NIBSC Code 96/798).

### 3.2.7. Određivanje genotipa HCV-a

Genotip HCV-a određen je korištenjem komercijalno dostupnog test-paketa Linear Array Hepatitis C Virus Genotyping Test. Navedenim testom određuje se 6 glavnih genotipova HCV-a koji se označavaju arapskim brojevima od 1 do 6.

#### 3.2.7.1. Određivanje genotipa HCV-a korištenjem komercijalno dostupnog test-paketa Linear Array Hepatitis C Virus Genotyping Test

##### *Načelo metode:*

Linear Array Hepatitis C Virus Genotyping Test, proizvođača Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka, je komercijalno dostupan test-paket za određivanje genotipova HCV-a. Načelo rada zasniva se na uporabi nitroceluloznih trakica (stripova) i reagensa koji se nalaze u test paketu. Jednolančani biotinizirani produkti vežu se za specifične oligonuleotidne probe vezane za nitroceluloznu traku na kojoj su probe za svih 6 genotipova HCV-a <sup>165</sup>.

##### *Postupak:*

Vodena kupelj Dubnoft Bath-BSD/D (International PBI SpA) je uključena i temperatura je podešena na 50°C. Puffer Working Hybridization Buffer (WHB) pripremljen je tako što je u 432,5 ml destilirane vode dodano 25 ml reagensa SSPE i 10 ml reagensa SDS. Puffer Working Stringent Wash Buffer (WSWB) pripremljen je tako što je u 965 ml destilirane vode dodano 25 ml reagensa SSPE i 10 ml SDS reagensa. Puffer za ispiranje Working Ambient Wash Buffer (WAWB) pripremljen je tako što je u 1447,5 ml destilirane vode dodano 37,5 ml reagensa SSPE i 15 ml reagensa SDS. Puffer Working Citrate Buffer (WCB) pripremljen je tako što je u 450 ml destilirane vode dodano 50 ml CIT reagensa. Prije uporabe pufferi WHB i WSWB ugrižani su u vodenoj kupelji 15 minuta na 50°C. Nakon toga je temperatura vodene kupelji podešena na 55°C. Konjugat je pripremljen tako što je u 5 ml ugrižanog WSWB dodano 10 µl reagensa SA-HRP za jedan strip, a radni supstrat za jedan strip

pripremljen je dodatkom 1 ml reagensa SUB B u 4 ml reagensa SUB A. U 24-well kadicu sterilnom pincetom su stavljene nitrocelulozne trake. Svakoj je trakici dodano 4 ml ugrijanog WHB pufera i 100 µl denaturiranog amplikona. Kadica je pokrivena poklopcem i stavljena u vodenu kupelj na inkubiranje 20 minuta na 55°C uz brzinu miješanja od 60 RPM. Jednolančani biotinizirani produkti tijekom inkubacije vežu se za specifične oligonukleotidne probe vezane za nitroceluloznu traku. Nakon vezanja, nitrocelulozne trake isperu se puferima za ispiranje te se doda pripremljeni supstrat u kojem se nalaze vodikov peroksid i kromogen tetrametil benzidin (TMB). Peroksidaza katalizira oksidaciju vodikovog peroksida te posljedično oksidaciji kromogena TMB nastane plava boja na onom mjestu na nitroceluloznoj traci gdje se dogodila specifična hibridizacija. Vidljivi plavi bandovi uspoređeni su s bandovima referalne tablice te je očitani prisutni HCV-genotip u uzorku.

### 3.2.8. Određivanje polimorfizama gena *tlr2* i *tlr4* na uređaju LightCycler

Polimorfizmi gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791 određeni su real-time PCR-om na uređaju LightCycler (verzija 1.5) prema uvjetima i preporukama proizvođača početnica i proba, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Njemačka. LightCycler je vrlo brzi PCR uređaj u kombinaciji s mikrovolumnim fluorimetrom. Temperatura se u termalnoj komori kontrolira pomoću grijanog zraka i zraka same prostorije. Raspršivač zraka ravnomjerno raspoređuje zrak koji kruženjem stvara jednaku temperaturu unutar komore. Zahvaljujući maloj masi zraka koji služi kao medij za prijenos topline, moguće je postići vrlo brze promjene temperature unutar komore<sup>100</sup>.

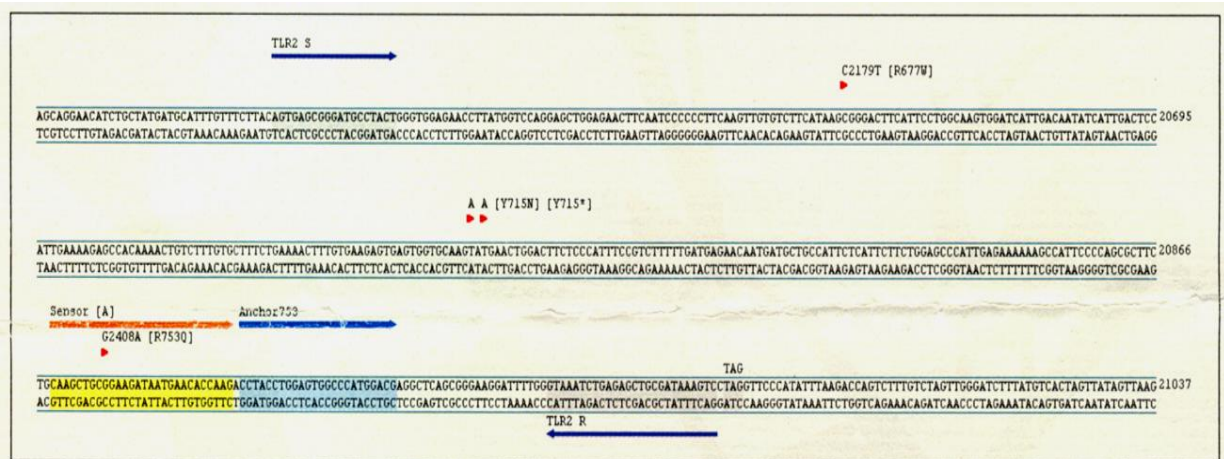
Za PCR koriste se posebno dizajnirane staklene kapilare, LightCycler® Capillaries (20 µl), proizvođača Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka, koje omogućuju korištenje vrlo malog volumena reakcijske smjese. Zbog velikog omjera površine prema volumenu kapilare, one omogućuju vrlo brze promjene temperature, a time i brze cikluse umnažanja. Kapilare istodobno služe i kao kivete za mjerenje fluorescencije nastalih PCR produkata.

### 3.2.8.1. Određivanje SNP-a *tlr2* gena metodom real-time PCR

Detekcija polimorfizma gena *tlr2* rs5743708 (G2258A, R753Q) postignuta je metodom real-time PCR-a, analizom krivulje temperature taljenja ( $T_m$ ) na uređaju LightCycler. Za polimorfizam gena *tlr2* čija je oznaka rs5743708 naručene su početnice i probe od proizvođača TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Njemačka. Početnice su liofilizirane u množini od 5 nmol, a probe u množini od 1 nmol, također liofilizirane. Otapanjem početnica u 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O dobije se matična otopina koncentracije 50  $\mu$ M koja se pohranjuje na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Iz matične otopine priprema se radna otopina početnica TLR2 S i TLR2 R, koncentracije 0,5  $\mu$ M. Probe su otopljene u 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Tako je dobivena matična otopina koja se pohranjuje na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Iz matične se otopine priprema radna otopina proba Sensor [A] i Anchor 753, koncentracije 0,225  $\mu$ M. Slikom 3.1 prikazan je slijed uzvodne i slijed nizvodne početnice.

Za PCR reakciju ukupnog volumena od 20  $\mu$ l korišteno je: 5  $\mu$ l kalupa DNA, početnice TLR2 S i TLR2 R koncentracije 0,5  $\mu$ M, probe Sensor [A] i Anchor 753, koncentracije 0,225  $\mu$ M, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, ddH<sub>2</sub>O i FastStart proizvođača Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka.

Na navedenom uređaju snimljeni su optimizirani uvjeti PCR reakcije: početna denaturacija  $95^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 10 min, 40 ciklusa ponavljanja denaturacije ( $95^{\circ}\text{C}/0$  s,  $20^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ), spajanje početnica  $55^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 10 s i produljenje početnica  $72^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 18 s. Određivanje krivulje taljenja: 1 ciklus  $95^{\circ}\text{C}/0$  s,  $53^{\circ}\text{C}/30$  s, slijedi povećanje temperature na  $80^{\circ}\text{C}$  pa snižavanje od  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{s}$ . Umnoženi PCR produkti otkriju se mjerenjem fluorescencije koja nastaje uporabom specifičnih hibridizacijskih proba.



Slika 3.1. Slijed nukleotida uzvodne i nizvodne početnice za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708.

Hibridizacijske su probe dva različita oligonukleotida koji se vežu na unutrašnji odsječak umnoženih PCR produkata. Na 3' kraju sensor [A] probe vezan je fluorofor-donor (fluorescein), dok je na 5' kraju druge probe vezan fluorofor-akceptor (LightCycler – Red 640)<sup>85, 86</sup> (tablica 3.1).

Tablica 3.1. Slijed nukleotida i temperature taljenja početnica i proba za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708

	TLR2 G2258A [R753Q] rs5743708	Tm
TLR2 S	AgTgAgCgggATgCCTACT	56,9 °C
TLR2 R	gACTTTATCgCAgCTCTCAgATTTAC	56,9 °C
Sensor [A]	CAAgCTgCgAAgATAATgAACACCAAg – FL	62,9 °C
Anchor 753	640 – CCTACCTggAgTggCCCATggACg p	70,0 °C

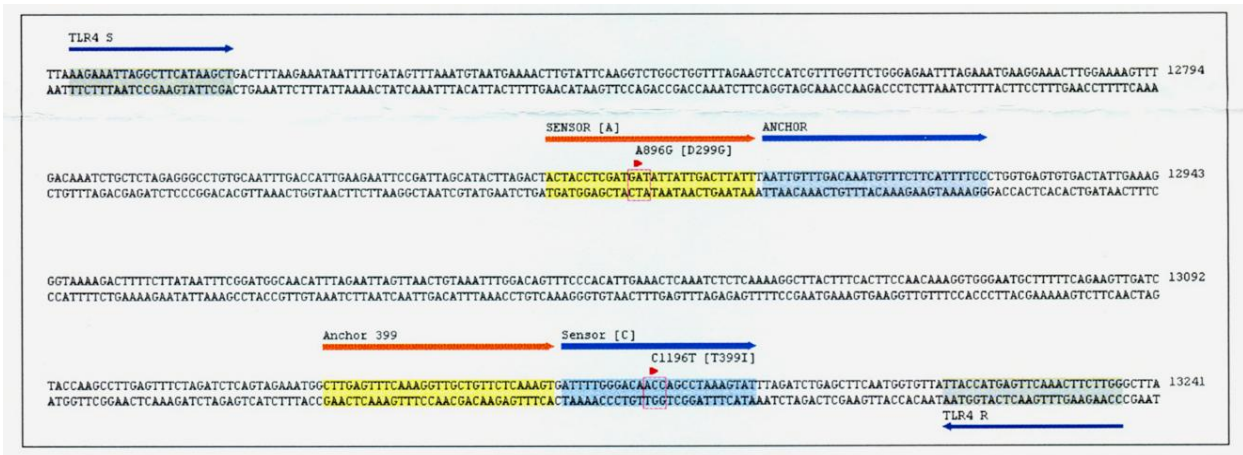
Vežanjem hibridizacijskih proba na jednolančanu DNA nastaje heterodupleks čija Tm ovisi o duljini molekule te sastavu nukleotida i stupnju homologije. Svaka hibridizacijska proba ima svoju ulogu. Jedna se veže na područje DNA u kojem se

nalazi moguća mutacija, a druga se veže na susjedno područje. Hibrid između DNA i hibridizacijske probe u kojem nema potpune homologije ima višu  $T_m$  od hibrida s potpunom homologijom. Prema tome, na temelju  $T_m$  razlikuje se genotip divljeg tipa od genotipa mutanta i heterozigota. Dobivene vrijednosti  $T_m$  prikazane su grafički u obliku krivulje taljenja kao prva negativna devijacija promjene fluorescencije s temperaturom ( $-dF/dT$ ). Grafički je to očitano kao vršna vrijednost <sup>100</sup>.

### 3.2.8.2. Određivanje SNP-a *tlr4* gena metodom multipleks real-time PCR

Detekcija polimorfizama gena *tlr4* rs4986790 (A896G, D299G) i *tlr4* rs4986791 (C1196T, T399I) postignuta je metodom multipleks real-time PCR, analizom krivulje  $T_m$  na različitim fluorescencijskim kanalima. Detekcija polimorfizama rađena je na uređaju LightCycler. Za dva polimorfizma gena *tlr4* čije su oznake rs4986790 i rs4986791 naručene su početnice i probe od proizvođača TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Njemačka. Početnice su liofilizirane u množini od 5 nmol dok su probe liofilizirane u množini od 1 nmol. Otapanjem početnica u 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O dobije se matična otopina koncentracije 50  $\mu$ M koja se pohranjuje na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Iz matične otopine priprema se radna otopina početnica, koncentracije 0,5  $\mu$ M. Probe su otopljene u 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Tako je dobivena matična otopina koja se pohranjuje na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Iz matične se otopine priprema radna otopina proba za oba polimorfizma, koncentracije 0,225  $\mu$ M. Slikom 3.2 prikazan je slijed uzvodne i slijed nizvodne početnice za oba navedena polimorfizma.

Za PCR reakciju ukupnog volumena od 20  $\mu$ l korišteno je: 5  $\mu$ l kalupa DNA, početnice za rs4986790 i rs4986791, koncentracije 0,5  $\mu$ M, probe za rs4986790 i rs4986791, koncentracije 0,225  $\mu$ M, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, ddH<sub>2</sub>O i FastStart proizvođača Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka.



Slika 3.2. Slijed nukleotida uzvodne i nizvodne početnice za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791.

Na navedenom uređaju snimljeni su optimirani uvjeti PCR reakcije: početna denaturacija 95°C u trajanju od 10 min, 45 ciklusa ponavljanja denaturacije (95°C/5 s, 20°C/s), spajanje početnica (54°C/10 s, 20°C/s) i produljenje početnica (72°C/25 s, 20°C/s). Određivanje krivulje taljenja: 1 ciklus 95°C/20 s, 40°C/20 s, slijedi povećanje temperature na 85°C pa snižavanje od 0,2°C/s. Umnoženi PCR produkti otkriju se mjerenjem fluorescencije koja nastaje uporabom specifičnih hibridizacijskih proba. Za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 na 3' kraju Sensor [A] probe vezan je fluorofor-donor (fluorescein), dok je na 5' kraju Anchor probe vezan fluorofor-akceptor (LightCycler – Red 640)<sup>65</sup> (tablica 3.2).

Tablica 3.2. Slijed nukleotida i temperature taljenja početnica i proba za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790

	TLR4 A896G [D299G] rs4986790	Tm
TLR4 S	ATTTAAAgAAATTAaggCTTCATAAgCT	55,1 °C
TLR4 R	CCAAgAAgTTTgAACTCATggTAA	55,7 °C
Sensor [A]	ACTACCTCgATgATATTATTgACTTATT – FL	52,8 °C
Anchor	640 – AATTgTTTgACAAATgTTTCTTCATTTTCC p	60,3 °C



Za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 na 3' kraju Anchor 399 probe vezan je fluorofor-donor (fluorescein), dok je na 5' kraju Sensor [C]<sup>640</sup> probe vezan fluorofor-akceptor (LightCycler – Red 705) (tablica 3.3).

Tablica 3.3. Slijed nukleotida i temperature taljenja početnica i proba za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791

	TLR4 C1196T [T399I] rs4986791	Tm
TLR4 S	AAgAAATTAaggCTTCATAAgCT	50,8 °C
TLR4 R	CCAAgAAgTTTgAACTCATggTAA	55,7 °C
Anchor 399	CTTgAgTTTCAAaggTTgCTgTTCTCAAAGT - FL	65,2 °C
Sensor [C] <sup>640</sup>	705 – ATTTTgggACAA <b>C</b> AgCCTAAAgTAT p	59,5 °C

U istoj reakcijskoj PCR smjesi nalaze se početnice i probe za oba polimorfizma. Hibridizacijske probe vežu se na jednolančanu DNA, pa ako nastane hibrid između DNA i hibridizacijske probe u kojem nema potpune homologije, vrijednost Tm je niža. Kod hibrida s potpunom homologijom Tm-vrijednost je viša. Na temelju toga se razlikuje genotip mutanta od genotipa heterozigota i divljeg tipa. Očitavanjem vrijednosti Tm na različitim fluorescencijskim kanalima odredili smo oba polimorfizma gen *tlr4* (rs4986790 i rs4986791).

### 3.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišteni su statistički programski paketi Statistica 8.0 (StatSoft), MedCalc 10.2. (MedCalc Software) i Microsoft Office Excel 2007/2010 (Microsoft).

Izračunata je dostatna veličina uzorka od 100 ispitanika prema Lehrovoj jednadžbi za izračunavanje veličine uzorka u ispitivanju razlike među proporcijama, uz snagu testa 90 % i  $\alpha$  pogrešku 0,05 (značajnost <0,05).

Statistički su obrađeni podatci kontrolne skupine i skupine oboljelih od KHC-a. Elementarnom statistikom obrađeni su opći podatci o ispitanicima dobiveni na temelju ispunjenog informiranog pristanka (dob, spol, prisutnost bolova u mišićima, gubitak apetita, hemodijaliza, tetovaža ili body piercing, intravensko korištenje droge, seksualni odnos bez zaštite, operativni zahvat ili primljena transfuzija krvi prije 1993. godine). Izračunata je mjera središnjice i raspršenja, odnosno medijan i raspon neparametrijskim testovima koji nisu ograničeni nenormalnom raspodjelom i malim brojem uzoraka. Za testiranje razlike u distribucijama dvije varijable upotrebljen je neparametrijski Mann-Whitneyev U test. Za testiranje razlika u distribucijama 3 ili više varijabli upotrebljen je ANOVA test. Napravljena je korelacija između navedenih polimorfizama, prisutnosti protutijela, broja virusnih kopija i genotipa. Razlike u učestalostima polimorfizama utvrđene su standardnim hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom. Značajnost promjene rizika za ispitivani ishod uz prisutnost polimorfizama gena *tlr2* i *tlr4* ispitana je omjerom izgleda (Odds ratio). Pri tome ispitivani ishod ima dihotomnu moguću vrijednost. Kod procjene statističke značajnosti rizika korišteni su 95 %-tni intervali pouzdanosti, odnosno ukoliko se između vrijednosti granica intervala pouzdanosti ne nalazi broj 1, tada je isključena mogućnost. Testiranje Hardy-Weinberg ekvilibrija genotipskih frekvencija učinjeno je egzaktnim testom (HWsim program, 50000 Monte Carlo simulacija), a neravnoteže alelne povezanosti izabranih polimorfizama TLR4 gena Lewontin D' i  $r^2$  koeficijentima (Haploview program <http://www.broadinstitute.org>). Za srednjoeuropske populacije su učestalosti pojedinih alela dostupne preko baze podataka HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Uspoređene su i izračunate učestalosti rjeđeg alela istraživanih polimorfizama. Statistička značajnost prihvaćena je uz  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Obilježja ispitanika po skupinama

U istraživanje je bilo uključeno 100 ispitanika: 40 zdravih, kontrolnih ispitanika i 60 ispitanika s već dijagnosticiranim KHC-om. Od toga je 59 muškaraca i 41 žena (tablica 4.1).

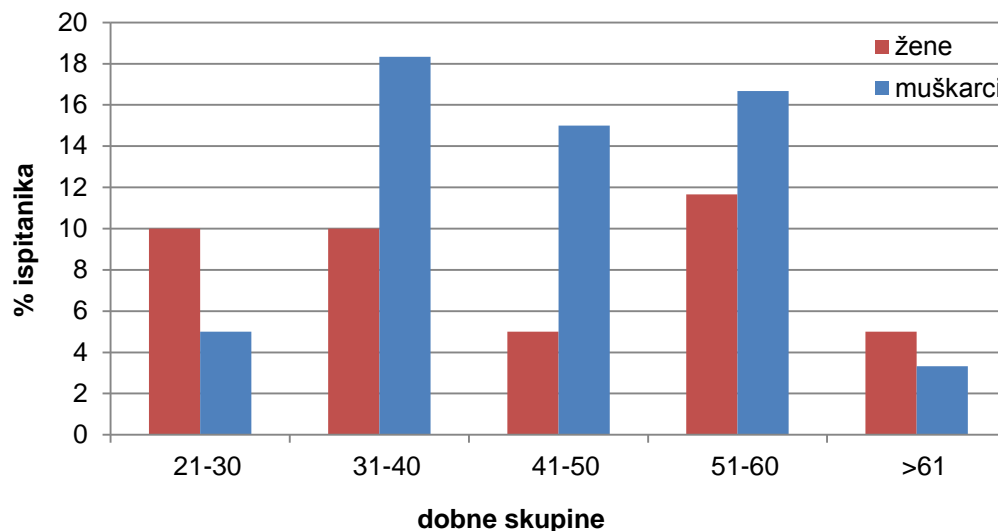
Tablica 4.1. Osnovna obilježja (dob i spol) ispitanika po skupinama

karakteristika ispitanika	skupina		statistika
	oboljeli od KHC-a (n=60)	kontrole (n=40)	
<b>dob</b> (godine)	44±12 (23-67) medijan = 48	41±12 (22-68) medijan = 38	Z*=1,1785 p=0,2384
<b>spol</b>			
<b>muški</b> (n=59)	35	24	$\chi^2=0,030$
<b>ženski</b> (n=41)	25	16	p=0,9669

\*Mann-Whittneyev U test

Prosječna životna dob kontrolnih ispitanika iznosila je 41±12 (22-68) godine. Medijan dobi kontrolnih ispitanika iznosio je 38 godina. Prosječna životna dob ispitanika oboljelih od KHC-a iznosila je 44±12 (23-67). Medijan dobi oboljelih od KHC-a iznosio je 48 godina. Nema značajne razlike u dobi (p=0,2384) i spolu (p=0,9669) između kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a.

