

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Leona Radmanić

**Uloga modulatora biološkog odgovora u imunopatogenezi
kronične infekcije virusom hepatitis C**

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Leona Radmanić

**Uloga modulatora biološkog odgovora u imunopatogenezi
kronične infekcije virusom hepatitis C**

Doktorska disertacija

Doktorska disertacija predložena je Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske studije u svrhu
stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti na Poslijediplomskom interdisciplinarnom
sveučilišnom studiju Molekularne bioznanosti – modul biomedicina

Osijek, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

**Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti**

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Temeljne medicinske znanosti i Biologija

ULOGA MODULATORA BIOLOŠKOG ODGOVORA U IMUNOPATOGENEZI KRONIČNE INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA C

Disertacija je izrađena u: Odjelu za staničnu i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Snježana Židovec Lepej

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati transkriptomski profil 84 gena čiji proteinski produkti imaju važnu ulogu u imunopatogenezi fibroze jetre u kroničnom hepatitisu C (CHC). Uz to, analiziran je učinak iskorjenjivanja virusa hepatitisa C primjenom antivirusnih lijekova na ekspresiju 12 citokina i 13 čimbenika rasta koji su važni modulatori biološkog odgovora u CHC-u. Rezultati ovog istraživanja pokazali su povećanu ekspresiju gena *SMAD-6* te smanjenu ekspresiju gena *CAV-1*, *CTGF*, *ITGA-2*, *LOX*, *MMP-1* i *PLG* u CHC-u u odnosu na zdrave kontrole. Nakon izlječenja CHC-a dolazi do značajnog smanjenja koncentracije proučavnog citokina IL-6 te do povećanja koncentracije čimbenika rasta EGF, HGF i VEGF koji imaju važnu ulogu u molekularnim mehanizmima koji reguliraju imunopatogenezu fibroze jetre.

Broj stranica: 130

Broj slika: 43

Broj tablica: 18

Broj literaturnih navoda: 158

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: imunopatogeneza, citokini, čimbenici rasta, fibroza, hepatitis C

Datum obrane: 15.srpnja 2022. godine

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Zorana Grubić, predsjednica
2. Izv.prof.dr.sc. Petra Korać, član
3. Doc.dr.sc. Neven Papić, član
4. Izv.prof.dr.sc. Maja Matulić, zamjena

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Fields: Basic Medical Sciences and Biology

THE ROLE OF BIOLOGICAL RESPONSE MODULATORS IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF CHRONIC HCV INFECTION

Thesis performed at: Department of Immunological and Molecular Diagnostics, University Hospital for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

Supervisor: Assoc. Prof. Snježana Židovec- Lepej

Short abstract:

The aim of this study was to analyze the transcriptomic profile of 84 genes whose protein products play an important role in the immunopathogenesis of liver fibrosis in chronic hepatitis C (CHC). In addition, the effect of hepatitis C virus elimination using antiviral drugs on the expression of 12 cytokines and 13 growth factors that are important modulators of the biological response in CHC was analyzed. The results of this study showed increased expression of the SMAD-6 gene and decreased expression of the CAV-1, CTGF, ITGA-2, LOX, MMP-1 and PLG genes in CHC. After the cure of CHC, there is a significant decrease in the concentration of the proinflammatory cytokine IL-6 and an increase in the concentrations of growth factors EGF, HGF and VEGF, which play an important role in molecular mechanisms regulating the immunopathogenesis of liver fibrosis.

Number of pages: 130

Number of figures: 43

Number of tables: 18

Number of references: 158

Original in: Croatian

Key words: immunopathogenesis, cytokines, growth factors, fibrosis, hepatitis C

Date of the thesis defense: July 15th, 2022

Reviewers:

1. Prof. Zorana Grubić, PhD, president of the committee
2. Assoc. Prof. Petra Korać, PhD, committee member
3. Assist. Prof. Neven Papić, MD, PhD, committee member
4. Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD, substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ovaj doktorski rad izrađen je u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Snježane Židovec Lepej, u sklopu projekta Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji“, KK.01.1.1.01.0006, sufinanciranom sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj.

Zahvale

Najveće hvala želim uputiti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Snježani Židovec Lepej, koja mi je svojom velikom stručnošću, strpljivošću i razumijevanjem puno pomogla u izradi ovog rada. Također, iskreno joj zahvaljujem na susretljivosti i poklonjenom vremenu tijekom rada sa mnom.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Adriani Vince, na ukazanom povjerenju i mogućnosti da budem dio istraživačkog tima u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva.

Željela bih se zahvaliti i djelatnicima Klinike s kojima radim (Petri, Bruni, Ani, Nataši, Ivani, Ivani, Lani, Mariji, Kristianu) na razumijevanju, susretljivosti i vrlo ugodnoj radnoj atmosferi, bez kojih izrada ove disertacije ne bi bila tako lijepo i korisno iskustvo.

Također, željela bih se zahvaliti svojim prijateljima koji su mi uvijek bili povoljan vjetar u leđa (Petri, Tamari, Ivi, Kristini, Nebiju, Amaliji) i snažna potpora na mom putu.

Na kraju, želim se zahvaliti svojim roditeljima Ljiljani i Draženu, bratu Filipu, Emanuelu, teti i ostaloj obitelji na njihovoј bezuvjetnoј podršci, ljubavi i vjeri u mene koji su mi omogućili da ovu doktorsku disertaciju uspješno privедem kraju.

Na ovaj doktorat najponosniji bi bili baka i djedovi koji više nisu sa mnom, ali vjerujem da su sretni sad i tamo gore.

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Virus hepatitisa C..... | 1 |
| 1.2. Struktura viriona i genom HCV-a..... | 2 |
| 1.3. Replikacijski ciklus HCV-a..... | 5 |
| 1.4. Genotipovi HCV-a i molekularna epidemiologija infekcije u svijetu i Hrvatskoj..... | 8 |
| 1.5. Akutna i kronična infekcija HCV-om..... | 10 |
| 1.6. Mehanizmi nespecifične i specifične imunosti u infekciji HCV-om..... | 12 |
| 1.6.1. Receptori za prepoznavanje patogena..... | 12 |
| 1.6.2. Receptori TLR u infekciji HCV-om..... | 13 |
| 1.6.3. Citokini u ranoj fazi nespecifične imunosti na infekciju HCV-om..... | 15 |
| 1.6.4. Interferoni..... | 21 |
| 1.7. Proupalni i protupalni citokini..... | 22 |
| 1.7.1. Protuupalni citokin IL-10- mehanizam imunosupresivnog učinka u upali..... | 23 |
| 1.8. NK-stanice..... | 23 |
| 1.9. Specifična imunost u infekciji HCV-om..... | 24 |
| 1.9.1. CD8+ limfociti..... | 24 |
| 1.9.2. Pomoćni CD4+ limfociti..... | 24 |
| 1.10. Humoralna imunost u infekciji HCV-om..... | 27 |
| 1.11. Molekularni i stanični mehanizmi u imunopatogenezi fibroze jetre..... | 27 |
| 1.12. Uloga citokina i kemokina u imunopatogenezi fibroze jetre..... | 32 |
| 1.13. Čimbenici rasta značajni u patogenezi fibroze jetre..... | 32 |
| 1.13.1. Čimbenici rasta s profibrotičkim učinkom..... | 36 |
| 1.13.2 Čimbenik rasta s antifibrotičkim učinkom..... | 39 |
| 1.13.3. Čimbenik rasta s profibrotičkim i antifibrotičkim učinkom..... | 39 |
| 1.14. Liječenje kroničnog hepatitisa C..... | 40 |
| 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA..... | 42 |
| 2.1. Ciljevi istraživanja..... | 42 |
| 2.2. Hipoteze istraživanja..... | 42 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 43 |
| 3.1. Vrsta istraživanja..... | 43 |
| 3.2. Ispitanici..... | 43 |
| 3.3. Biološki uzorci..... | 44 |
| 3.4. METODE..... | 44 |
| 3.4.1. Određivanje koncentracija citokina i čimbenika rasta u serumu primjenom citometrije pomoću kuglica..... | 44 |
| 3.4.1.2. Priprema uzorka seruma za protočnu citometriju pomoću kuglica..... | 48 |
| 3.4.1.3. Priprema reagensa..... | 49 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.1.3.1. Priprema pufera za ispiranje..... | 49 |
| 3.4.1.3.2. Priprema otopine <i>Matrix B</i> za uzorke seruma..... | 49 |
| 3.4.1.3.3. Priprema standarda..... | 49 |
| 3.4.1.3.4. Razrjeđivanje uzorka seruma..... | 49 |
| 3.4.1.4. Postupak testiranja..... | 50 |
| 3.4.2. Izolacija RNA iz pune krvi..... | 51 |
| 3.4.3. Sinteza prvog lanca cDNA..... | 52 |
| 3.4.4. Analiza ekspresije gena jetrene fibroze metodom određivanja broja kopija lančanom reakcijom polimeraze | 53 |
| 3.4.5. Demografski, laboratorijski i klinički podatci o bolesnicima..... | 54 |
| 3.4.6. Statistička obrada podataka..... | 54 |
| 4. REZULTATI..... | 56 |
| 4.1. Transkriptomski profil ekspresije 84 gena koji su značajni u patogenezi fibroze i imunološkom odgovoru u kroničnom hepatitisu C..... | 56 |
| 4.2. Transkriptomski profil ekspresije 84 odabrana gena kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F1/F2..... | 59 |
| 4.3. Transkriptomski profil ekspresije 84 odabrana gena kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F3/F4..... | 62 |
| 4.4. Analiza koncentracija citokina i čimbenika rasta u kroničnom hepatitusu C..... | 66 |
| 4.5. Analiza stupnja fibroze kod bolesnika s kroničnim HCV-om..... | 85 |
| 4.6. Analiza genotipa virusa..... | 93 |
| 5. RASPRAVA..... | 95 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 106 |
| 7. LITERATURA..... | 107 |
| 8. POPIS KRATICA..... | 124 |
| 9. SAŽETAK..... | 127 |
| 10. SUMMARY..... | 128 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 129 |