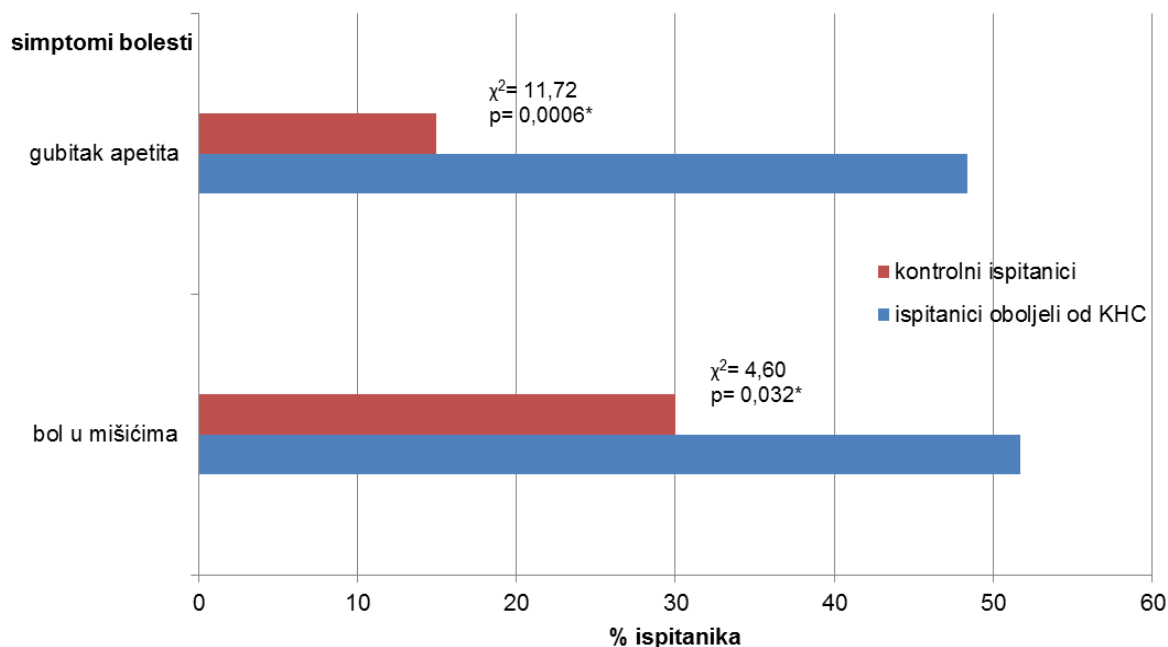
Slikom 4.1 prikazana je podjela ispitanika oboljelih od KHC-a prema spolu i dobnim skupinama.



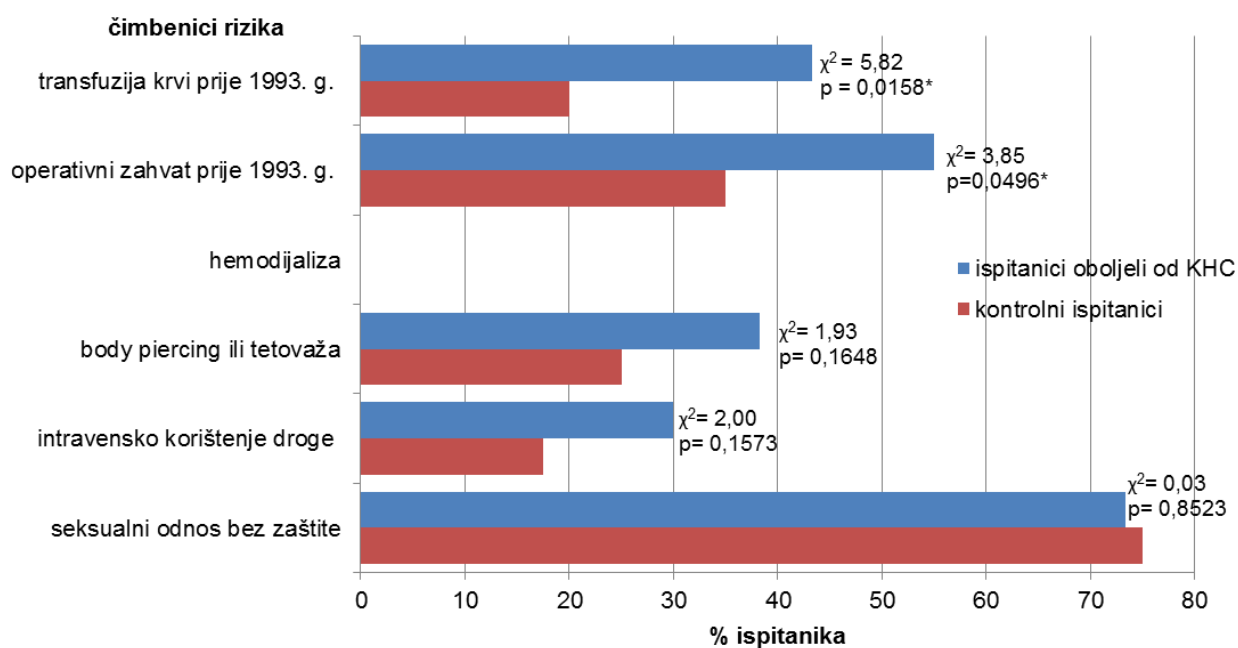
Slika 4.1. Raspodjela ispitanika oboljelih od KHC-a prema spolu i dobnim skupinama.

Nema značajne razlike u dobi između muških i ženskih ispitanika oboljelih od KHC-a ( $p > 0,05$ ). Najviše oboljelih muškaraca od KHC-a je u dobnj skupini od 31-40 godina, a najviše oboljelih žena je u dobnj skupini od 51-60 godina. Žene imaju veći postotak oboljelih od muškaraca u dobnj skupini od 21-30 godina i u dobnj skupini više od 61 godine. Najveća razlika po spolu kod oboljelih od KHC-a je u dobnj skupini od 41-50 godina.

Osnovne značajke 40 kontrolnih ispitanika i 60 ispitanika oboljelih od KHC-a prema podacima dobivenim iz informiranog pristanka prikazane su slikama 4.2 i 4.3.



Slika 4.2. Raspodjela kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema simptomima bolesti.



Slika 4.3. Raspodjela kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema čimbenicima rizika.

Statističkom usporednom analizom između oboljelih od KHC-a i kontrolnih ispitanika utvrđeno je da su oboljeli od KHC-a imali izraženije simptome bolesti kao što su bolovi u mišićima ( $p=0,032$ ) i gubitak apetita ( $p=0,0006$ ).

Statističkom usporednom analizom utvrđena je statistička značajnost za primljenu transfuziju krvi prije 1993. godine ( $p=0,0158$ ) između skupine oboljelih od KHC-a i kontrolne skupine ispitanika.

U odnosu na kontrolnu skupinu više je oboljelih od KHC-a imalo operativni zahvat prije 1993. godine ( $p=0,0496$ ).

Nitko od ispitanika uključenih u ovo istraživanje nije bio na hemodijalizi.

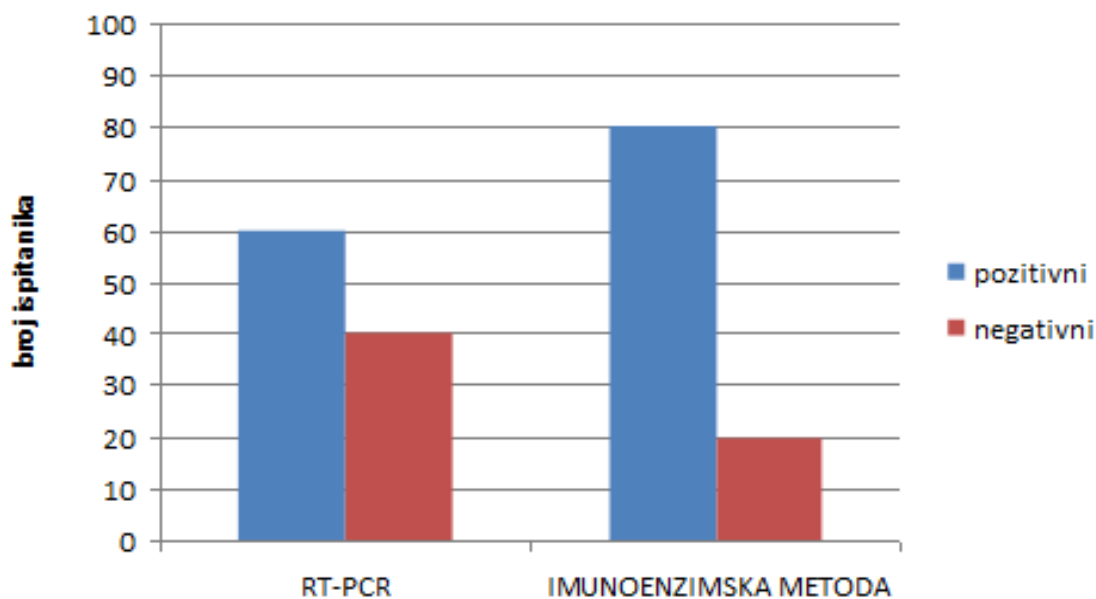
U odnosu na kontrolnu skupinu, u skupini oboljelih od KHC-a više ispitanika ima body piercing ili tetovažu, ali bez statističke značajnosti ( $p=0,1648$ ).

Statističkom usporednom analizom nije utvrđena statistička značajnost ( $p=0,1573$ ) kod intravenskog korištenja droge između kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a.

Nema značajne razlike u konzumiranju seksualnog odnosa bez zaštite između kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a ( $p=0,8523$ ).

## 4.2. Seroprevalencija HCV-infekcije i aktivna replikacija HCV-infekcije

Slika 4.4 prikazuje usporedbu kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu kojim se određuje aktivna replikacija virusa HCV-a i imunoenzimske metode kojom se dokazuje prisutnost specifičnih protutijela za HCV.



Slika 4.4. Usporedba kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu i imunoenzimske metode kod svih ispitanika uključenih u istraživanje.

Od ukupno 100 ispitanika uključenih u istraživanje 60 ispitanika ima aktivnu replikaciju virusa HCV-a što je potvrđeno kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu. Kod polovice kontrolnih ispitanika, odnosno onih koji nemaju aktivnu replikaciju virusa dokazana je prisutnost specifičnih protutijela za HCV imunoenzimskom metodom. Statistički je značajno više pozitivnih rezultata imunoenzimskom metodom ( $p=0,002$ ) u odnosu na RT-PCR metodu.

### 4.3. Prevalencija genotipova HCV-a

Raspodjela genotipova HCV-a prema spolu i dobnim skupinama prikazana je tablicom 4.2.

Tablica 4.2. Raspodjela ispitanika oboljelih od KHC-a prema genotipu virusa i dobnim skupinama

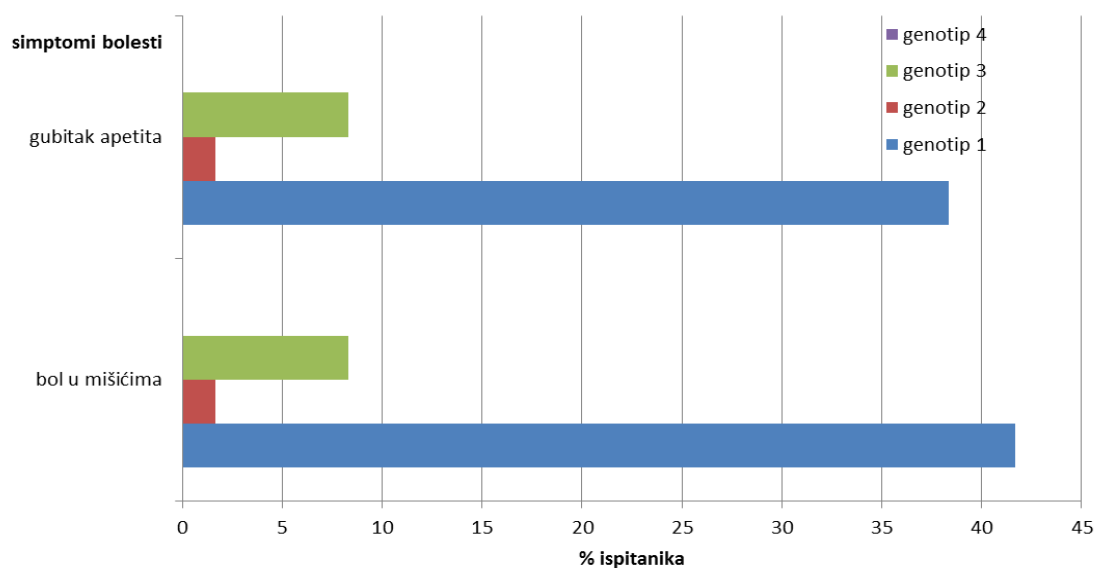
dobne skupine	spol	genotip			
		1	2	3	4
21-30	M	1	0	2	0
	Ž	5	0	1	0
31-40	M	7	0	2	2
	Ž	2	0	2	2
41-50	M	8	0	1	0
	Ž	2	0	1	0
51-60	M	10	0	0	0
	Ž	7	0	0	0
>61	M	2	0	0	0
	Ž	2	1	0	0
		n=46 47±12 (23-67)	n=1 medijan=61	n=9 34±8 (23-48)	n=4 34±2 (33-37)

M – muškarci, Ž – žene

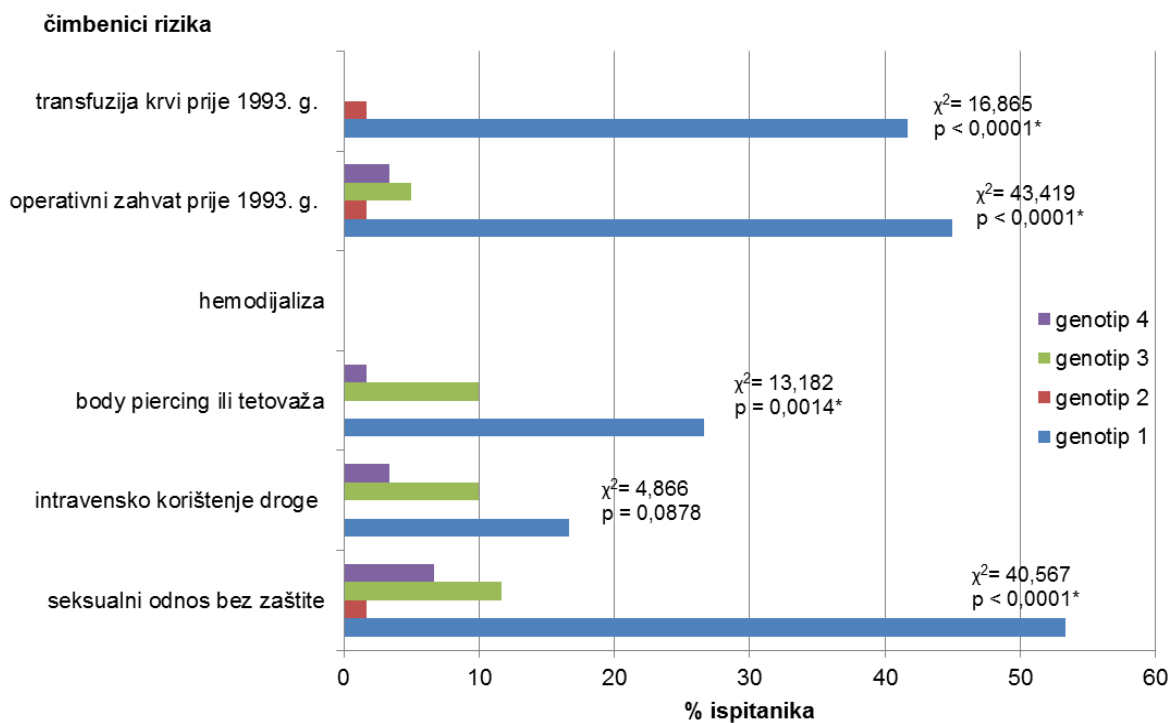
Genotip 1 najzastupljeniji je genotip virusa HCV-a kod oboljelih od KHC-a. Dokazan je u svim dobnim skupinama, a najčešći je u dobnoj skupini od 51-60 godina i kod muškaraca i kod žena. Genotip 2 dokazan je jedino u dobnoj skupini žena starijih od 61 godine. Genotip 3 dokazan je i kod muškaraca i kod žena mlađe životne dobi, a najzastupljeniji je u dobnoj skupini od 31-40 godina bez razlike u spolu. Genotip 4 dokazan je samo u skupini oboljelih od 31-40 godina bez razlike u spolu.



Osnovne značajke ispitanika oboljelih od KHC-a prema genotipu virusa HCV-a i podacima dobivenim iz informiranog pristanka prikazane su slikama 4.5 i 4.6.



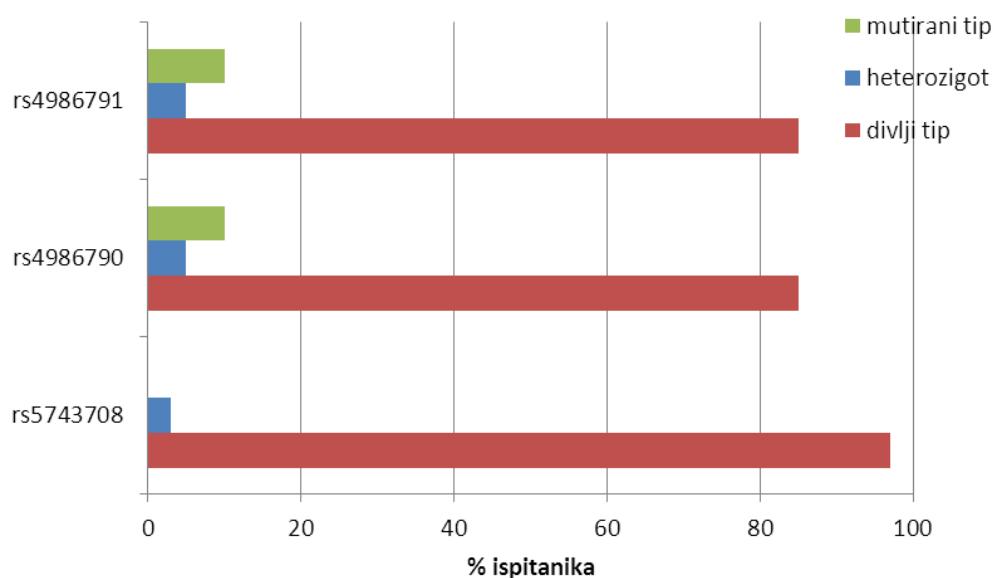
Slika 4.5. Raspodjela ispitanika oboljelih od KHC-a prema genotipu i simptomima bolesti.



Slika 4.6. Raspodjela ispitanika oboljelih od KHC-a prema genotipu i čimbenicima rizika.

#### 4.4. Polimorfizmi gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791

Dobivene genske varijante za polimorfizme gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791, odnosno homozigoti divljeg tipa, heterozigoti i mutirani homozigoti prikazani su slikom 4.7.



Slika 4.7. Raspodjela ukupnog broja ispitanika prema genskim varijantama za polimorfizme gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791.

Dobivene genske varijante za polimorfizme gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791, odnosno homozigoti divljeg tipa, heterozigoti i mutirani homozigoti prikazani su tablicom 4.3.

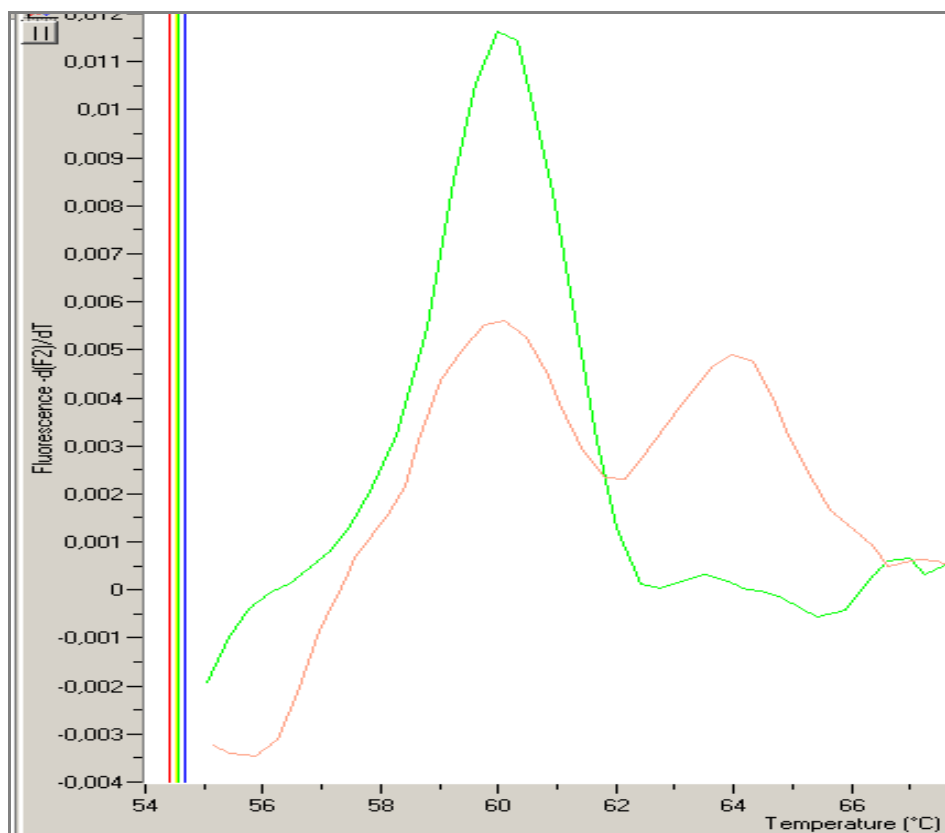
Tablica 4.3. Raspodjela ispitanika prema genskim varijantama za polimorfizme gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791

vrsta mutacije	vrsta ispitanika	rs5743708	%	rs4986790	%	rs4986791	%
<b>divlji tip</b>	oboljeli od KHC-a	59	98	53	88	53	88
	kontrolni ispitanici	38	95	32	80	32	80
<b>heterozigot</b>	oboljeli od KHC-a	1	2	3	5	3	5
	kontrolni ispitanici	2	5	2	5	2	5
<b>mutirani tip</b>	oboljeli od KHC-a	0	0	4	7	4	7
	kontrolni ispitanici	0	0	6	15	6	15

#### 4.4.1. Polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a

Polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 rezultira promjenom aa arginin u glutamin (Arg753Gln). Oznaka SNP-a rs5743708 na dužem kraku kromosoma 4 (4q32) prema Nacionalnom centru biotehnoških informacija (NCBI, engl. *National Center for Biotechnology Information*), tranzicije gvanina u adenin za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a određene su uporabom uređaja LightCycler (verzija 1.5). Dobiveni rezultati očitani su analizom krivulje T<sub>m</sub>, što je prikazano slikom 4.8. Raspodjela ukupnog broja ispitanika prema polimorfizmu gena *tlr2* rs5743708 dana je u tablici 4.4, dok je frekvencija alela dana u tablici 4.5. Raspodjela kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema genskim varijantama za navedeni polimorfizam prikazana je slikom 4.9. Genske varijante kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a podijeljenih po spolu prikazani su tablicom 4.6. Učestalost genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prikazana je tablicom 4.7. Učestalost simptoma bolesti prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 kod ispitanika oboljelih od KHC-a prikazana je tablicom 4.8, a kod kontrolnih ispitanika tablicom 4.9.

Učestalost čimbenika rizika prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 kod ispitanika oboljelih od KHC-a prikazana je tablicom 4.10, a kod kontrolnih ispitanika tablicom 4.11.



Slika 4.8. Tm krivulja za *tlr2* gen na PCR uređaju LightCycler.

Tablica 4.4. Raspodjela ukupnog broja ispitanika prema polimorfizmu gena *tlr2* rs5743708

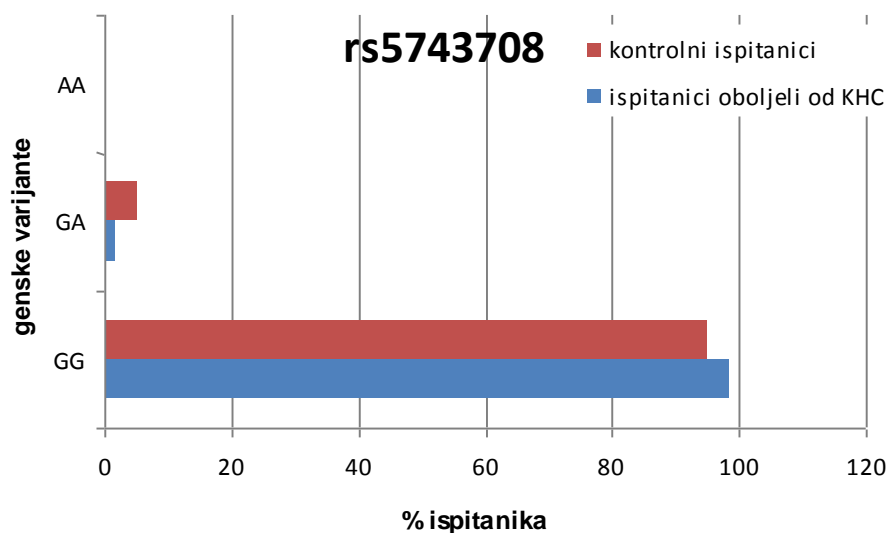
rs5743708	N
GG	97
GA	3
AA	0
Ukupno	100

GG – divlji tip, GA – heterozigot, AA – mutirani tip, N – ukupni broj ispitanika

Tablica 4.5. Frekvencija alela za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708

rs5743708	frekvencija alela
G	0,98*
A	0,02*

\* Hardy-Weinbergov ekvilibrij [p(KHC)=1; p(kontrola)=1]



Slika 4.9. Raspodjela kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708.

Tablica 4.6. Genske varijante kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a podijeljeni po spolu za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708

	ispitanici oboljeli od KHC-a		Fisher-Freeman-Halton test	kontrolni ispitanici		Fisher-Freeman-Halton test
	M	Ž	p	M	Ž	p
<b>GG</b>	56,6 %	41,7 %	1,0000	60 %	35 %	0,1539
<b>GA</b>	1,7 %	0 %		0 %	5 %	
<b>AA</b>	0 %	0 %		0 %	0 %	

GG – divlji tip, GA – heterozigot, AA – mutirani tip, M – muškarci, Ž – žene

Tablica 4.7. Učestalost genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a

rs5743708							
skupina ispitanika	genske varijante	OR	95 % CI	statistika		med calc	
				$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
oboljeli od KHC-a n=60	GG vs GA	59,00	7,9158-439,7516	41,71	<0,0001	76,099	<0,0001
	GG vs AA	119,00	7,1917-1969,084	44,37	<0,0001		
	GA vs AA	3,00	0,1198-75,1177	0,99	0,3193		
kontrolni ispitanici n=40	GG vs GA	19,00	4,2909-84,1316	23,74	<0,0001	45,910	<0,0001
	GG vs AA	77,00	4,5732-1296,4703	28,74	<0,0001		
	GA vs AA	5,00	0,2327-107,4404	1,95	0,1623		
oboljeli od KHC vs kontrolni ispitanici	GA vs GG	0,32	0,0282-3,6758	0,92	0,3384		
	AA vs GG	-	-	-	-		

Tablica 4.8. Učestalost simptoma bolesti prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 kod ispitanika oboljelih od KHC-a

rs5743708		oboljeli od KHC-a					statistika
simptomi bolesti		total	GG	%	GA	%	
bolovi u mišićima	da	31	31	51,66	0	0	$\chi^2=1,09$ p= 0,2971
	ne	29	28	46,67	1	1,67	
gubitak apetita	da	29	28	46,67	1	1,67	$\chi^2=1,09$ p= 0,2971
	ne	31	31	51,66	0	0	

Tablica 4.9. Učestalost simptoma bolesti prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 kod kontrolnih ispitanika

rs5743708		kontrolni ispitanici					statistika
simptomi bolesti		total	GG	%	GA	%	
bolovi u mišićima	da	12	11	27,5	1	2,5	$\chi^2=0,4$ p= 0,5266
	ne	28	27	67,5	1	2,5	
gubitak apetita	da	6	6	15	0	0	$\chi^2=0,37$ p= 0,5422
	ne	34	32	80	2	5	



Tablica 4.10. Učestalost čimbenika rizika prema genskim varijantama za polimorfizam gena *t1r2* rs5743708 kod ispitanika oboljelih od KHC-a

rs5743708		oboljeli od KHC-a					
čimbenici rizika		total	GG	%	GA	%	statistika
transfuzija krvi prije 1993. g.	da	26	26	43,33	0	0	$\chi^2=0,78$ p= 0,3779
	ne	34	33	55	1	1,67	
operativni zahvat prije 1993. g.	da	33	32	53,33	1	1,67	$\chi^2=0,83$ p= 0,3617
	ne	27	27	45	0	0	
hemodijaliza	da	0	0	0	0	0	-
	ne	60	59	98,33	1	1,67	-
body piercing ili tetovaža	da	23	23	38,33	0	0	$\chi^2=0,64$ p= 0,4266
	ne	37	36	60	1	1,67	
intravensko korištenje droge	da	18	18	30	0	0	$\chi^2=0,44$ p= 0,5091
	ne	42	41	68,33	1	1,67	
seksualni odnos bez zaštite	da	44	43	71,66	1	1,67	$\chi^2=0,37$ p= 0,5431
	ne	16	16	26,67	0	0	

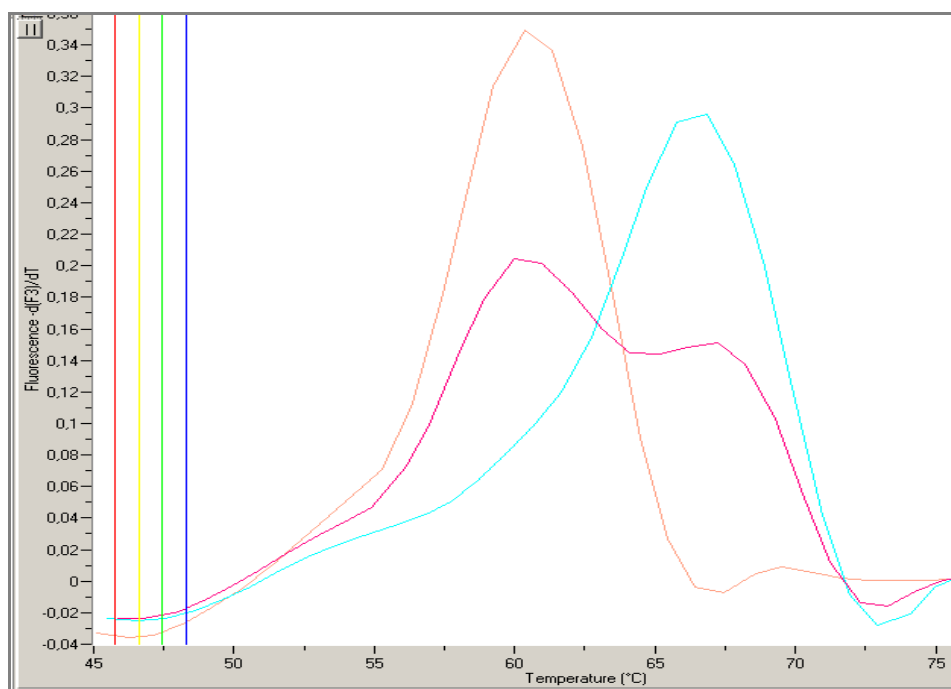
Tablica 4.11. Učestalost čimbenika rizika prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 kod kontrolnih ispitanika

rs5743708		kontrolni ispitanici					statistika
čimbenici rizika		total	GG	%	GA	%	
transfuzija krvi prije 1993. g.	da	8	8	20	0	0	$\chi^2=0,53$ $p= 0,4682$
	ne	32	30	75	2	5	
operativni zahvat prije 1993. g.	da	14	14	35	0	0	$\chi^2=1,13$ $p= 0,2870$
	ne	26	24	60	2	5	
hemodijaliza	da	0	0	0	0	0	-
	ne	40	38	95	2	5	
body piercing ili tetovaža	da	10	10	25	0	0	$\chi^2=0,7$ $p= 0,4022$
	ne	30	28	70	2	5	
intravensko korištenje droge	da	7	7	17,5	0	0	$\chi^2=0,45$ $p= 0,504$
	ne	33	31	77,5	2	5	
seksualni odnos bez zaštite	da	30	28	70	2	5	$\chi^2=0,7$ $p= 0,4022$
	ne	10	10	25	0	0	

#### 4.4.2. Polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a

Polimorfizam gena rezultira promjenom aa aspartat u glicin (Asp299Gly). Oznaka SNP-a rs4986790 na dužem kraku kromosoma 9 (9q33.1) prema NCBI, tranzicije adenina u gvanin za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a određene su uporabom uređaja LightCycler (verzija 1.5). Dobiveni rezultati očitani su analizom krivulje Tm, što je prikazano slikom 4.10. Raspodjela ukupnog broja ispitanika prema polimorfizmu gena *tlr4* rs4986790 dana je u tablici 4.12, dok je frekvencija alela dana u tablici 4.13. Raspodjela kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema genskim varijantama za navedeni polimorfizam prikazana je slikom 4.11. Genske varijante kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a podijeljenih po spolu

prikazani su tablicom 4.14. Učestalost genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prikazana je tablicom 4.15. Učestalost simptoma bolesti prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod ispitanika oboljelih od KHC-a prikazana je tablicom 4.16, a kod kontrolnih ispitanika tablicom 4.17. Učestalost čimbenika rizika prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod ispitanika oboljelih od KHC-a prikazana je tablicom 4.18, a kod kontrolnih ispitanika tablicom 4.19. Raspodjela mutiranih homozigota za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema simptomima bolesti prikazana je tablicom 4.20, dok je raspodjela prema čimbenicima rizika prikazana tablicom 4.21.



Slika 4.10. Tm krivulja za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 na PCR uređaju LightCycler.

Tablica 4.12. Raspodjela ukupnog broja ispitanika prema polimorfizmu gena *tlr4* rs4986790

rs4986790	N
AA	85
AG	5
GG	10
Ukupno	100

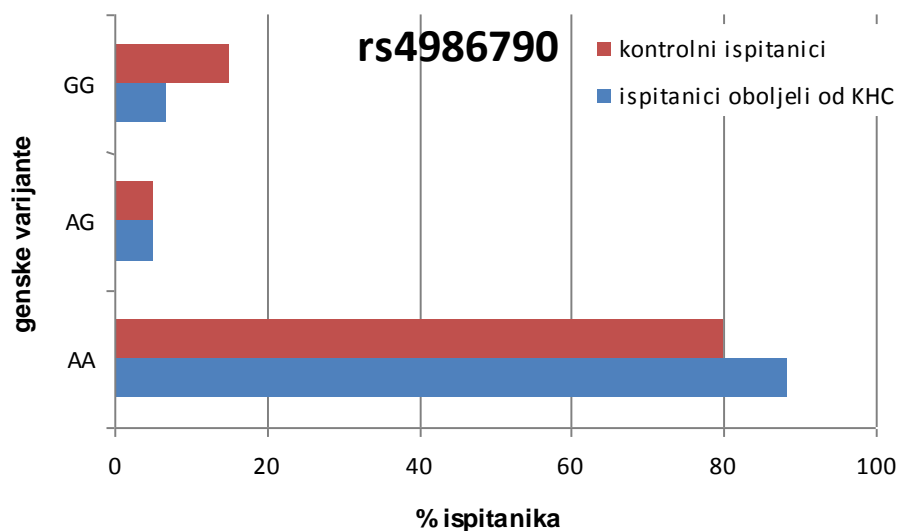
Hardy-Weinbergov ekvilibrij ( $p < 10^{-8}$ )

AA – divlji tip, AG – heterozigot, GG – mutirani tip, N – ukupni broj ispitanika

Tablica 4.13. Frekvencija alela za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790

rs4986790	frekvencija alela
A	0,88*
G	0,12*

\*  $\chi^2$  test [p(KHC)=0,011; p(kontrolne)=0,0006]



Slika 4.11. Raspodjela kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790.

Tablica 4.14. Genske varijante kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a podijeljenih po spolu za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790

	ispitanici oboljeli od KHC-a		Fisher-Freeman-Halton test	kontrolni ispitanici		Fisher-Freeman-Halton test
	M	Ž	p	M	Ž	p
<b>AA</b>	50 %	38 %	0,1810	42,5 %	37,5 %	0,3159
<b>AG</b>	2 %	3 %		5 %	0 %	
<b>GG</b>	7 %*	0 %		12,5 %	2,5 %	

AA – divlji tip, AG – heterozigot, GG – mutirani tip, M – muškarci, Ž – žene

\* Genska varijanta TT za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 dokazana je jedino kod muških ispitanika oboljelih od KHC-a.

Tablica 4.15. Učestalost genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a

rs4986790							
skupina ispitanika	genske varijante	OR	95 % CI	statistika		med calc	
				$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
oboljeli od KHC-a n=60	AA vs GA	17,66	5,2314-59,6606	33,11	<0,0001	54,673	<0,0001
	AA vs GG	13,25	4,5111-38,9183	30,93	<0,0001		
	GA vs GG	0,75	0,1609-3,4955	0,13	0,7133		
kontrolni ispitanici n=40	AA vs GA	16,00	3,5905-71,2994	19,96	<0,0001	27,200	<0,0001
	AA vs GG	5,33	2,0099-14,1524	12,68	0,0004		
	GA vs GG	0,33	0,0634-1,7518	1,82	0,1771		
oboljeli od KHC vs kontrolni ispitanici	GA vs AA	0,91	0,1435-5,7153	0,01	0,9160	1,863	0,3940
	GG vs AA	0,40	0,1055-1,5358	1,86	0,1723		
	GA vs GG	2,25	0,2515-20,1313	0,54	0,4642		

Tablica 4.16. Učestalost simptoma bolesti prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod ispitanika oboljelih od KHC-a

simptomi bolesti		oboljeli od KHC-a							statistika
		total	AA	%	AG	%	GG	%	
bolovi u mišićima	da	31	27	45	2	3,33	2	3,33	$\chi^2=0,286$ p= 0,8668
	ne	29	26	43,34	1	1,67	2	3,33	
gubitak apetita	da	29	23	38,33	2	3,33	4	6,67	$\chi^2=5,197$ p= 0,0744
	ne	31	30	50	1	1,67	0	0	

Tablica 4.17. Učestalost simptoma bolesti prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod kontrolnih ispitanika

simptomi bolesti		kontrolni ispitanici							statistika
		total	AA	%	AG	%	GG	%	
bolovi u mišićima	da	12	11	27,5	0	0	1	2,5	$\chi^2=1,657$ p= 0,4368
	ne	28	21	52,5	2	5	5	12,5	
gubitak apetita	da	6	5	12,5	0	0	1	2,5	$\chi^2=0,376$ p= 0,8287
	ne	34	27	67,5	2	5	5	12,5	

Tablica 4.18. Učestalost čimbenika rizika prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod ispitanika oboljelih od KHC-a

čimbenici rizika		oboljeli od KHC-a							statistika
		total	AA	%	AG	%	GG	%	
transfuzija krvi prije 1993. g	da	26	22	36,67	2	3,33	2	3,33	$\chi^2=0,809$ p= 0,6672
	ne	34	31	51,67	1	1,67	2	3,33	
operativni zahvat prije 1993. g	da	33	29	48,34	2	3,33	2	3,33	$\chi^2=0,207$ p= 0,9016
	ne	27	24	40	1	1,67	2	3,33	
hemodijaliza	da	0	0	0	0	0	0	0	-
	ne	60	53	88,33	3	5	4	6,67	
body piercing ili tetovaža	da	23	19	31,67	1	1,67	3	5	$\chi^2=2,445$ p= 0,2945
	ne	37	34	56,66	2	3,33	1	1,67	
intravensko korištenje droge	da	18	14	23,33	1	1,67	3	5	$\chi^2=4,197$ p= 0,1226
	ne	42	39	65	2	3,33	1	1,67	
seksualni odnos bez zaštite	da	44	38	63,33	3	5	3	5	$\chi^2=1,169$ p= 0,138
	ne	16	15	25	0	0	1	1,67	

Tablica 4.19. Učestalost čimbenika rizika prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod kontrolnih ispitanika

čimbenici rizika		kontrolni ispitanici							statistika
		total	AA	%	AG	%	GG	%	
transfuzija krvi prije 1993. g.	da	8	6	15	1	2,5	1	2,5	$\chi^2=1,198$ p= 0,5494
	ne	32	26	65	1	2,5	5	12,5	
operativni zahvat prije 1993. g.	da	14	12	30	1	2,5	1	2,5	$\chi^2=1,172$ p= 0,5565
	ne	26	20	50	1	2,5	5	12,5	
hemodijaliza	da	0	0	0	0	0	0	0	-
	ne	40	32	80	2	5	6	15	
body piercing ili tetovaža	da	10	8	20	1	2,5	1	2,5	$\chi^2=0,889$ p= 0,6412
	ne	30	24	60	1	2,5	5	12,5	
intravensko korištenje droge	da	7	6	15	1	2,5	0	0	$\chi^2=2,711$ p= 0,2503
	ne	33	26	65	1	2,5	6	15	
seksualni odnos bez zaštite	da	30	25	62,5	1	2,5	4	10	$\chi^2=1,056$ p= 0,5899
	ne	10	7	17,5	1	2,5	2	5	

Tablica 4.20. Raspodjela mutiranih homozigota za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema simptomima bolesti

	ispitanici oboljeli od KHC-a	kontrolni ispitanici
bol u mišićima (%)	3,3	2,5
gubitak apetita (%)	6,7	2,5



Tablica 4.21. Raspodjela mutiranih homozigota za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema čimbenicima rizika

	ispitanici oboljeli od KHC-a	kontrolni ispitanici
transfuzija krvi prije 1993.g. (%)	3,3	2,5
operativni zahvat prije 1993.g. (%)	3,3	2,5
hemodijaliza (%)	0	0
body piercing ili tetovaža (%)	5	2,5
intravensko korištenje droge (%)	5	0
seksualni odnos bez zaštite (%)	6,7	15

#### 4.4.3. Polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a

Polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 rezultira promjenom aa treonin u izoleucin (Thr399Ile). Oznaka SNP-a rs4986791 na dužem kraku kromosoma 9 (9q33.1) prema NCBI, tranzicije citozina u timin za kontrolne ispitanike i ispitanike oboljele od KHC-a određene su uporabom uređaja LightCycler (verzija 1.5) metodom multipleks real-time PCR. Dobiveni rezultati očitani su analizom krivulje Tm kao i za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790, ali na različitom fluorescencijskom kanalu (slika 4.10). Raspodjela ukupnog broja ispitanika prema polimorfizmu gena *tlr4* rs4986791 dana je u tablici 4.22, dok je frekvencija alela dana u tablici 4.23. Raspodjela kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema genskim varijantama za navedeni polimorfizam prikazana je slikom 4.12. Genske varijante kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a podijeljenih po spolu prikazani su tablicom 4.24. Učestalost genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prikazana je tablicom 4.25.