1. UVOD

1.1. Virus hepatitisa C

Virus hepatitisa C (engl. *Hepatitis C virus*, HCV) je RNA virus koji pripada porodici *Flaviviridae* i rodu *Hepacivirus* (HCV classification, 2021). Virus je otkriven u istraživanjima prethodno nepoznatog uzročnika bolesti jetre (tzv. non-A non-B hepatitisa) kada su Choo i suradnici klonirali i sekvencirali genom HCV-a genotipa 1 iz seruma čimpanzi zaraženih u eksperimentalnim uvjetima (Choo i sur., 1989). Konsenzus sekvenca genoma HCV-a klonirana je u plazmid, a direktnom inokulacijom transkriptata RNA u jetru čimpanzi dobiven je direktni in vivo dokaz da novootkriveni virus uzrokuje hepatitis. Znanstvenici Harvey Alter, Michael Houghton i Charles Rice su za otkriće i karakterizaciju HCV-a 2020. godine dobili Nobelovu nagradu za medicinu ili fiziologiju (Ghany i sur., 2021).

Virus hepatitisa C se prenosi krvlju i krvnim pripravcima, najčešće intravenskim korištenjem opojnih droga i izradom tetovaža odnosno piercinga u nesterilnim uvjetima, dok je rizik od infekcije spolnim kontaktom s visokorizičnom osobom manji (procjenjuje se na 5-10%).