Učestalost simptoma bolesti i čimbenika rizika prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 kod ispitanika oboljelih od KHC-a i kod kontrolnih ispitanika ista je kao i za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790, jer se ta dva polimorfizma *tlr4* gena nalaze u neravnoteži alelne povezanosti ( $|D'|=1$ ,  $r^2=1$ ).

Tablica 4.22. Raspodjela ukupnog broja ispitanika prema polimorfizmu gena *tlr4* rs4986791

rs4986791	N
CC	85
CT	5
TT	10
Ukupno	100

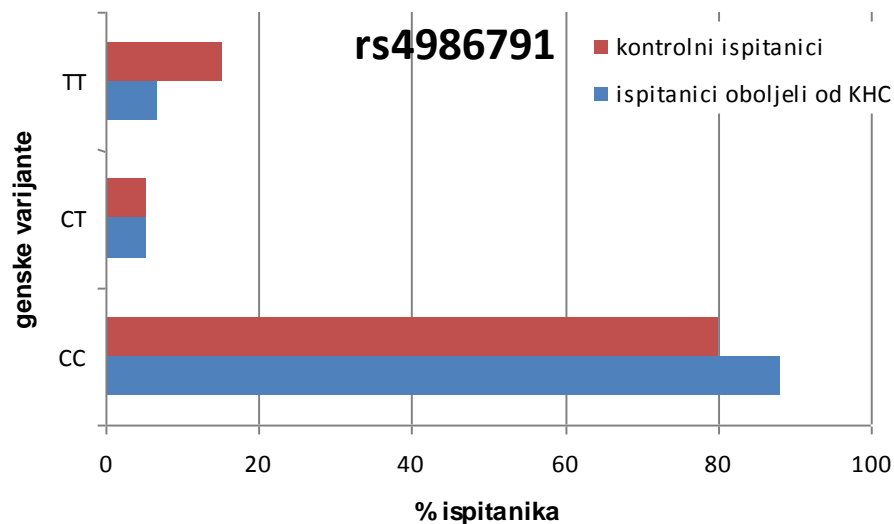
Hardy-Weinbergov ekvilibrij ( $p < 10^{-8}$ )

CC – divlji tip, CT – heterozigot, TT – mutirani tip, N – ukupni broj ispitanika

Tablica 4.23. Frekvencija alela za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791

rs4986791	frekvencija alela
C	0,88*
T	0,12*

\*  $\chi^2$  test [p(KHC)=0,011; p(kontrola)=0,0006]



Slika 4.12. Raspodjela kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791.

Tablica 4.24. Genotipovi kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a podijeljenih po spolu za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791

	ispitanici oboljeli od KHC-a		Fisher-Freeman-Halton test	kontrolni ispitanici		Fisher-Freeman-Halton test
	M	Ž	p	M	Ž	p
<b>CC</b>	50 %	38 %	0,1810	42,5 %	37,5 %	0,3159
<b>CT</b>	2 %	3 %		5 %	0 %	
<b>TT</b>	7 % *	0 %		12,5 %	2,5 %	

CC – divlji tip, CT – heterozigot, TT – mutirani tip, M – muškarci, Ž – žene

\* Genska varijanta TT za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 dokazana je jedino kod muških ispitanika oboljelih od KHC-a.

Tablica 4.25. Učestalost genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a

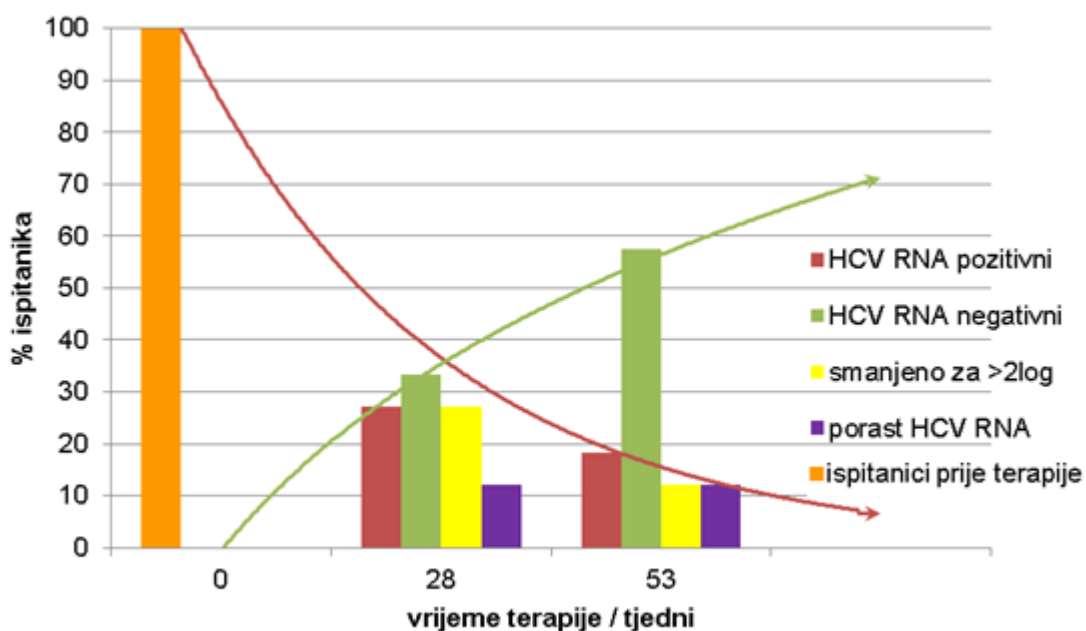
rs4986791							
skupina ispitanika	genske varijante	OR	95 % CI	statistika		med calc	
				$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
oboljeli od KHC-a n=60	CC vs CT	17,66	5,2314-59,6606	33,11	<0,0001	54,673	<0,0001
	CC vs TT	13,25	4,5111-38,9183	30,93	<0,0001		
	CT vs TT	0,75	0,1609-3,4955	0,13	0,7133		
kontrolni ispitanici n=40	CC vs CT	16,00	3,5905-71,2994	19,96	<0,0001	27,200	<0,0001
	CC vs TT	5,33	2,0099-14,1524	12,68	0,0004		
	CT vs TT	0,33	0,0634-1,7518	1,82	0,1771		
oboljeli od KHC vs kontrolni ispitanici	CT vs CC	0,91	0,1435-5,7153	0,01	0,9160	1,863	0,3940
	TT vs CC	0,40	0,1055-1,5358	1,86	0,1723		
	CT vs TT	2,25	0,2515-20,1313	0,54	0,4642		

#### 4.5. Antivirusna terapije kod oboljelih od KHC-a

Ispitanici oboljeli od KHC-a podijeljeni su u dvije skupine. U skupini koja ne prima terapiju je 27 ispitanika (45 %), a u skupini koja prima terapiju prema postojećim terapijskim protokolima ovisno o genotipu su 33 ispitanika (55 %). Nema statistički značajne razlike u primjeni antivirusne terapije između muških i ženskih ispitanika oboljelih od KHC-a ( $p > 0,05$ ).

Od 33 ispitanika koja su liječena prema terapijskom protokolu nakon 28 tjedana napravljena je kontrola terapije. Kod 34 % liječenih postignut je virološki odgovor, odnosno HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi, a kod 27 % liječenih broj virusnih kopija smanjen je za više od 2 logaritma. Kod istog broja ispitanika (27 %) nije došlo do promjene u broju virusnih kopija, dok je kod 12 % liječenih došlo do porasta broja kopija u plazmi. Kontrola terapije nakon 53 tjedna od početka primjene terapije

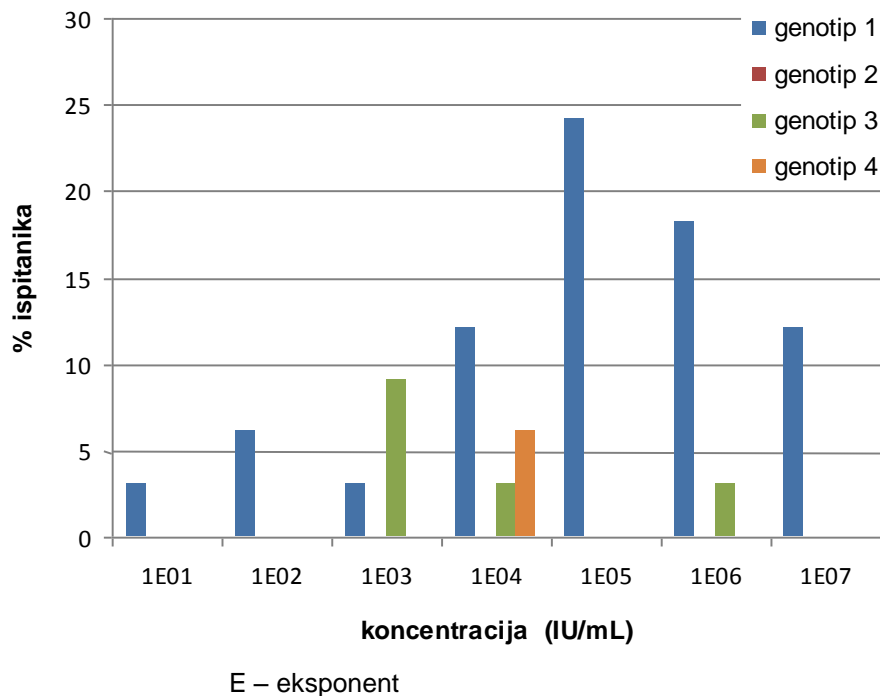
pokazuje da je kod 58 % liječenih postignut virološki odgovor, odnosno HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi. Kod 12 % liječenih broj virusnih kopija smanjen je za više od 2 logaritma, dok je 18 % liječenih ispitanika i dalje imalo isti broj virusnih kopija. Kod 12 % ispitanika koji su primali terapiju nije bilo nikakvog terapijskog učinka, nego je došlo do porasta broja kopija u plazmi isto kao i nakon kontrole provedene terapije u 28 tjednu (slika 4.13).



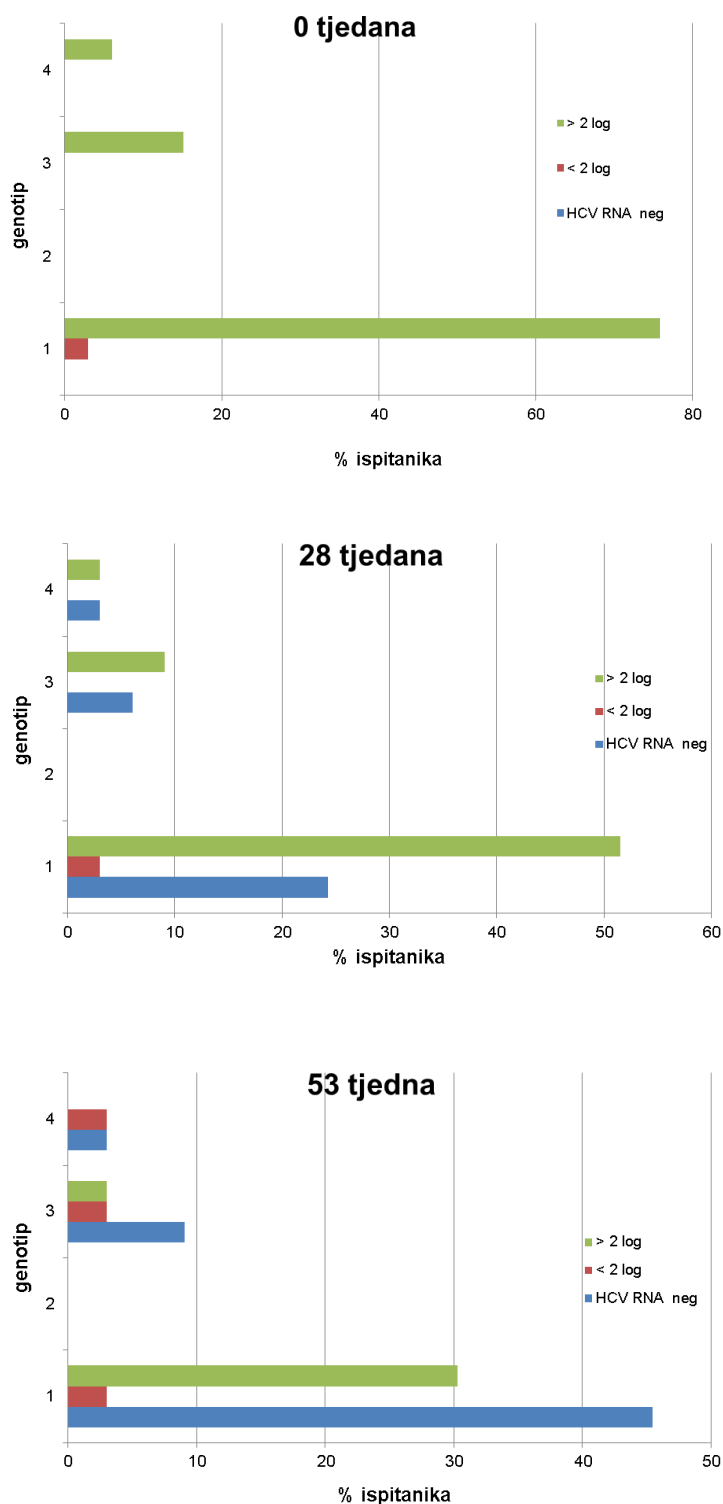
Slika 4.13. Raspodjela liječenih ispitanika prema odgovoru na antivirusnu terapiju nakon kontrole terapije u 28. i 53. tjednu.

#### 4.5.1. Usporedba genotipova HCV-a prema terapijskom odgovoru

Na temelju saznanja da se trajanje liječenja oboljelih od HCV-a određuje prema genotipu HCV-a usporedili smo genotipove HCV-a i odgovor na antivirusnu terapiju. Raspodjela ispitanika iz skupine 2 prema genotipu i broju virusnih kopija prije početka terapije prikazana je slikom 4.14. Slikom 4.15 prikazan je odgovor na antivirusnu terapiju u usporedbi s genotipom HCV-a u 28. i 53. tjednu kontrole terapije, te stanje prije početka primjene terapije.



Slika 4.14. Podjela liječenih ispitanika prema genotipu HCV-a i broju virusnih kopija prije početka liječenja.



Slika 4.15. Raspodjela liječenih ispitanika prema genotipu HCV-a i virološkom odgovoru prije početka liječenja, u 28. i 53. tjednu kontrole terapije.

Prije početka liječenja kod 75,7 % ispitanika s genotipom 1 detektirano je više od 2 logaritma virusnih kopija u plazmi, dok je samo jedan ispitanik s genotipom 1 imao manje od 2 logaritma. Kod svih ispitanika s genotipom 3 i 4 detektirano je više od 2 logaritma virusnih kopija u plazmi. U 28. tjednu kontrole provedene terapije HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi kod 24 % ispitanika s genotipom 1, kod 6 % ispitanika s genotipom 3 i kod polovice ispitanika s genotipom 4. U 53. tjednu kontrole provedene terapije HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi kod 45 % ispitanika s genotipom 1, kod 9 % ispitanika s genotipom 3 i kod polovice ispitanika s genotipom 4. U 53. tjednu kontrole provedene terapije detektirano je manje od 2 logaritma virusnih kopija kod 3 % liječenih ispitanika s genotipom 1, kod 3 % ispitanika s genotipom 3 i kod 3 % ispitanika s genotipom 4. Kod 30 % ispitanika s genotipom 1 i kod 9 % ispitanika s genotipom 3 nakon primjenjene terapije u 53. tjednu kontrole provedene terapije nije postignuto smanjenje broja kopija ispod 2 logaritma (slika 4.15).

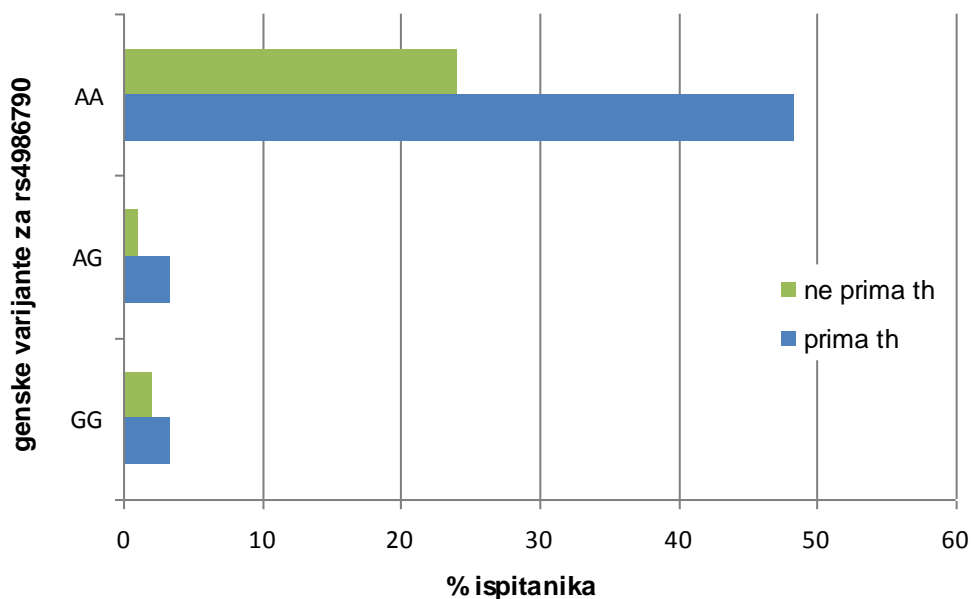


#### 4.5.2. Usporedba genskih varijanti za polimorfizme gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791 prema terapijskom odgovoru

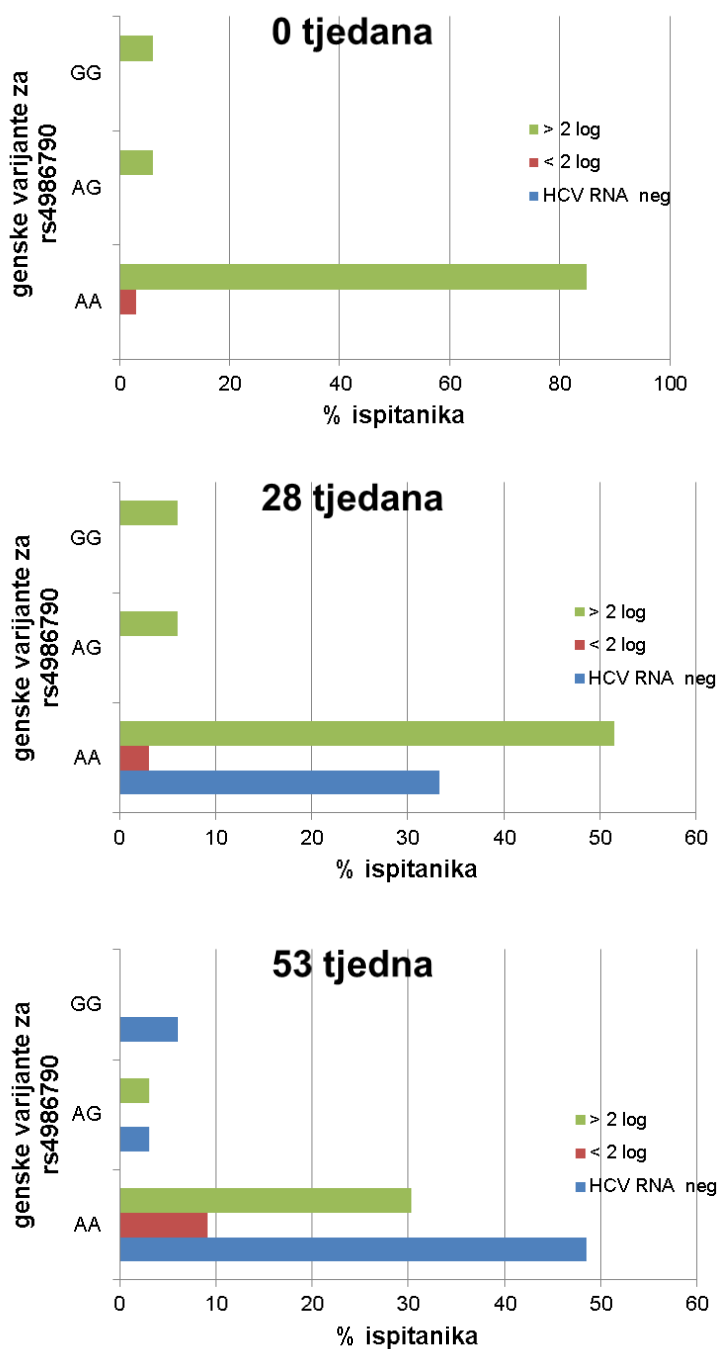
S obzirom na to da još uvijek ne postoji apsolutno učinkovito liječenje za sve bolesnike s KHC-om pokušali smo utvrditi koje genske varijante za polimorfizme gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791 utječu na ETR, a posebno na SVR.

Od svih ispitanika koji su liječeni prema terapijskom protokolu samo je jedan ispitanik imao gensku varijantu GA za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708. Navedenom je ispitaniku prije početka liječenja detektirano više od 2 logaritma virusnih kopija u plazmi. U 28. tjednu kontrole terapije HCV RNA mu nije bila mjerljiva u plazmi kao ni u 53. tjednu kontrole terapije, što znači da je postignut ETR.

Slikom 4.16 prikazana je podjela ispitanika oboljelih od KHC-a koji ne primaju terapiju i onih koji primaju terapiju prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790.



Slika 4.16. Podjela ispitanika oboljelih od KHC-a prema primjeni antivirusne terapije i genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790.



Slika 4.17. Podjela ispitanika koji primaju terapiju prema genskim varijantama za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 i broju virusnih kopija prije početka liječenja, u 28. i 53. tjednu kontrole terapije.

Prije početka liječenja ispitanicima za sve tri genske varijante polimorfizma rs4986790 detektirano je više od 2 logaritma virusnih kopija u plazmi, osim kod jednog ispitanika koji je homozigot divljeg tipa (AA) za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790. Kod njega je detektirano manje od 2 logaritma virusnih kopija u plazmi. U 28. tjednu kontrole terapije kod 33 % ispitanika koji su homozigoti divljeg tipa za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi, dok je kod 3 % ispitanika broj virusnih kopija primjenom terapije smanjen na manje od 2 logaritma. Kod ispitanika s genskom varijantom AG (heterozigoti) i GG (mutirani homozigoti) nije došlo do smanjenja broja virusnih kopija ispod 2 logaritma u 28. tjednu kontrole terapije. Kontrolom terapije u 53. tjednu od početka primjene terapije kod 48 % ispitanika koji su homozigoti divljeg tipa za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi, dok je kod 9 % ispitanika broj virusnih kopija smanjen na manje od 2 logaritma. Kod pola ispitanika s genskom varijantom AG, HCV RNA nije bila mjerljiva u 53. tjednu kontrole terapije, dok kod druge polovice ispitanika s tom genskom varijantom nije postignuto smanjenje broja virusnih kopija ispod 2 logaritma. Svim ispitanicima koji su mutirani homozigoti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 HCV RNA nije bila mjerljiva u 53. tjednu kontrole terapije (slika 4.17).

Sve navedeno za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 vrijedi i za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791, jer se ta dva polimorfizma nalaze u neravnoteži vezanosti gena, odnosno lokusi su ovisni jedan o drugome u nasljeđivanju.

## 5. RASPRAVA

Infekcija HCV-om vodeći je javnozdravstveni problem diljem svijeta. Najveći problem infekcije HCV-om je razvoj kroničnih oblika bolesti koji traje desetljećima i pojavljuje se u oko 85 % inficiranih osoba. U visokom postotku oboljelih osoba, KHC dovodi do razvoja ozbiljnih komplikacija kao što su ciroza jetre i HCC. Procjenjuje se da je približno 3 % svjetskog stanovništva inficirano HCV-om. Većina podataka o prevalenciji dobivena je istraživanjima koja su provedena serološkim testiranjima uzoraka krvi dobrovoljnih davatelja u kojih je dokazivano prisustvo anti-HCV-protutijela. S obzirom na činjenicu da su davatelji krvi strogo odabrana skupina, vrlo je vjerojatno da je stvarna prevalencija HCV-infekcije viša<sup>13, 120</sup>. Prevalencija HCV-a različita je u pojedinim područjima svijeta. U Hrvatskoj ima oko 1 % osoba pozitivnih na HCV u općoj populaciji te stoga Hrvatska spada u zemlju niske prevalencije kao SAD i sjeverna i zapadna Europa<sup>80, 114, 168</sup>. U zemlje niske prevalencije HCV-a spadaju i Njemačka (0,6 %) <sup>167</sup>, Mađarska (0,73 %) <sup>212</sup>, Kanada (0,8 %) <sup>251</sup>, Belgija (0,87 %), Indija (0,9 %) <sup>47</sup>, Francuska (1,3 %) <sup>53, 212</sup> te Australija (1,1 %) <sup>122</sup>. Hrvatska ima nižu prevalenciju HCV-a od Mađarske i Makedonije, ali višu od Austrije i Slovenije<sup>80</sup>. Uz geografske razlike postoje i dobno specifične razlike u prevalenciji HCV-a. U Italiji i Španjolskoj prevalencija se HCV-a povećava s dobi, pa je najveći broj zaraženih u dobi iznad 50 godina<sup>12, 38, 56, 191</sup>, isto kao i u Turskoj, Japanu<sup>12</sup> i Kini<sup>96, 250</sup>. U SAD-u najviša prevalencija HCV-a zabilježena je u dobnim skupinama od 30-49 godina<sup>12, 16</sup>. U dobnoj skupini od 20-40 godina najviša je prevalencija HCV-a u sjevernoj i zapadnoj Europi i u Australiji<sup>57, 76</sup>. Prevalencija HCV-a razlikuje se i po spolu. U navedenim istraživanjima nađena je viša prevalencija u muškaraca u odnosu na žene, osim u Egiptu, delti Nila i pokrajini Linxian u Kini<sup>82, 152, 250</sup>. Busek i suradnici te Bezerra i suradnici su u svojim istraživanjima provedenim u Brazilu dokazali da je prevalencija HCV-a viša u muškaraca starijim od 39 godina, dok Albuquerque i suradnici nisu pronašli značajnu poveznicu između spola i oboljenja od HCV-a<sup>9, 27, 37</sup>. U našem istraživanju bilo je više muškaraca nego žena, no razlika nije bila statistički značajna (p=0,9669). Najviša prevalencija oboljelih muškaraca od KHC-a bila je u dobnoj skupini od 31-40 godina, a žena u dobnoj skupini od 51-60 godina. Prema

podacima iz literature zaključujemo da Osječko-baranjska županija ima istu prevalenciju HCV-a po dobnim skupinama kao i grad Zagreb i Zagrebačka županija<sup>232</sup>. Razlikujemo se od Istarske, Primorsko-goranske i Splitsko-dalmatinske županije gdje je najveća prevalencija u dobnj skupini od 21-30 godina<sup>116, 184, 224</sup>.

Analiziranjem podataka dobivenih iz informiranog pristanka uočene su bitne razlike između kontrolne skupine i skupine ispitanika. Premda je poznato da je infekcija HCV-om najčešće asimptomatska ili su prisutni tek blagi simptomi bolesti, mi smo utvrdili da su oboljeli od KHC-a imali izraženije simptome bolesti kao što su bolovi u mišićima ( $p=0,032$ ) i gubitak apetita ( $p=0,0006$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Virus HCV-a najčešće se prenosi krvlju inficiranih osoba (transfuzija krvi ili krvnih pripravaka) i drugim parenteralnim načinima (hemodijaliza, intravensko korištenje droge i tetoviranje)<sup>108</sup>. Danas je rizik prijenosa infekcije transfuzijom krvi i krvnim pripravcima gotovo zanemariv, ali osobe koje su primile transfuziju krvi prije 1993. godine predstavljaju mogući rezervoar zaraze. Usporedbom skupine oboljelih od KHC-a i kontrolne skupine ispitanika utvrđena je statistička značajnost za primljenu transfuziju krvi prije 1993. godine ( $p=0,0158$ ) i obavljeni operativni zahvat prije 1993. godine ( $p=0,0496$ ). Bezerra i suradnici u svom istraživanju nisu pronašli razliku između oboljelih od HCV-a koji su primili transfuziju krvi prije 1993. godine i poslije 1993. godine<sup>27</sup>. Nasuprot tome Bdour i Carneiro su u svojim istraživanjima pronašli značajnu razliku kod oboljelih od HCV-a koji su primili transfuziju krvi prije 1993. godine i poslije 1993. godine<sup>23, 40</sup>. Najučestaliji prijenos infekcije danas je intravensko uzimanje droga. U literaturi se navodi da je više od 57 % novoregistriranih bolesnika s KHC-om intravenski uzimalo drogu<sup>239</sup>. U ovom istraživanju drogu je intravenski uzimalo 30 % oboljelih od KHC-a. Dore i Shepard su sa svojim suradnicima u odvojenim istraživanjima dokazali da je intravensko uzimanje droge trenutno najučestaliji prijenos infekcije HCV-a, osobito među oboljelima mlađe životne dobi<sup>58, 203</sup>. HCV se može u ljudski organizam unijeti i pri hemodijalizi. Premda nitko od ispitanika uključenih u ovo istraživanje nije bio na hemodijalizi, u rizičnu skupinu spadaju i ti bolesnici, što su i dokazali Moreira, Tokars, Pujol i Allander u svojim istraživanjima<sup>11, 149, 175, 226</sup>. Procjenjuje se da je velik broj osoba zaražen i korištenjem inficiranog pribora prilikom tetovaža ili body piercinga<sup>121, 136, 188</sup>. U odnosu na

kontrolnu skupinu, u skupini oboljelih od KHC-a više ispitanika ima body piercing ili tetovažu, ali bez statističke značajnosti ( $p=0,1648$ ). Infekciji HCV-om izložene su i osobe koje konzumiraju seksualni odnos bez zaštite, iako između kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a u ovom istraživanju rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku ( $p=0,8523$ ). Neki su autori dokazali u svojim studijama da je prevalencija HCV-a viša u partnera osoba pozitivnih na HCV<sup>107, 119, 227</sup>, dok drugi autori nisu našli višu prevalenciju HCV-a u osoba koje su u vezi s osobom pozitivnom na HCV<sup>222, 231</sup>. Učestalost HCV-infekcije viša je kod osoba rizičnog spolnog ponašanja<sup>189, 241</sup>.

Prisutnost protutijela u krvi ukazuje na izloženost HCV-infekciji. Ako je ispitanik anti-HCV-pozitivan to znači da je tijekom svog života bio u kontaktu s ovim virusom. Inficirana osoba može zauvijek eliminirati virus iz svog organizma, no protutijela mogu doživotno ostati prisutna. Na osnovi se imunoenzimskog testa ne može procijeniti radi li se o preboljenoj infekciji HCV-a ili o KHC-u, jer je to test probira za dokazivanje HCV-infekcije. Za potvrdu HCV-aktivne infekcije koristi se molekularna metoda dokazivanja HCV RNA. Kod 60 ispitanika dokazana je aktivna replikacija virusa, dok je kod polovice kontrolnih ispitanika dokazana prisutnost specifičnih protutijela za HCV. To upućuje na to da su i ispitanici u kontrolnoj skupini bili u kontaktu s HCV-om tijekom svog života, ali nisu razvili bolest ( $p=0,0020$ ).

Prema genotipu virusa u skupini oboljelih ispitanika prevladavaju genotipovi 1 i 3 što odgovara razdiobi genotipova u Hrvatskoj i u Europi. Genotip 1 najčešći je u dobnoj skupini od 51-60 godina, što se razlikuje od dosadašnjih istraživanja u Hrvatskoj gdje je medijan dobi za oboljele od KHC-a s genotipom 1 iznosio 42 godine<sup>95, 232</sup>. Simptomi bolesti bili su izrazito prisutni kod oboljelih od KHC-a kojima je dokazan genotip 1. Bolove u mišićima imalo je 41,6 %, a gubitak apetita 38,3 % navedenih ispitanika. Gubitak apetita i bolovi u mišićima bili su prisutni u 8,3 % ispitanika kojima je dokazan genotip 3 i kod 1,6 % ispitanika s genotipom 2. Ispitanici oboljeli od KHC-a kojima je dokazan genotip 4 nisu imali izražene simptome bolesti.

Najčešći put prijenosa HCV-a kod oboljelih kojima je dokazan genotip 1 je intravensko korištenje droge i transfuzija krvi<sup>235</sup>. U skupini ispitanika oboljelih od KHC-a kojima je dokazan genotip 1 njih 41,6 % je primilo transfuziju krvi prije 1993.

godine, 45 % je imalo operativni zahvat prije 1993. godine, 26,6 % ispitanika ima body piercing ili tetovažu na tijelu, a njih 16,6 % je intravenski koristilo drogu. Drugi po učestalosti je genotip 3 koji je najviše zastupljen u ispitanika starosne dobi od 31-40 godina. Intravenski je koristilo drogu 10 % ispitanika s genotipom 3. Najčešći je u skupini narkomana mlađe životne dobi koji intravenski konzumiraju drogu<sup>15, 28, 205</sup>. To objašnjava visoku prevalenciju genotipa 3 u mnogim državama Sjeverne i Južne Amerike i u Europi. U Hrvatskoj je najveća prevalencija genotipa 3 u Splitsko-dalmatinskoj županiji<sup>232</sup>, što je povezano s velikim brojem narkomana i visokim brojem stranih posjetitelja u toj županiji. Prevalencija genotipa 2 je niska, a dokazan je samo kod žena starijih od 61 godine (medijan=61). Roman i suradnici su također u svom istraživanju dokazali da je genotip 2 zastupljeniji u žena starijih od 40 godina<sup>187</sup>. Prema drugim istraživanjima provedenim u Hrvatskoj medijan dobi za oboljele od KHC-a s genotipom 2 iznosio je 33 godine<sup>95, 232</sup>. Genotip 4 je najzastupljeniji u državama centralne Afrike, a u Europu je prenesen migracijom stanovništva. U Francuskoj je prema njihovim istraživanjima najčešći kod intravenskih korisnika droge<sup>154</sup>. U ovom je istraživanju njih 3,3 % s genotipom 4 intravenski koristilo drogu. Dokazan je jedino u dobnoj skupini od 31-40 godina bez razlike u spolu ispitanika. Mnoge su studije istraživale utjecaj HCV-genotipa na progresiju KHC-a. U nekima od njih nije dokazana povezanost genotipa HCV-a s napredovanjem KHC-a, dok se u nekima navodi moguća povezanost genotipa 1 s ubrzanim razvojem HCC<sup>106</sup>. Zekry i suradnici navode da pacijenti s genotipom 4 nakon transplantacije jetre imaju lošiju prognozu i veću smrtnost nego pacijenti zaraženi nekim drugim genotipom HCV-a<sup>249</sup>. TLR imaju bitnu ulogu u aktivaciji prirodne imunost prepoznavanjem TLR liganda podrijetlom iz različitih mikroorganizama i u pokretanju specifičnog imunološkog odgovora. Postoje pojedinci koji ne mogu adekvatno odgovoriti imunološkom reakcijom zbog SNP-ova unutar *tlr* gena koji uzrokuju poremećaje u prijenosu signala u stanici te u promijenjenoj osjetljivosti na infektivne bolesti<sup>197</sup>. Istraživanjem polimorfizma gena *tlr2* rs5743708 dobivene su frekvencije G-alela od 0,98 (98 %) i A-alela 0,02 (2 %). Dobivene frekvencije alela su u skladu s frekvencijama navedenih alela u europskoj populaciji prema NCBI. Usporedbom podskupina 40 kontrolnih ispitanika i 60 ispitanika oboljelih od KHC-a nije utvrđena značajna razlika između

genskih varijanti. AA genska varijanta nije dokazana niti u kontrolnoj skupini niti u skupini oboljelih od KHC-a. GA genska varijanta dokazana je kod 5 % kontrolnih ispitanika ženskog spola dok je u skupini oboljelih od KHC-a dokazana kod 1,7 % muškaraca. Kontrolni ispitanici imaju 5 puta veću šansu da budu heterozigoti za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 nego mutirani homozigoti (OR=5,00; CI=0,2327-107,4404), u odnosu na skupinu ispitanika oboljelih od KHC-a (OR=3,00; CI=0,1198-75,1177). Statističkom usporedbom podskupina utvrđeno je da kontrolni ispitanici imaju manji omjer izgleda obolijevanja za heterozigote u odnosu na homozigote divljeg tipa navedenog polimorfizma (OR=0,32; CI=0,0282-3,6758). Navedeni rezultati ukazuju na moguću zaštitnu ulogu ispitivanoga polimorfizma za nastanak KHC-a kod ženskog spola, poglavito zato što je u istraživanje uključeno manje žena u odnosu na muškarce. Za potvrdu navedenih rezultata, slijedeći korak u daljnjim istraživanjima bio bi povećanje broja uzoraka i sekvencioniranje *tlr2* gena kako bi se rasvijetlila uloga ispitivanog SNP-a u nastanku KHC-a. Iz toga razloga, svi navedeni omjeri izglednosti su tek približenja.

Analizirajući prisutnost simptoma bolesti prema genskim varijantama za polimorfizma gena *tlr2* rs5743708 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a nije utvrđena statistička značajnost. Analiza povezanosti čimbenika rizika za nastanak HCV-infekcije i genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a nije pokazala statistički značajnu povezanost navedenih čimbenika rizika s prisutnošću navedenog polimorfizma. Statistička analiza polimorfizma gena *tlr2* rs5743708 kod 40 kontrolnih ispitanika i 60 ispitanika oboljelih od KHC-a nije utvrdila povezanost navedenog polimorfizma i oboljenja od KHC-a, što nije u skladu s rezultatima drugih istraživanja<sup>65</sup>. Razlog tomu bi mogao biti i nedovoljan broj ispitanih uzoraka za navedeni polimorfizam.

TLR2 je bitan čimbenik oblikovanja imunološkog odgovora domaćina, jer sudjeluje u prepoznavanju i aktivaciji prirodne i stečene imunosti<sup>55, 213</sup>. Tomu u prilog ide i činjenica da u timusu sazrijevaju CD4<sup>+</sup> Th limfociti i Tc limfociti koji su CD8<sup>+</sup>. Potpuna aktivacija stečene imunosti posredovane limfocitima T zahtjeva prisutnost tzv. signala opasnosti nastalog stimulacijom TLR. TLR2 su isto kao i TLR4 smješteni na membrani stanice što dokazuje da su povezani s izvanstaničnim medijem. Preko



PAMP-ova prepoznaju proteine HCV-a pa dolazi do aktivacijskih signala u stanici koja otpušta protuupalne citokine i luči IFN koji stimulira stvaranje antivirusnih enzima i dovodi stanicu u protuvirusno stanje. Wetzler je u svom istraživanju pokazao da bilo koja promjena u funkciji TLR2 dovodi do smanjenja imunološke zaštite od onog patogena koji sadrži ligande za TLR2<sup>242</sup>. Isto se pokušalo objasniti u istraživanju zaraženih miševa s *Neospora caninum* u kojem je pokazano da mutirani homozigoti za TLR2 imaju teži oblik kronične infekcije od divljeg tipa TLR2, da sudjeluje u oblikovanju imunološkog odgovora te da mogu biti ciljno zaštitno sredstvo od ponovnog oboljenja<sup>143</sup>. Analiziranjem SNP-ova unutar gena *tlr2* kod djece s ponavljanim bakterijskim infekcijama ustanovljeno je znatno više heterozigota i mutiranih homozigota za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 u odnosu na kontrolnu skupinu<sup>118</sup>. Lorenz i suradnici su kod dva pacijenta od njih 91 sa septičkim šokom pronašli polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 i kod oba se pacijenta radilo o stafilokoknoj infekciji<sup>131</sup>. Nasuprot tomu, u jednoj velikoj studiji nije pronađena poveznica između navedenog polimorfizma i bolesti uzrokovanih bakterijom *Staphylococcus aureus*<sup>147</sup>. Visoka pojavnost polimorfizma gena *tlr2* rs5743708 dokazana je i među osobama oboljelim od tuberkuloze<sup>155</sup>. Utvrđena je i povezanost navedenog polimorfizma s oboljenjem od CMV-a nakon transplantacije jetre kod pacijenata koji su bolovali od KHC-a. Od ukupno 92 transplantirana pacijenta 7 pacijenata (8 %) bili su heterozigoti, a 5 pacijenata (5 %) mutirani homozigoti za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708. Među njima CMV se pojavio kod jednog heterozigota i kod 5 pacijenata koji su mutirani homozigoti za navedeni polimorfizam<sup>111</sup>. Nedostatak značajne povezanosti između oboljenja od KHC-a i heterozigota za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 dovodi nas do zaključka da jedan funkcionalni alel nije dostatan za izražaj fenotipskog svojstva navedenog polimorfizma u punom intenzitetu. U skladu s tim na stanicama podrijetlom od pacijenata koji su heterozigoti za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 dokazano je da mogu značajno smanjiti otpuštanje citokina u imunološkom odgovoru koji je simuliran lipoteihoičnom kiselinom ili bilo kojim drugim ligandom za TLR2 u usporedbi s divljim tipom za navedeni polimorfizam<sup>196, 233</sup>. Eid i suradnici su u svojoj studiji pokazali da su mutirani homozigoti za polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 povezani s odbacivanjem transplantata i većom smrtnosti poslije transplantacije jetre

kod oboljelih od KHC-a. Dokazali su da se navedeni SNP unutar *tlr2* gena može koristiti kao novi imunološki marker u prognozi uspješnosti transplantacije jetre kod oboljelih od KHC-a. Taj zaključak jasno pokazuje da TLR2 ima bitnu ulogu u patogenezi opetovane infekcije HCV-om nakon transplantacije jetre <sup>65</sup>. Sve te dosadašnje spoznaje navode da se polimorfizam gena *tlr2* rs5743708 treba istraživati kao mogući terapijski cilj kod oboljelih od KHC-a, isto kao što se već TLR7 počeo klinički ispitivati u liječenju HCV-a <sup>123</sup>.