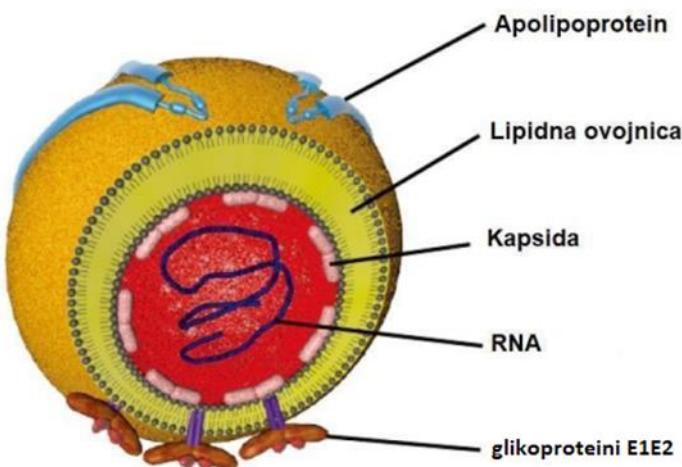
Infekcija HCV-om uzrokuje akutni i kronični hepatitis C. Za vrijeme akutne faze infekcije, efektorski mehanizmi urođene i specifične imunosti (posebno citotoksični CD8+ T-limfociti) iskorjenjuju virus u 20-50% zaraženih osoba, dok kod 50-85% osoba dolazi do kronične infekcije. Klinički simptomi tijekom akutne infekcije javljaju se u samo 20-30% zaraženih osoba tj. bolest je najčešće asimptomatska, a infekcija HCV-om u ovoj fazi najčešće ostaje neprepoznata. Procjenjuje se da se u 50-85% osoba zaraženih HCV-om razvije kronična infekcija koja u oko 10-20% bolesnika dovodi do razvoja fiboze i/ili ciroze jetre tijekom 10 do 20 godina, pri čemu se u 1-4% oboljelih može razviti hepatocelularni karcinom (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) (Vince A, 2019).

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) procjenjuje da je 2019. godine oko 58 milijuna osoba u svijetu bilo kronično zaraženo HCV-om te da je ukupno 1,1 osoba umrlo od posljedica kroničnog hepatitisa C (engl. *chronic hepatitis C*, CHC) i kroničnog hepatitisa B (WHO, 2021). U europskoj regiji WHO-a oko 14 milijuna ljudi zaraženo je HCV-om, dok godišnje od posljedica kroničnog hepatitisa umire oko 112 500 ljudi (WHO, 2019). Procjenjuje se da je u Hrvatskoj 35 000-45 000 osoba kronično zaraženo HCV-om (Papić i sur., 2018). Prevalencija infekcije HCV-om u Hrvatskoj visoka je u osoba koje injektiraju droge (engl. *people who inject drugs*, PWID) (29-65%), osoba iz zatvorskog sustava (8,3-44%), kao i u osoba koje stupaju u visokorizične seksualne odnose (4,6%), dok je u općoj populaciji (0,9%) odnosno u djece i adolescenata (0,3%) niska (Vilibić-Čavlek i sur., 2015). Papić i suradnici su u istraživanju koje je obuhvatilo 856 bolesnika s CHC-om u razdoblju od 2008. do 2018. godine pokazali da je kasno uključivanje u kliničku skrb,

posebice kod bolesnika starijih od 50 godina te započinjanje liječenja u uznapredovalom stupnju fibroze iznimno značajni izazovi u skrbi za ovu skupinu bolesnika u Hrvatskoj (Papić i sur., 2020). Liječenje infekcije HCV-om temelji se na primjeni direktno djelujućih antivirusnih lijekova (engl. *direct acting antivirals*, DAA) koji inhibiraju različite faze replikacijskog ciklusa HCV-a te omogućuju izlječenje u više od 95% zaraženih osoba (EASL recommendations on treatment of hepatitis C, 2020). Usprkos brojnim istraživanjima u području molekularne virologije HCV-a i imunopatogeneze kroničnog hepatitisa C, profilaktička odnosno terapijska cjepiva za infekciju HCV-om nisu dostupna (Duncan i sur., 2020).

1.2. Struktura viriona i genom HCV-a

Virioni HCV-a sastoje se od ikozaedrične nukleokapside koja sadrži viralnu genomsku RNA te lipidne ovojnica s usidrenim glikoproteinima E1 i E2 (Slika 1). Virioni su promjera 50-80 nm te uz viralne proteine, glikoproteine i molekule RNA sadrže i neutralne lipide poput triglicerida i estera kolesterola koji se nalazi između dva fosfolipidna sloja viralne ovojnica, kao i različite apolipoproteine (apoCIII, apoCI, apoE i apoB) koji su usidreni na vanjskom dijelu viralne ovojnica. Lipidne komponente posebno su strukturalno obilježje viriona HCV-a koje je povezano s njihovom niskom gustoćom koja je usporediva s lipoproteinima niske (engl. *low-density lipoprotein*, LDL) i vrlo niske (engl. *very-low-density lipoprotein*, VLDL) gustoće koji cirkuliraju u krvi i omogućuju transport lipida u organizmu. Pretpostavlja se da se u zaraženih osoba ugrađivanjem virusne čestice u lipoproteine formiraju lipoviročestice (tzv. model jedinstvene viralne čestice), no predložen je i tzv. model dvije virusne čestice prema kojem dolazi do povezivanja viriona i lipoproteina nekovalentnim vezama između glikoproteina E1 i E2 i apolipoproteina (posebice s molekulom apoE). Apolipoproteini imaju i važnu ulogu u izbjegavanju mehanizama humorалnog odgovora domaćina. U zaraženih osoba dokazani su i virioni vezani za imunoglobuline, kao i nukleokapside bez molekula RNA koje iskazuju različita kemijsko-fizikalna i antigenska svojstva te mogu biti vezani uz imunoglobuline što također otežava antigensko prepoznavanje i imunosni odgovor domaćina (Cosset i sur., 2020).