SNP-ovi rs4986790 i rs4986791 unutar *tlr4* gena istraženi su kao moguća poveznica s raznim bolestima uzrokovanim bakterijama i virusima, kao što je septički šok uzrokovan gram-negativnim bakterijama, sepsa nakon operativnog zahvata i bronhiolitis u dojenčadi uzrokovan RSV-om <sup>68, 130, 218</sup>. Istraživanje provedeno u Italiji pokazalo je moguću ulogu ova dva polimorfizma u podložnosti za respiratorne infekcije koje dovode do upale pluća kod djece koja u povijesti bolesti imaju ponavljane respiratorne infekcije <sup>18</sup>. Studijama provedenim u Engleskoj, Španjolskoj i Italiji nije dokazana povezanost između TLR2 i TLR4 i oboljelih od reumatoidnog artritisa <sup>101, 112, 193</sup>. Nasuprot tome, u jednoj studiji provedenoj u Nizozemskoj dokazano je statistički značajno povećanje G alela za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa <sup>179</sup>. Frekvencija A alela za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 iznosi 70-80 % kod bijelaca <sup>101</sup>.

Polimorfizmi gena *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791 imaju različitu rasprostranjenost među stanovništvom Afrike, Azije i Europe. Među azijskim stanovništvom gotovo da nema navedenih polimorfizama, 1-2 % su prisutni kod afričkog stanovništva, 5 % kod Indoeuropljana te čak 9 % kod naroda Baska. Istraživanjem navedena dva polimorfizma zabilježena je njihova značajna frekvencija posebno kod stanovništva bijele rase. Nasuprot tome, jedna studija provedena u Zapadnoj Africi prikazuje prisutnost samo polimorfizma gena *tlr4* rs4986790, dok prisutnost polimorfizma gena *tlr4* rs4986791 nisu dokazali među ispitanicima. Ovakova različita istraživanja dokazuju da ljudska populacija širom svijeta ima različitu prevalenciju TLR4 koji je uključen u odraz specifičnih lokalnih infekcija među stanovništvom i kasnijom podložnošću tim infekcijama. Afrička populacija pokazuje visoku prevalenciju polimorfizma gena *tlr4* rs4986790 i to između 10 % i 18 %, dok je kod istih ispitanika

samo 2 % onih koji imaju i polimorfizam gena *tlr4* rs4986791. Naime, kod ispitanika koji imaju polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 uvijek je prisutan i polimorfizam gena *tlr4* rs4986790. U populacijama Azije i Amerike gotovo da nema polimorfizma gena *tlr4*, ali su zabilježeni pojedinačni slučajevi polimorfizma rs4986790 ili rs4986791 u Indoneziji. Nasuprot tome, kod 6-14 % Indoeuropljana pronađeno je da su heterozigoti za oba polimorfizma gena *tlr4* (frekvencija alela 3-7 %) te kod 18 % naroda Baska (frekvencija alela 9 %). Prisutnost navedenih polimorfizama u afričkoj populaciji, kao i u populaciji Indoeuropljana i Baska, navodi na činjenicu da su te mutacije nastale u Africi prije više od šezdeset tisuća godina i migracijom stanovništva dospjele u Europu preko Srednjeg Istoka<sup>67</sup>. Istraživanjem polimorfizma gena *tlr4* rs4986790 u ispitanika naše regije dobivene su frekvencije A-alela od 0,88 (88 %) i G-alela od 0,12 (12 %). Frekvencija C-alela za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 iznosi 0,88 (88 %), a frekvencija T-alela iznosi 0,12 (12 %). Dobivene frekvencije alela za oba navedena polimorfizma u skladu su s frekvencijama navedenih alela u europskoj populaciji prema NCBI. Usporedbom podskupina kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a nije utvrđena značajna razlika između genskih varijanti. Podjelom dobivenih genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod oboljelih od KHC-a prema spolu uočavamo da je GG genska varijanta češća u muškaraca nego u žena (7 % vs 0 %). Ispitanici oboljeli od KHC-a imaju 17,66 puta veću šansu biti homozigoti divljeg tipa za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 nego heterozigoti (OR=17,66; CI=5,2314-59,6606) i 13,25 puta veću šansu nego mutirani homozigoti (OR=13,25; CI=4,5111-38,9183). Kod kontrolnih ispitanika je 16 puta veća šansa da budu homozigoti divljeg tipa u odnosu na heterozigote navedenog polimorfizma (OR=16,00; CI=3,5905-71,2994) i 5,33 puta veća šansa u odnosu na mutirane homozigote (OR=5,33; CI=2,0099-14,1524). Statističkom usporedbom podskupina utvrđeno je da ispitanici oboljeli od KHC imaju veći omjer izgleda obolijevanja za heterozigote (OR=0,91; CI=0,1435-5,7153) i mutirane homozigote (OR=0,40; CI=0,1055-1,5358) u odnosu na homozigote divljeg tipa navedenog polimorfizma. Oboljeli od KHC imaju 2,25 puta veću šansu biti heterozigoti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 nego mutirani homozigoti (OR=2,25; CI=0,2515-20,1313), u odnosu na kontrolne ispitanike. Isti su rezultati dobiveni i za

polimorfizam gena *tlr4* rs4986791, jer smo, isto kao i Lorenz i suradnici, dokazali da se ta dva gena nalaze u neravnoteži vezanosti gena<sup>130</sup>. Yonghong i suradnici su dokazali da su SNP-ovi u TLR4 povezani s povećanim rizikom razvoja fibroze i ciroze jetre, a u rizične faktore ubrajaju muški spol, dob od oko 49 godina te konzumiranje alkohola. Statističko analiziranje nije pokazalo povezanost prisutnosti simptoma bolesti i genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod ispitanika oboljelih od KHC-a. Tu je bitno istaknuti statističku vrijednost  $p=0,0744$  koja je dobivena testiranjem genskih varijanti AA, AG i GG kod oboljelih od KHC-a i gubitka apetita. Na temelju statističkog rezultata i dalje ostaje pitanje bi li dobili statistički značajan rezultat da je u ovo istraživanje uključen veći broj ispitanika. Analiza povezanosti čimbenika rizika za nastanak HCV-infekcije i genskih varijanti za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 kod kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a nije pokazala statistički značajnu povezanost navedenih čimbenika rizika s prisutnošću navedenog polimorfizma. Podjelom mutiranih homozigota za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 prema podacima dobivenim iz informiranog pristanka uočili smo bitne razlike između kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljelih od KHC-a. Značajno veći gubitak apetita imali su mutirani homozigoti oboljeli od KHC-a u usporedbi s mutiranim homozigotima kontrolne skupine (6,7 % vs 2,5 %). Nešto više ispitanika oboljelih od KHC-a primilo je transfuziju krvi prije 1993. godine i imalo operativni zahvat prije 1993. godine u odnosu na kontrolne ispitanike s TT genskom varijantom (3,3 % vs 2,5 %). Shalhub i suradnici u svom istraživanju nisu dokazali povezanost polimorfizma gena *tlr4* rs4986790 s razvojem sepse u pacijenata koji su primili transfuziju krvi<sup>202</sup>. Dokazali smo da duplo više oboljelih od KHC-a s TT genskom varijantom ima body piercing ili tetovažu u odnosu na kontrolne ispitanike, te da su oboljeli od KHC-a s TT genskom varijantom intravenski koristili drogu, dok je kontrolni ispitanici s TT genskom varijantom nisu koristili. Dobiveni rezultati vrijede i za mutirane homozigote polimorfizma gena *tlr4* rs4986790, jer su oni ovisni jedan o drugome u nasljeđivanju. Usporedbom podskupina 40 kontrolnih ispitanika i 60 ispitanika oboljelih od KHC-a nije utvrđena povezanost navedenih polimorfizma i oboljenja od KHC-a.

U obrani od HCV-a sudjeluju mehanizmi humoralne i stanične imunosti. Od humoralnih čimbenika najvažniji su IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  i protutijela. IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  štite

zdrave stanice od HCV-a, a protutijela neutraliziraju viruse koji se još nalaze izvan stanica, time što onemogućuju spajanje virusa sa staničnim receptorima ili sprečavaju replikaciju virusa<sup>14</sup>. Međudjelovanje sastavnica prirodne imunosti i virusa pojačava izražaj kostimulacijskih, adhezijskih i drugih molekula na tim stanicama, što posljedično aktivira limfocite T kao glavne posrednike stečene imunosti. U tom procesu oblikovanja specifične imunoreakcije sudjeluju brojni topljivi čimbenici (citokini i kemokini). Nakon inficiranja HCV-om, replikacija virusa počinje u jetri i u toj se fazi pokreće prirodni imunološki odgovor koji uključuje IFN- $\alpha$  i prirodnoćelne stanice (NK, engl. *natural killer*). Kako virusni antigeni potiču i staničnu i humoralnu imunost, nastaju Tc limfociti, a stvorena protutijela se vežu za makrofage i NK stanice te uz pomoć citokina pokreću lizu virusom zaražene stanice. Različiti tkivni makrofagi i monociti također mogu postati zaraženi HCV-om, što za posljedicu ima smanjeno lučenje citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ). Zbog HCV-infekcije Th limfocite, koji pokreću imunološku reakciju, uništavaju NK stanice, Tc limfociti i makrofagi zbog čega je imunološka obrana neučinkovita i dolazi do razvoja KHC-a<sup>115, 219</sup>. Iz svega navedenog zaključujemo da sam virus ne uzrokuje izravna oštećenja, već su ta oštećenja posljedica suodnosa virusa s imunološkim sustavom organizma, što u prvom redu uključuje aktivnost Tc limfocita i proupalnih medijatora, odnosno citokina<sup>224</sup>.

Broj virusa nije povezan s težinom oboljenja od HCV-a, no može utjecati na odgovor liječenja. Osnovni cilj liječenja virusnog hepatitisa je eradikacija infekcije odnosno prevencija progresije bolesti. Kod KHC-a eradikacijom virusa nastoji se reducirati upalna aktivnost i prevenirati razvoj ciroze jetre. Danas dostupno liječenje učinkovito je tek u nešto više od polovice liječenih, a trajanje terapije primarno ovisi o genotipu HCV-a. Tako su genotip HCV-a i broj virusnih kopija izdvojeni kao dva važna čimbenika za određivanje terapije kod oboljelih od KHC-a. Do sada su u raznim studijama ispitani mnogi prediktori virološkog odgovora s ciljem izdvajanja grupe pojedinaca koja hoće ili neće zadovoljavajuće odgovoriti na dostupnu terapiju. U ovom istraživanju prikazana je poveznica između genotipa virusa, broja virusnih kopija i TLR-a. Od ukupno 60 ispitanika oboljelih od KHC-a njih 33 (55 %) je primalo terapiju ovisno o genotipu virusa HCV-a. Prema podjeli po spolu nema statistički

značajne razlike u primjeni antivirusne terapije. Prva kontrola terapije provedena je nakon 28 tjedana od početka terapije. U tom je periodu primjene terapije RVR postignut kod 34 % ispitanika, a kod 27 % ispitanika broj virusnih kopija smanjen je za više od 2 logaritma. Broj virusnih kopija je kod 27 % ispitanika ostao isti, dok je kod 12 % ispitanika došlo do porasta broja kopija u plazmi premda su bili na terapiji. Druga kontrola terapije provedena je 53 tjedna od početka terapije. HCV RNA u plazmi nije bila mjerljiva kod 58 % ispitanika, kod 12 % ispitanika broj virusnih kopija smanjen je za više od 2 logaritma, dok je kod 18 % ispitanika broj kopija i nakon provedene terapije ostao isti. Nikakvog terapijskog učinka nije bilo kod 12 % ispitanika, nego je došlo do porasta broja kopija u plazmi isto kao i nakon prve kontrole terapije. Usporedbom genotipova HCV-a i broja kopija virusa u plazmi prije početka liječenja došli smo do zaključka da su oboljeli od KHC-a, kojima je određen genotip 1, imali veći broj kopija virusa u usporedbi s genotipom 3 i 4. Isto su dokazali i Chakravati i suradnici u svom istraživanju. Oni navode i da je genotip 1 povezan s težim oboljenjima jetre u usporedbi s genotipom 2 i 3, što je utvrđeno brojem virusnih kopija, te da pacijenti s većim brojem kopija virusa u serumu imaju slabiji odgovor na terapiju od onih pacijenata koji u serumu imaju niži broj kopija virusa <sup>41</sup>. Povezanost HCV-genotipa i broja virusnih kopija istraživana je u brojnim studijama. Jedni su dokazali da je visoki broj kopija virusa povezan s težim oštećenjima jetre <sup>3</sup>, dok drugi to u svojim studijama nisu dokazali <sup>79, 83</sup>. Nakon prve kontrole terapije HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi kod 24 % ispitanika s genotipom 1, kod 6 % ispitanika s genotipom 3 i kod polovice ispitanika s genotipom 4. Nakon druge kontrole terapije broj ispitanika s genotipom 1, kod kojih nije bila mjerljiva HCV RNA, povećao se na 45 %, s genotipom 3 na 9 %, dok je kod ispitanika s genotipom 4 RVR postignut kod polovice ispitanika isto kao i nakon prve kontrole, ali je značajno to da je kod druge polovice ispitanika s genotipom 4 postignuto smanjenje broja kopija ispod 2 logaritma. Svi ispitanici koji su heterozigoti ili mutirani homozigoti za polimorfizme gena *tlr4* rs4986790 i rs4986791, prije početka liječenja, imali su više od 2 logaritma virusnih kopija u plazmi. Homozigoti divljeg tipa za navedene polimorfizme također su prije početka liječenja imali više od 2 logaritma virusnih kopija u plazmi, osim jednog ispitanika. Nakon prve kontrole terapije kod 33 % ispitanika koji su homozigoti divljeg

tipa za iste polimorfizme HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi, a kod 3 % ispitanika broj je virusnih kopija smanjen na manje od 2 logaritma. Kod heterozigota i mutiranih homozigota prilikom prve kontrole terapije nije došlo do smanjenja broja virusnih kopija ispod 2 logaritma. Nakon druge kontrole terapije kod 48 % ispitanika koji su homozigoti divljeg tipa za polimorfizme gena *tlr4* rs4986790 i rs4986791, HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi, a kod 9 % ispitanika broj kopija smanjen je na manje od 2 logaritma. Svim mutiranim homozigotima i kod polovice ispitanika koji su heterozigoti za navedene polimorfizme, HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi prilikom druge kontrole terapije. Kod druge polovice heterozigota za navedene polimorfizme nije došlo do smanjenja broja virusnih kopija ispod 2 logaritma.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata opisanog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Statističkom usporednom analizom podskupina koje obuhvaćaju osobe oboljele od KHC-a i kontrolne ispitanike nije utvrđena statistički značajna razlika za polimorfizme gena *tlr2* rs5743708, *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791 ( $p>0,05$ ).
2. S obzirom na spol, KHC se češće pojavljuje kod muškaraca nego u žena, ali razlika nije statistički značajna.
3. S obzirom na dob, najviše oboljelih od KHC-a dokazano je u dobnoj skupini od 31-40 godina. U istoj dobnoj skupini više je muškaraca, dok je najviše žena oboljelih od KHC-a u dobnoj skupini od 51-60 godina.
4. Ovisno o simptomima bolesti, oboljeli od KHC-a imali su izraženije bolove u mišićima ( $p=0,032$ ) i gubitak apetita ( $p=0,0006$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.
5. Ovisno o rizičnim faktorima prijenosa HCV-a, dokazana je statistička značajnost za primljenu transfuziju krvi prije 1993. godine ( $p=0,0158$ ) i obavljeni operativni zahvat prije 1993. godine ( $p=0,0496$ ) kod oboljelih od KHC-a u odnosu na kontrolnu skupinu.
6. U odnosu na kontrolnu skupinu, u skupini oboljelih od KHC-a više ispitanika ima body piercing ili tetovažu i njih 30 % je intravenski uzimalo drogu, ali bez statističke značajnosti.



7. Imunoenzimskom metodom je dokazano da je polovica kontrolnih ispitanika tijekom svog života bila u kontaktu s virusom HCV-a, ali nisu razvili bolest ( $p=0,0020$ ).
8. U odnosu na genotipove 2, 3 i 4, najviše ispitanika bilo je zaraženo genotipom 1.
9. Statistički značajno više zaraženih genotipom 1 primili su transfuziju krvi prije 1993. godine ( $p<0,0001$ ), imali su operativni zahvat prije 1993. godine ( $p<0,0001$ ), na tijelu imaju body piercing ili tetovažu ( $p=0,0014$ ) i konzumirali su seksualni odnos bez zaštite ( $p<0,0001$ ) u odnosu na zaražene drugim genotipovima HCV-a.
10. Manja zastupljenost GA genske varijante kod oboljelih od KHC-a u odnosu na kontrolnu skupinu upućuje na moguću zaštitnu ulogu gena *tlr2* rs5743708 za nastanak KHC-a, posebice kod ženskog spola, koju treba potvrditi ili opovrgnuti namjenskom studijom.
11. Polimorfizmi gena *tlr4* rs4986790 i *tlr4* rs4986791 nalaze se u neravnoteži vezanosti gena, odnosno lokusi su informacijski redundantni.
12. GG genska varijanta za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 i TT genska varijanta za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 dokazane su samo kod muškaraca oboljelih od KHC-a.
13. Značajno veći gubitak apetita imali su oboljeli od KHC-a s GG genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 i TT genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 u odnosu na kontrolne ispitanike s istim genskim varijantama.

14. Duplo više oboljelih od KHC-a s GG genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 i TT genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 ima body piercing ili tetovažu u odnosu na kontrolne ispitanike s istim genskim varijantama.
15. Oboljeli od KHC-a s GG genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 i TT genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 češće su intravenski koristili drogu, dok je kontrolni ispitanici s istim genskim varijantama nisu koristili, no bez statističke značajnosti.
16. Ispitanici zaraženi genotipom 1 imali su veći broj kopija virusa u plazmi u usporedbi s drugim genotipovima virusa HCV-a.
17. Kod ispitanika s genskim varijantama AG i GG za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 te CT i TT za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 nije došlo do smanjenja broja virusnih kopija ispod 2 logaritma nakon kontrole terapije u 28 tjednu od početka terapije.
18. Ispitanicima s GG genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 i TT genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791, HCV RNA nije bila mjerljiva u plazmi nakon kontrole terapije u 53. tjednu od početka terapije.
19. Kod polovice ispitanika s AG genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986790 i CT genskom varijantom za polimorfizam gena *tlr4* rs4986791 nije postignuto smanjenje broja virusnih kopija ispod 2 logaritma nakon kontrole terapije u 53. tjednu od početka terapije.

## 7. LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2011) *Innate Immunity U*: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Elsevier, 55-86
2. Abdulkarim AS, Zein NN, Germer JJ, Kolbert CP, Kabbani KL, Krajnik A, et al (1998) Hepatitis C virus genotypes and hepatitis G virus in hemodialysis patients from Syria: identification of two novel hepatitis C virus subtypes. *Am. J. Trop. Med.* 59: 571-576
3. Adinolfi LE, Utili R, Andreana A, Tripodi MF, Marracino M, et al (2001) Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 46(8): 1677-1683
4. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX (1999) Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *PNAS* 96(22): 12766-12771
5. Akira S, Hemmi H (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters* 85: 85-95
6. Akira S, Kawai T (2006) TLR signaling. *Cell Death and Differentiation* 13: 816-825
7. Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Immunology* 4: 499-511
8. Akira S, Uematsu S, Tekeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124: 783-801
9. Albuquerque AC, Coelho MR, Lopes EP, Lemos MF, et al (2005) Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one center in Recife, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100(5): 467-470
10. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, et al (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285: 736-739
11. Allander T, Medin C, Jacobson SH, et al (1994) Hepatitis C transmission in a hemodialysis unit: molecular evidence for spread of virus among patients not sharing equipment. *J Med Virol* 43: 415-419

12. Alter MJ (2007) Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13: 2436-2441
13. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nianian OV, et al (1999) The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N England J Med* 341: 556-562
14. Andreis I (2004) Imunost na infekcije. *U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, i sur. Imunologija. Medicinska naklada Zagreb*, 263-276
15. Ansaldi F, Bruzzone B, Salmaso S, Rota MC, et al (2005) Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. *J Med Virol* 76(3): 327-332
16. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ (2002) The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 144: 705-714
17. Axelord DE, Baggerly KA, Kimmel M. J (1994) Gene amplification by unequal sister chromatid exchange: probabilistic modeling and analysis of drug resistance data. *Theor. Biol.* 168(2): 151-159
18. Badolato R, Fontana S, Barcella D, Moratto D, Dippolito C, et al (2004) Toll-like receptor-4 genotype in children with respiratory infections. *Allergy* 59: 1018-1019
19. Bartenschlager R, Lohmann V (2000) Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* 81: 1631-1648
20. Barth H, Schnober EK, Neumann-Haefelin C, Thumann C, Zeisel MB, Dieploder HM, et al (2008) Scavenger receptor class B is required for hepatitis C virus uptake and cross-presentation by human dendritic cells. *J Virol* 82(7): 3466-3479
21. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubisson J, Pascale S, et al (2003) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278: 41624-41630

22. Bassett EH, Rich T (2005) Toll Receptors and the Renaissance of Innate Immunity. *U: Rich T. Toll and Toll-Like Receptors: An Immunologic Perspective*. Kluwer Academic, Plenum Publisher, pp 1-17
23. Bdour Salwa (2002) Hepatitis C virus infection in Jordanian haemodialysis units: serological diagnosis and genotyping. *J. Med. Microbiol.* 51: 700-704
24. Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A (2001) The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 7: 661-670
25. Belgrader P, Marino MM, Lubin M, Barany F (1996) A Multiplex PCR-Ligase Detection Reaction Assay for Human Identity Testing. *Genome Science and Technology* 1(2): 77-87
26. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24: 528-533
27. Bezerra CS, Lima JMC, Vilar JL, Moreira JLB, et al (2007) Viral hepatitis C in a leading Brazilian hospital: epidemiological factors and genotyping. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 656-661
28. Bingulac-Popović J, Babić I, Dražić V, Grahovac B (2000) Distribution of hepatitis C virus genotypes in the Croatian population. *Biochem Med* 3(4): 175-180
29. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE (2008) Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology* 47: 321-331
30. Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM (2003) Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 77: 3181–3190
31. Boekholdt SM, Agema WRP, Peters RJG, Zwinderman AH, et al (2003) Variants of Toll-Like Receptor 4 Modify the Efficacy of Statin Therapy and the Risk of Cardiovascular Events. *Circulation* 107: 2416-2421
32. Bonacini M, Puoti M (2000) Hepatitis C in Patients With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Arch Inter Med* 160: 3365-3373
33. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE (1985) Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees.

- Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 88: 773-779
34. Brass V, Moradpour D, Blum HE (2006) Molecular Virology of Hepatitis C Virus. *Int. J. Med. Sci.* 3(2): 29-34
  35. Brikos C, O'Neill LAJ (2004) Signalling of Toll-like Receptors. *U: Bauer S, Hartmann G, Akira s. Toll-like Receptors (TLRs) and innate immunity. Handbook of Experimental Pharmacology*, pp 21-50
  36. Burlone ME, Budkowska A (2009) Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *Journal of General Virology* 90: 1055-1070
  37. Busek SU, Baba EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, et al (2002) Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97(6): 775-778
  38. Campello C, Poli A, Dal Molin G, Besozzi-Valentini F (2002) Seroprevalence, viremia and genotype distribution of hepatitis C virus: a community –based population study in northern Italy. *Infection* 30: 7-12
  39. Candotti D, Temple J, Sarkodie F, Allain JP (2003) Frequent Recovery and Broad Genotype 2 Diversity Characterize Hepatitis C Virus Infection in Ghana, West Africa. *J Virology* 77(14): 7914-7923
  40. Carneiro MAS, Teles SA, Dias MA, Ferreira RC, et al (2005) Decline of hepatitis C infection in hemodialysis patients in Central Brazil: a ten years of surveillance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(4): 345-349
  41. Chakravarti A, Dogra G, Verma V, Srivastava AP (2011) Distribution pattern of HCV genotypes & its association with viral load. *Indian J Med Res* 133: 326-331
  42. Chamberlain RW, Adams N, Saeed AA, Simmonds P, Elliott RM (1997) Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *J. Gen. Virol.* 78: 1341-1347
  43. Chang S, Dolganiuc A, Szabo G (2007) Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 protein. *J Leukocyte Biology* 82: 479-487

44. Chen SL, Morgan TR (2006) The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 3: 47-52
45. Chevaliez S, Pawlotsky JM (2006) Hepatitis C Virus Serologic and Virologic Tests and Clinical Diagnosis of HCV-Related Liver Disease. *Int. J. Med. Sci.* 3(2): 35-40
46. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362
47. Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, et al (2003) Hepatitis C virus infection in the general population : a community-based study in West Bengal, India. *Hepatology* 37: 802-809
48. Clarke B (1997) Molecular virology of hepatitis C virus. *J general Virology* 78: 2397-2410
49. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, et al (2003) Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *Journal of Virology* 77(8): 4588-4596
50. Das BR, Kundu B, Khandapkar R, Sahni S (2002) Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in India. *Indian J Pathol Microbiol* 45: 323-338
51. Delaloye J, Roger T, Steiner-Tardivel QG, Roy DL, et al (2009) Innate Immune Sensing of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Is Mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP# INflammasome. *PLoS Pathogenes* 5(6): 1-15
52. Dembic Z (2005) The Function of Toll-Like Receptors. *U: Rich T. Toll and Toll-Like Receptors: An Immunologic Perspective.* Kluwer Academic, Plenum Publisher, pp 18-51
53. Desenclos JC (2000) Epidemiology of hepatitis C. *Revue du Praticien* 50: 1066-1070
54. Dolganiuc A, Garcia C, Kodys K, Szabo G (2006) Distinct toll-like receptor expression in monocytes and T cell in chronic HCV infection. *World J Gastroenterol* 12(8): 1198-1204
55. Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, Golenbock DT, Finberg RW, et al (2004) Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-

- mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 127(5): 1513-1524
56. Dominguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Salleras L (2001) Community-based seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. *J Med Virol* 65: 688-693
57. Dore GJ, Law M, MacDonald M, Kaldor JM (2003) Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *J Clin Virol* 26(2): 171-184
58. Dore GJ, MacDonald M, Law MG, Kaldor JM (2003) Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *Aust Fam Physician* 32: 796-798
59. Drazan KE (2000) Molecular Biology of Hepatitis C Infection Liver. *Transpl* 6: 396-406
60. Druley TE, Vallania FLM, Wegner DJ, Varley KE (2009) Quantification of rare allelic variants from pooled genomic DNA. *Nature Methods* 6: 263-265
61. Dubuisson J (2007) Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13(17): 2406-2415
62. Duesberg U, von dem Bussche A, Kirschning C, Miyake K, Sauerbruch T, Spengler U (2002) Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV) -core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol. Lett.* 84(2): 89-95
63. Dunne A, O'Neill LAJ (2003) The Interleukin-1 Receptor/Toll-Like Receptor Superfamily: Signal Transduction During Inflammation and Host Defense. *Sci. STKE* 171: 1-17
64. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE (1999) Interleukin-10 Promoter Polymorphism Predicts Initial Response of Chronic Hepatitis C to Interferon Alfa. *Hepatology* 30(2): 526-530
65. Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR (2007) Association Between Toll-like Receptor Polymorphisms and the Outcome of Liver Transplantation for Chronic Hepatitis C Virus. *Transplantation* 84: 511-516
66. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE (2000) Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology reviews* 13(4): 559-570



67. Ferwerda B, McCall MBB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al (2007) TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *PNAS* 104(42): 16645-16650
68. Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, et al (2003) Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology* 109: 426-431
69. Flint M, Thomas J, Maidens C, et al (1999) Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 73(8): 6782-6790
70. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, et al (2000) The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 355: 887-891
71. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge University Press, Published in the United States of America by Cambridge University Press, pp 45-48
72. Friedman RM, Contente S (2010) Treatment of Hepatitis C Infections with Interferon: A Historical Perspective. *Hepatitis Research and Treatment* 2010. Article ID 323926:1-4
73. Gale M, Foy EM (2005) Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436: 939-945
74. Gao B, Jeong WI, Tian Z (2008) Liver: An Organ with Predominant Innate Immunity. *Hepatology* 47: 729-736
75. Georgel P, Macquin C, Bahram S (2009) The Heterogeneous Allelic Repertoire of Human Toll-Like Receptor (TLR) Genes. *PLoS ONE* 4(11): e7803
76. Gerard C, Delwaide J, Vaira D, Bastens B, Servais B, et al (2005) Evolution over a 10 year period of the epidemiological profile of 1,726 newly diagnosed HCV patients in Belgium. *J Med Virol* 76: 503-510
77. Germer JJ, Harmsen WS, Mandrekar JN, Mitchell PS, Yao JDC (2005) Evaluation of the COBAS taqMan HCV Test with Automated Sample Processing Using the MagNA Pure LC Instrument. *J Clinical Microbiology* 43(1): 293-298

78. Grahovac B, Hadžisejdić I (2006) Molekularna dijagnostika hepatitisa C. *Medicina* 42: 132-137
79. Gretch D, Corey L, Wilson J, dela Rosa C, Willson R, et al (1994) Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: high-titer viremia correlates with advanced stage of disease. *J Infect Dis.* 169(6): 1219-1225
80. Grgičević D, Balija M, Pirc-Tiljak D, Mihaljević I, Gjenero-Margan I, Zupančić-Salek S, Maček P (2000) Decreasing risk of viral transfuzion-transmitted diseases in Croatia. *Croat Med J* 41(2): 191-196
81. Guo J, Friedman SL (2010) Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis and Tissue Repair* 3: 1-19
82. Habib M, Mohamed MK, Abdel-Aziz F, Magder LS, et al (2001) Hepatitis C Virus Infection in a Community in the Nile Delta: Risk Factors for Seropositivity. *Hepatology* 33(1): 248-253
83. Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, Naito M, Kasahara A, et al (1993) Quantitation of hepatitis C virus RNA in serum of asymptomatic blood donors and patients with type C chronic liver disease. *Hepatology* 17(4): 545-550
84. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, et al (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* 166: 15-19
85. Hamann L, Gomma A, Schroder NWJ, Stämme C, Glaeser C, Schulz S, et al (2005) A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. *J Mol Med* 83: 478-485
86. Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schrumann RR (2004) Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes. *Journal of Immunological Methods* 285: 281-291
87. Hamilton JP, Thuluvath PJ (2008) Claudin-1 and its potential role in HCV entry: another piece of puzzle. *J Clin Gastroenterol* 42: 3-4
88. Hammer GP, Kellogg TA, McFarland WC, et al (2003) Low incidence and prevalence of hepatitis C virus infection among sexually active nonintravenous

- drug-using adults, San Francisco, 1997-2000. *Sex Transm Dis* 30(12): 919-924
89. Harris HJ, Davis C, Mullins JGL, Hu K, Gooldall M, Farquhar MJ, et al (2010) Claudin Association with CD81 Defines Hepatitis C Virus Entry. *Journal of Biological Chemistry* 285(27): 21092-21102
90. Hawn T, Verbon A, Janer M, Zhao LP, Beutler B, Aderem A (2005) Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaire's disease. *PNAS* 102(7): 2487-2489
91. Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, Chalmers KJ (2008) Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9(80): 1-12
92. Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA (2001) Involvement of Toll-Like Receptor 4 in Innate Immunity to Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology* 75(22): 10730-10737
93. Hommels MJ, Kroon AA, Netea MG, de Leeuw PW, et al (2007) The Asp299Hly Toll-like receptor 4 polymorphism in advanced aortic atherosclerosis. *Netherlands J. Med.* 65(6): 203-207
94. Hoofnagle JH (1997) Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26: 15S-20S
95. Hrstić I, Vucelić B (2007) Biološke osobitosti hepatitis C virusa. *Medicina* 43: 107-111
96. Huh K, Choi SY, Whang YS, Lee DS (1998) Prevalence of Viral Hepatitis Markers in Korean Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J Korean Med Sci* 13: 306-310
97. Huy TT, Abe K (2004) Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infections in Asia. *Pediatr International* 46: 223-230
98. Iannuzzi MC, Maliarik M, Rybicki B (2002) Genetic polymorphisms in lung disease: bandwagon or breakthrough? *Respir Res* 3(1): 1-8
99. Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* 5(10): 987-995

100. Jadan M (2004) Otkrivanje i analiza polimorfizama jednog nukleotida tehnologijom LightCycler. *Biochemia Medica* 14: 109-117
101. Jaen O, Petit-Teixeira E, Kirsten H, Ahnert P, et al (2009) No evidence of major effects in several Toll-like receptor gene polymorphisms in reumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 11(1): R5
102. Janeway CA, Medzhitov R (2002) Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216
103. Janssens S, Beyaert R (2003) Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(4): 637-646
104. Jawaid A, Khuwaja AK (2008) Treatment and vaccination for hepatitis C: Present and future. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 20(1): 129-133
105. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, de Wall Malefyt R, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ (2001) Subsets of Human Dendritic Cell Procrursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J. Exp. Med.* 194(6): 863-869
106. Kamal SM, Nasser IA (2008) Hepatitis C Genotype 4: What we know and wath we don't yet know. *Hepatology* 47(4): 1371-1383
107. Kao JH, Hwang YT, Chen PJ, Yang PM, Lai MY, et al (1996) Transmission of hepatitis C virus between spouses: the important role of exposure duration. *Am J Gastroenterol* 91(10): 2087-2090
108. Karmochkine M, Carrat F, Dos Santos O, Cacoub P, Raguin G (2006) A case-control study of risk factors for hepatitis C infection in patients with unexplained routes of infection. *J Viral Hepat* 13: 775-782
109. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, et al (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101-105
110. Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death and Differentiation* 13: 816-825
111. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR (2007) Relationship between Toll-like Receptor 2 Polymorphism and Cytomegalovirus Disease after Liver Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 44: 1315-1320

112. Kilding R, Akil M, Till S, Amos R, Winfield J, et al (2003) A biologically important single nucleotide polymorphism within the toll-like receptor-4 gene is not associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 21(3): 340-342
113. Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11: 725-732
114. Kosanović ML, Knežević J (2006) Epidemiološke karakteristike osoba testiranih na hepatitis C u okviru akcije "Hepatitis C – otkrij, spriječi, izliječi," u Zavodu za javno zdravstvo grada Zagreba. *HČJZ* 2(8): 1-3
115. Koziel MJ (2005) Cellular Immune Responses against Hepatitis C Virus. *CID* 41(1): s25-31
116. Kučinar J (2005) Dijagnostika HCV infekcije. *HČJZ* 1: 1-3
117. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, et al (2000) Pattern Recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncycial virus. *Nat. Immunol.* 1: 398-401
118. Kutukculer N, Yeniay BS, Aksu G, Berdeli A (2007) Arg753Gln Polymorphism of the Human Toll-like Receptor-2 Gene in Children with Recurrent Febrile Infections. *Biochem Genet* 45: 507-514
119. La Torre G, Miele L, Mannocci A, Chiaradia G et al (2006) Correlates of HCV seropositivity among familial contacts of HCV positive patients. *BMC Public Health* 6: 237-245
120. Lakošeljac D, Rukavina T (2007) Epidemiologija hepatitis C virusne infekcije. *Medicina* 43: 112-117
121. Laumann AE, Derick AJ (2006) Tattoos and body piercings in the United States: A national data set. *J Am Acad Dermatol* 55(3): 413-421
122. Law MG, Dore GJ, Bath N, et al (2003) Modelling hepatitis C virus incidence, prevalence, and long-term sequelae in Australia, 2001. *Int J Epidemiol* 32: 717-724
123. Lee J, Wu CCN, Lee KJ, Chuang TH, Katakura K, et al (2006) Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *PNAS* 103(6): 1828-1833

124. Lesnikar V (2005) Epidemiologija HCV infekcije u Hrvatskoj. *Acta Med Croatica* 59(5): 377-381
125. Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4(3): 203-221
126. Liang Y, Zhou Y, Shen P (2004) NF- $\kappa$ B and Its Regulation on the Immune System. *Cellular & Molecular Immunology* 1(5): 343-350
127. Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM (1994) Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 68: 5063-5073
128. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisem TL, Liu CC, et al (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623-626
129. Liu HM, Gale M (2010) Hepatitis C Virus Evasion from RIG-I-Dependent Hepatic Innate Immunity. *Gastroenterology Research and Practice* 2010: 1-8
130. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA (2002) Association between the Asp299Gly Polymorphisms in the Toll-like Receptor 4 and Premature Births in the Finnish Population. *Pediatric Research* 52(3): 373-376
131. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA (2000) A Novel Polymorphism in the Toll-Like Receptor 2 Gene and Its Potential Association with Staphylococcal Infection. *Infect. Immunol.* 68(11): 6398-640
132. Lu Zhengwu (2010) Potential therapeutic interventions on toll like receptors for clinical applications. *Res. Pharm. Biotech.* 2(1): 007-013
133. Lundin M, Lindström H, Grönwall C, Persson MA (2006) Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J Gen Virol* 87: 3263-3272
134. Lunel-Fabiani F (2007) Recent advances in hepatitis C virus research and understanding the biology of the virus. *World J Gastroenterol* 13(17): 2404-2405
135. Macpherson AJ, Uhr T (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303: 1662–1665

136. Makkai T, McAllister I (2001) Prevalence of tattooing and body piercing in the Australian community. *Commun Dis Intell* 25(2): 67-72
137. Marušić M, Kovač Z (2011) Poremećaji prirodene i stečene imunoreaktivnosti. U: Gamulin S, Marušić M, Kovačić Z i sur. *Patofiziologija, Knjiga prva. Imunologija. Medicinska naklada Zagreb*, 485-491
138. McHutchison JG (2004) Understanding Hepatitis C. *Am J Manag Care* 10: S21-S29
139. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, et al (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *The New Eng J Med* 339(21): 1485-1492
140. Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunology* 1: 135-145
141. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397
142. Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF (2009) Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut* 58: 704-720
143. Mineo TWP, Oliveira CJF, Gutierrez FRS, Silva JS (2010) Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. *IMMUNOLOGY AND Cell Biology* 88: 825-833
144. Misch EA, Hawn TR (2008) Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clinical Science* 114: 347-360
145. Mitchison NA (2000) Polymorphism in regulatory gene sequences. *Genome Biology* 2(1): 2001.1-6
146. Mizel SB, Honko AN, Moors MA, Smith PS, West AP (2003) Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *J. Immunol.* 170(12): 6217-6223
147. Moore CE, Segal S, Berendt AR, Hill AVS, Day NPJ (2004) Lack of Association between Toll-like Receptor 2 Polymorphisms and Susceptibility to

- Severe Disease Caused by *Staphylococcus aureus*. Clin Diagn Lab Immunol 11(6): 1194-1197
148. Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, et al (2004) Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. J Virol 78: 13278-13284
149. Moreira RC, Lemos MF, Longui CA, Granato C (2005) Hepatitis C and Hemodialysis. Brazilian J Inf Diseases 9(3): 269-275
150. Mullis KB (1990) The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American 262(4): 56-65
151. Nadjomou J, Pybus OG, Matz B (2003) Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolated indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon. Journal of General Virology 84: 2333-2341
152. Nafeh MA, Medhat A, Mehata M, et al (2000) Hepatitis C in a community in upper Egypt: I cross-sectional survey. Am J Trop Med Hyg 63: 236-241
153. Netea MG, Van der Meer JWM, Suttmuller RP, Adema GJ, Kullberg BJ (2005) From the Th1/Th2 Paradigm towards a Toll-Like Receptor/T-Helper Bias. Antimicrob. Agents Chemother. 49(10): 3991-3996
154. Nicot F, Legrand-Abravanel F, Sandres-Saune K, Boulestin A, Dubois M, et al (2005) Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in south-western France. Journal of General Virology 86: 107-114
155. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, et al (2004) The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. Eur Respir J 23: 219-223
156. Okamoto H, Kojima M, Okada S, et al (1992) Genetic drift of hepatitis C virus during an 8,2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. Virology 190: 894-899
157. Olaby RRA, Azzazy HME (2011) Hepatitis C virus RNA assays: current and emerging technologies and their clinical applications. Expert Rev. Mol. Diagn. 1(1): 53-64
158. Op de Beeck A, Cocquevel L, Dubuisson J (2001) Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. J Gen Virol 82: 2589-2595



159. Ostojić R (2006) Hepatitis C. *Medicus* 15(1): 113-120
160. Ostojić R, Vince A, Hrštic I, Židovec Lepej S, Begovac J, Bradarić N i sur (2009) Virusni hepatitis. Hrvatska konsenzus konferencija 2009. *Acta Med Croatica* 63: 349-357
161. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, et al (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(25): 13766-13771
162. Paabo S, Higuchi RG, Wilson AC (1989) Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. *J Biol Chem* 264(17): 9709-9712
163. Packing Insert: COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> HCV Test, v2.0, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.
164. Packing insert: High Pure PCR Template Preparation Kit. Roche Diagnostics. Mannheim. Germany.
165. Packing insert: Linear Array HCV Genotyping Test. Roche Diagnostics. Mannheim. Germany.
166. Packing insert: Monolisa<sup>™</sup> Anti-HCV PLUS Version 2. Bio-Rad. Marnes-la-Coquette. France.
167. Palitzsch KD, Hottentrager B, Schlottmann K, et al (1999) Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11: 1215-1220
168. Palmović D (1995) Hepatitis C virusna (HCV) infekcija. *U: Palmović D. Virusni hepatitisi*. Zagreb: Školska knjiga, 51-78
169. Pavo N, Lai MMC (2003) The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 28(3): 287-304
170. Pavlović D, Neville DCA, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *PNAS* 100: 6104-6108
171. Pawlotsky JM, Taskiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, et al (1995) Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J. Infect. Dis.* 171: 1607-1610

172. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP (2006) The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 45: 529-538
173. Poccia F, Agrati C (2003) Intrahepatic natural immunity and HCV immunopathogenesis. *Cell Death and Differentiation* 10: S9-S12
174. Presečki V i sur. (2002) *Virologija*. Medicinska naklada Zagreb 292-295
175. Pujol FH, Ponce JG, Lema MG, et al (1996) High incidence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in units with high prevalence. *J Clin Microbiol* 34: 1633-1636
176. Pulendran Bali (2007) Tolls and Beyond – Many Roads to Vaccine Immunity. *NEJM* 356: 1776-1778
177. Purcell RH, Alter HJ, Dienstag JL (1976) Non-A, non-B hepatitis. *Yale J Biol Med* 49: 243-250
178. Qian FH, Zhang Q, Zhou LF, Jin GF et al (2010) Polymorphisms in the Toll-like Receptor 2 Subfamily and Risk of Asthma: A Case-control Analysis in a Chinese Population. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20(4): 340-346
179. Radstake TR, Franke B, Hanssen S, Netea MG, et al (2004) The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50(3): 999-1001
180. Rajendra A, Wong JB (2007) Economics of chronic hepatitis B and hepatitis C. *J Hepatol* 47: 608-617
181. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004) Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell* 118: 229-241
182. Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, et al (2007) Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *PNAS* 104(31): 12884-12889
183. Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, Hu K, Grove J, Lalor PF, et al (2008) Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* 47: 418-427

184. Rizvan P (2006) Spolne i krvlju prenosive bolesti u Županiji splitsko-dalmatinskoj u razdoblju od 1994. do 2004. godine. HČJZ 2(6):101-104
185. Roberts EA, Yeung L (2002) Maternal-infant transmission of hepatitis C-virus infection. Hepatology 36: 106-113
186. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 588-593
187. Roman F, Hawotte K, Struck D, et al (2008) Hepatitis C virus genotypes distribution and transmission risk factors in Luxembourg from 1991 to 2006. World J Gastroenterol 14(8): 1237-1243
188. Roy E, Haley N, Leclerc P, Boivin JF, et al (2001) Risk factors for hepatitis C virus infection among street youths. CMAJ 165(5): 557-560
189. Russi JC, Serra M, Vinales J, Perez MT, Ruchansky D, Alonso G, et al (2003) Sexual transmission of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1 infections among male transvestite commercial seks workers im Montevideo, Uruguay. Am J Trop Med Hyg 68(6): 716-720
190. Rychlowska M, Bienkowska-Szewczyk K (2007) Hepatitis C – new developments in the studies of the viral life cycle. Acta Biochimica Polonica 54: 703-715
191. Sagnelli E, Stroffolini T, Mele A, et al (2005) The importance of HCV on the burden of chronic liver disease in Italy: a multicenter prevalence study of 9,997 cases. J Med Virol 75: 522-527
192. Saito T, Gale M (2008) Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. J. Exp. Med. 205(7): 1523-1527
193. Sanchez E, Orozco G, Lopez-Nevot MA, Jimenez-Alonso J, Martin J (2004) Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 63(1): 54-57
194. Santantonio T, Wiegand J, Gerlach T (2008) Acute hepatitis C: Current status and remaining challenges. Hepatology 49: 625-633

195. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2(10): 947-950
196. Schröder NW, Diterich I, Zike A, Eckert J, et al (2005) Heterozygous Arg753Gln Polymorphism of Human TLR-2 Impairs Immune Activation by *Borrelia burgdorferi* and Protects from Late Stage Lyme Disease. *J. Immunol.* 175: 2534-2540
197. Schröder NW, Schumann RR (2005) Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 5(3): 156-164
198. Schwandner R, Diarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999) Peptidoglycan-and lipoteichoic Acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274(25): 17406-17409
199. Scott JD, Gretch DR (2007) Molecular Diagnostics of Hepatitis C Virus Infection. *JAMA* 297(7): 724-732
200. Seeff LB (2002) Natural History of Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 36(5): 35-46
201. Seth RB, Sun L, Chen ZJ (2006) Antiviral innate immunity pathways. *Cell Research* 16: 141-147
202. Shalhub S, Junker CE, Imahara SD, Mindrinos MN, et al (2009) Variation in the TLR4 gene influences the risk of organ failure and shock post-trauma: a cohort study. *J Trauma* 66(1): 115-123
203. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5(9): 558-567
204. Sherman M, Shafran S, Burak K et al (2007) Management of chronic hepatitis C: Consensus guidelines. *Can J Gastroenterol* 21: 25C-34C
205. Shustov AV, Konchneva GV, Sivolobova GF, Grazhdantseva AA, et al. (2005) Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Western Siberia. *J Med Virol* 77(3): 382-389
206. Simmonds P (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* 85: 3173-3188

207. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ et al (1994) A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 19: 1321-1324
208. Smuts HE, Kannemeyer J (1995) Genotyping of hepatitis C virus infection in South Africa. *J Clin Microbiol* 33: 1679-1681
209. Spengler U, Nattermann J (2007) Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrosis. *Clinical Science* 112: 141-155
210. Spitzer JH, Visintin A, Mazzoni A, Kennedy MN, Segal DM (2002) Toll-like receptor 1 inhibits Toll-like receptor 4 signaling in endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 32(4): 1182-1187
211. Strader BD, Wright T, Thomas LD, Seeff BL (2004) Diagnosis, management and treatment of hepatitis C, AASLD practice guideline. *Hepatology* 39:1147-1171
212. Sy T, Jamal MM (2006) Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int. J. Med. Sci.* 3(4): 41-46
213. Szabo G, Dolganiuc A (2005) Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology* 210: 237-247
214. Štimac D, Bradarić N, Milić S (2009) Hepatitis C – koga liječiti? *Acta Med Croatica* 63: 403-408
215. Štimac D, Luzer J, Milić S (2007) Liječenje hepatitisa C. *Medicina* 43: 143-149
216. Takada N, Takase S, Takada A, Date T (1993) Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* 17: 277-283
217. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, et al (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13: 933-940
218. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, et al (2004) Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 189: 2057-2063
219. Taradi M (2004) Pregled imunosti. *U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, i sur. Imunologija. Medicinska naklada Zagreb, 3-16*
220. Taradi M (2004) Nespecifična imunost. *U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, i sur. Imunologija. Medicinska naklada Zagreb, 197-210*

221. Tekada K, Akira S (2004) Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatological Science* 34: 73-82
222. Terrault NA (2002) Sexual Activity as a Risk Factor for Hepatitis C. *Hepatology* 36(5): 99-105
223. Thomas DL, Ray SC, Lemon SM (2005) Hepatitis C. *U: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Elsevier: Churcill Livingstone, Philadelphia, pp 1950-1976*
224. Tićac B, Rukavina T (2007) Serološka dijagnostika hepatitis C virusne infekcije – stanje u Primorsko – goranskoj županiji. *Medicina* 43: 123-131
225. Timm J, Roggendorf M (2007) Sequence diversity of hepatitis C virus: Implication for immune control and therapy. *World J Gastroenterol* 13(36): 4808-4817
226. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ (1998) National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO J* 44: 98-107
227. Tong MJ, Lai PP, Hwang SJ, Lee SY, Co RL, Chien RN, Kuo G (1995) Evaluation of sexual transmission in patients with chronic hepatitis C infection. *Clin Diagn Virol* 3(1): 39-47
228. Tran G (2008) The role of hepatitis C virus in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Bioscience Horizons* 1: 167-175
229. Underhill D, Ozinsky A, Hajjar A, Stevens S, et al (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-815
230. Väli Ü, Brandström M, Johansson M, Ellegren H (2008) Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics* 9(8): 1-8
231. Vandeli C, Renzo F, Romano L, Tisminetzky S, De Palma M, et al (2004) Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol* 99(5): 855-859

232. Vince A, Išćic-Beš J, Židovec-Lepej S, et al (2006) Distribution of hepatitis C virus genotypes in Croatia-a 10 year retrospective study of four geographic regions. *Coll Antropol* 30: 139-143
233. von Aulock S, Schröder NWJ, Traub S, Gueinzius K, Lorenz E, et al (2004) Heterozygous Toll-Like Receptor 2 Polymorphism Does Not Affect Lipoteichoic Acid-Induced Chemokine and Inflammatory Responses. *Infection and Immunity* 72(3): 1828-1831
234. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Michiko M, Zhao Z, et al (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791-796
235. Watson JP, Brind AM, Chapman CE, Bates CL, Gould FK, Johnson SJ, et al (1996) Hepatitis C virus: epidemiology and genotypes in the north east of England. *Gut* 38: 269-276
236. Weber F (2007) Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system. *World J Gastroenterology* 13(36): 4818-4823
237. Weck K (2005) Molecular methods of hepatitis C genotyping. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5(4): 507-520
238. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, et al (1991) Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180: 842-848
239. Weisbord JS, Trepka MJ, Zhang G, Smith IP, Brewer T (2003) Prevalence of and risk factors for hepatitis C virus infection among STD clinic clientele in Miami, Florida. *Sex Transm Infect* 79: 1-5
240. Weiss KH (1998) In Search of Human Variation. *Genome Res.* 8: 691-697
241. Wejstal R (1999) Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 31(1): 92-95
242. Weltzler LM (2003) The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine* 21(1): S55-60

243. World Health Organisation. Hepatitis C genotypes. Dostupno na: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index2.html#HCV>. Datum prijave: 12.05.2011.
244. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408: 111-115
245. Yalow RS (1980) Radioimmunoassay. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 327-345
246. Yoneyama M, Fujita T (2007) Function of RIG-I-like Receptors in Antiviral Innate Immunity. *J. Biol. Chemistry* 282(21): 15315-15318
247. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, et al (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral response. *Nature Immunology* 5(7): 730-737
248. Zein NN (2000) Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews* 13(2): 223-235
249. Zekry A, Whiting P, Crawford DH, Angus PW, et al (2003) Liver transplantation for HCV associated liver cirrhosis: Predictors of outcomes in a population with significant genotype 3 and 4 distribution. *Liver Transpl* 9: 339-347
250. Zhang M, Sun XD, Mark SD, Chen W, Wong L, et al (2005) Hepatitis C Virus Infection, Linxian, China. *Emerging Infectious Diseases* 11(1): 17-21
251. Zou S, Tepper M, Saadany S (2000) Prediction of hepatitis C burden in Canada. *Can J Gastroenterol* 14: 575-580
252. Zuckerman JN, Zuckerman AJ (2003) Viral hepatitis. *U: Cook GC, Zumla A (eds). Manson's tropical diseases. 21th ed. WB Saunders, Edinburgh, pp 707-723*



## 8. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Magdalena Perić

**Datum rođenja:** 07. 06. 1981.

**Mjesto rođenja:** Bjelovar

**Adresa:** Vratnička 62  
31000 Osijek

**E-mail:** magdalena0706@gmail.com

**Adresa zaposlenja:** Laboratorij za molekularnu dijagnostiku mikroorganizama

Služba za mikrobiologiju

Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Franje Krežme 1

31000 Osijek

Telefon: +385 31 225725

Fax: +385 31 206807

**Radno iskustvo:** 2006. – (do danas) Služba za mikrobiologiju,

Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

2005. – 2006. Djelatnost za laboratorijsku dijagnostiku,

Opća bolnica Pula

**Školovanje:** 2006. upisala Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu J. J. Strossmayer u Osijeku

2006. diplomirala na Fakultetu zdravstvenih studija u Sarajevu,  
Univerzitet u Sarajevu

1999. završila Opću gimnaziju u Srednjoj školi "August Šenoa" u Garešnici

1995. završila osnovno obrazovanje u Osnovnoj školi "Branko Horvat" u Garešnici

**Stručne izobrazbe:**

- Urogenitalne infekcije. Tečaj trajne edukacije, Zagreb, 2007.
- Respiratorne infekcije u dječjoj dobi: epidemiološka i klinička slika, dijagnostika, terapija i prevencija. Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja I. kategorije. Zagreb, 2007.

**Posebna znanja i vještine:**

- poznavanje engleskog i njemačkog jezika
- poznavanje rada na računalu
- vozačka dozvola B kategorije

**Znanstvene suradnje:**

- začetnica sam kliničko-znanstvenog projekta "Otkrivanje i genotipizacija hepatitis C virusa (engl., HCV - Hepatitis C Virus) iz kliničkih uzoraka Osječko-baranjske županije" nakon izdavanja rješenja o suglasnosti etičkog povjerenstva Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije dana 2009. godine, pod urudžbenim brojem Ur. broj: 1346/09
- od 17. prosinca 2008. godine aktivno sudjelujem na poslovima izolacije DNA i RNA iz *Aspergillus flavus* i reverznoj transkripciji te ekspresiji *aflS* i *aflR* gena u sklopu projekta Prehrambeno tehnološkog fakulteta u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod nazivom "Sinergističke smjese u antifungalnoj i antimikсотoksikogenoj zaštiti hrane" (113-1130473-0334)
- od 18. studenog 2008. godine aktivno sudjelujem u istraživanju Službe za školsku medicinu Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije pod nazivom "Istraživanje prevalencije klamidijske urogenitalne infekcije, genotipova *Chlamydia trachomatis* i uspješnost liječenja u populaciji studenata Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku" od izdavanja rješenja o suglasnosti etičkog povjerenstva istog Zavoda pod urudžbenim brojem ur. broj: 5172
- od 20. svibnja 2008. godine aktivno sudjelujem u istraživanju Službe za mikrobiologiju istog Zavoda pod nazivom "Otkrivanje i genotipizacija genitalnih visoko rizičnih ljudskih papiloma virusa (engl. HPV, *Human papillomavirus*) iz

kliničkih uzoraka Osječko-baranjske županije", od izdavanja rješenja o suglasnosti etičkog povjerenstva istog Zavoda pod urudžbenim brojem ur. broj: 2384/08

- od 21. ožujka 2007. godine aktivno sudjelujem u istraživanju Službe za mikrobiologiju istog Zavoda pod nazivom "Usporedba dijagnostičkih metoda otkrivanja klamidijских infekcija, uspješnost liječenja i genotipizacija *Chlamydia trachomatis* iz kliničkih uzoraka u Osječko-baranjskoj županiji" od izdavanja rješenja o suglasnosti etičkog povjerenstva istog Zavoda pod urudžbenim brojem ur. broj: 1311/07
- od ožujka 2007. godine aktivno sudjelujem pri znanstveno istraživačkom radu na poslovima sekvenciranja *omp1* gena bakterije *C. trachomatis* u svrhu određivanja serotipa, u Laboratoriju za analizu DNA pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta u Osijeku, Sveučilišta u Osijeku

#### **Znanstveni radovi zastupljeni u Current Contents-u:**

Bošnjak Z, Džijan S, Pavlinić D, **Perić M**, Ružman N, Roksandić Križan I, Lauc G, Antolović Požgain A, Burazin J, Vuković D (2012) Distribution of *Chlamydia trachomatis* serotypes in clinical urogenital samples from north-eastern Croatia. *Curr Microbiol* DOI 10.1007/s00284-012-0106-7

#### **Kongresno priopćenje u zborniku – usmena prezentacija na međunarodnom skupu:**

**Perić M.**, Vuković D., Bogdanić LJ. Antibiotška osjetljivost *Klebsiella pneumoniae* ESBL soja izolirane iz urina. 2. *Hrvatski kongres laboratorijske dijagnostike (s međunarodnim sudjelovanjem). Uloga laboratorijske dijagnostike u prevenciji, otkrivanju i liječenju bolesti*, Šibenik, Hrvatska, 8-11. svibnja 2008, *Knjiga sažetaka* 7.

**Perić M.**, Kraljik N., Antolović-Požgain A., Vuković D. Epidemiološke karakteristike obolijevanja od hepatitisa B u Osječko-baranjskoj županiji u 2006. godini. *Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem. HIV/AIDS i hepatitis, prevencija, otkrivanje i liječenje*, Osijek, Hrvatska, 1-3. prosinca 2007, *Knjiga sažetaka* 12.

**Perić M.**, Berbić-Fazlagić J., Jurić N. Uloga citodijagnostike u ranoj detekciji karcinoma dojke. *Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem. Uloga laboratorijske dijagnostike u prevenciji, otkrivanju i liječenju malignih bolesti*, Osijek, Hrvatska, 4-6. svibnja 2007, *Knjiga sažetaka* 16.

#### **Kongresni sažetak u zborniku radova:**

Bošnjak Z., **Perić M.**, Pavlinić D., Džijan S., Roksandić-Križan I., Vuković D., Ružman N., Burazin J., Lauc G., Antolović-Požgain A. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* and Human Papillomavirus in Clinical Specimens from North-Eastern Croatia. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Wiena, Austria, 2010. *Abstract book* 749.

Bošnjak Z., **Perić M.**, Pavlinić D., Džijan S., Roksandić-Križan I., Vuković D., Ružman N., Burazin J., Lauc G., Antolović-Požgain A. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* and Human Papillomavirus in Clinical Specimens from North-Eastern Croatia. *14th International Congress on Infectious Diseases (ICID)* Miami, Florida, USA, March 9-12, 2010.

**Perić M.**, Bošnjak Z., Roksandić-Križan I., Vuković D., Ružman N., Antolović-Požgain A. Genotyping of Human Papillomavirus in abnormal cervical samples from the North-Eastern Croatia. *III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*. Lisabon, Portugal, December 2-4, 2009. *Abstract book* P425.

Bošnjak Z., Džijan S., Pavlinić D., Vuković D., **Perić M.**, Ružman N., Roksandić-Križan I., Burazin J., Lauc G. Serotype Distribution of *Chlamydia trachomatis* Isolated

from clinical urogenital samples in North-Eastern Croatia. *III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*. Lisabon, Portugal, December 2-4, 2009. *Abstract book* P419.

Bošnjak Z., Vuković D., Ružman N., Roksandić-Križan I., **Perić M.**, Džijan S. Detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in clinical urogenital samples from north-eastern Croatia. *19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Helsinki, Finland, May 16 -19, 2009. *Abstract book* P1365, *session info: Molecular typing – part 2*.

Bošnjak Z., Džijan S., Pavlinić D., Vuković D., Lauc G., **Perić M.**, Roksandić-Križan I. Detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in clinical urogenital samples from North-Eastern Croatia. *50 Years of Molecular Biology in Croatia*, Zagreb, Croatia, November 20-21, 2008. *Abstract book* P-86.

Bošnjak Z., Džijan S., Pavlinić D., Bošnjak N., Vuković D., Lauc G., Kovačević J., **Perić M.**, Roksandić-Križan I. Detection and Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in Clinical Urogenital Samples from North-Eastern Croatia. *13th International Congress on Infectious Disease*, Kuala Lumpur, Malaysia, June 19-22, 2008, *Abstract book* 22.024, *session 22, Obstetrical-Gynecological, Surgical and Sexually Transmitted Infections*.

## PRILOZI

---

Informirani pristanak

Služba za mikrobiologiju  
Laboratorij za molekularnu dijagnostiku mikroorganizama  
Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije  
F. Krežme 1

U Osijeku, 3. ožujka 2009.

## **INFORMACIJE I PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE U KLINIČKO – ZNANSTVENOM ISTRŽIVANJU**

### **NAZIV KLINIČKOG ISTRAŽIVANJA:**

“Otkrivanje i genotipizacija hepatitis C virusa (engl., HCV – Hepatitis C Virus) iz kliničkih uzoraka Osječko-baranjske županije“.

U Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije (ZZJZ Osijek) pri Službi za mikrobiologiju ispitat će se prisustvo hepatitis C virusa u plazmi. Ukoliko se ispitivanjem potvrdi pozitivan nalaz na infekciju HCV-om, iz pozitivnih uzoraka izolirat će se RNA i odrediti točan genotip HCV-a u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku mikroorganizama Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije.

### **SVRHA KLINIČKOG ISTRAŽIVANJA**

Svrha navedenog istraživanja je određivanje HCV-genotipa, moguća dominacija određenog genotipa u Osječko-baranjskoj županiji, uspješnost liječenja, a u budućnosti važnost je u epidemiološkom razvoju cjepiva  
Vaše ime kao ni osobni podatci neće biti objavljeni niti u jednoj publikaciji ili izvještaju vezanom za navedeno istraživanje.

### **PRISTANAK**

Imao/la sam dovoljno vremena pročitati i razumjeti sve informacije za navedeno istraživanje.

Na sva moja pitanja jasno mi je odgovoreno.

Pristajem na anonimnost pohrane i obrade mojih podataka.

Jasno mi je da se iz navedenog istraživanja mogu povući u svakom trenutku bez bojazni o nezadovoljstvu ili na uštrb buduće zdravstvene skrbi.

Svojim potpisom i u svojoj slobodnoj volji dajem pristanak na sudjelovanje u istraživanju.

## UPITNIK KOJI ISPUNJAVA SUDIONIK U KLINIČKOM ISTRAŽIVANJU

Ime i prezime:..... Godina rođenja:..... Adresa:..... Mjesto stanovanja:..... Tel:..... Vlastoručni potpis:.....	Da li ste hemodijalizirani?  DA NE
Imate li česte bolove u mišićima i zglobovima?  DA NE	Imate li tetovažu ili body piercing?  DA NE
Da li gubite apetit (promjena tjelesne težine)?  DA NE	Da li ste intravensko koristili drogu (putem igle), čak i jednokratno?  DA NE
Da li ste u prošlosti preboljeli žuticu?  DA NE	Da li ste imali seksualni odnos bez zaštite?  DA NE
Da li ste primili transfuziju krvi ili pripravak od krvi prije 1993.g.?  DA NE	Da li ste imali operativni zahvat prije 1993.g.?  DA NE