Slika 1. Struktura virusa hepatitisa C (HCV). Virioni HCV-a sastoje se od nukleokapside koja sadrži virusnu RNA okruženu lipidnom ovojnicom u koju su ugrađeni glikoproteini ovojnice E1 i E2. Virioni sadrže i različite apolipoproteine koji su usidreni na vanjskom dijelu viralne ovojnice. (preuzeto i prilagođeno prema: Feneant i sur., 2014)

Genom HCV-a sastoji se od jednolančane pozitivne molekule RNA koja sadrži 5' i 3' netranslatirajuće regije (engl. *untranslated region*, UTR) značajne za replikaciju virusnog genoma te kodira sintezu ne-strukturnih (engl. *non- structural proteins*, NS) i strukturnih viralnih proteina uz dva okvira čitanja tj. ORF (engl. *open reading frame*) i ARF (engl. *alternative reading frame*) (Slika 2). Translacijom nastaje poliprotein kojeg enzimi stanice domaćina i viralni enzimi cijepaju na 10 manjih funkcionalnih proteina. U strukturne proteine virusa ubrajamo kapsidni protein (engl. *core protein*, C), glikoproteine ovojnice (E1 i E2) te protein p7, dok su NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B nestrukturni viralni proteini (Chigbu i sur., 2019).

Konzervirana regija 5' UTR sastoji se od 341 nukleotida i sadrži četiri domene (I-IV). Domena I mjesto je vezanja mikroRNA molekule miRNA-122 koja je izražena u hepatocitima te ima važnu ulogu u metabolizmu lipida, homeostazi željeza, ali i u patogenezi fibroze jetre (Luna i sur., 2015). Domene II, III i IV čine interno vezno mjesto ribosoma (engl. *internal ribosome entry site*, IRES). Zbog nedostatka 5' kape, translacija proteina HCV-a započinje vezanjem ribosomske podjedinice 40S putem P-proteina za domenu III na kojoj se nalazi mjesto početka translacije (Adams i sur., 2017). Regija 3' UTR koja je važna u replikaciji virusnog genoma sastoji se od 225 nukleotida i podijeljena je u 3 regije: varijabilnu regiju, dugi poli(U)-polipirimidinski lanac te konzerviranu 3' terminalnu regiju (3' X regija) (Mayr i sur., 2019).

Nukleokapsidni protein p21 sastoji se od dvije domene: N-terminalne hidrofilne domene D1 na N' kraju i D2-terminalne hidrofobne domene na C' kraju te od ~20 aminokiselina koje imaju ulogu

signalnog peptida za glikoprotein ovojnica E1. Domena D1 mjesto je vezanja viralne RNA i sudjeluje u nuklearnoj lokalizaciji, dok je domena D2 značajna za stabilnost viralnih proteina i njihovog povezivanja s membranama lipidnih kapljica (engl. *lipid droplets*, LD) i endoplazmatskog retikuluma (ER) (Gawlik i sur., 2014).

Glikoproteini E1 i E2 nalaze se u ovojnici virusa i ključne su komponente za prepoznavanje staničnih receptora HCV-a, fuziju viralne ovojnice i stanične membrane ulazak virusa u stanicu domaćina. Ovi glikoproteini ubrajaju se u membranske proteine tipa I. Glikoprotein E1 sadrži 6 mesta vezanja, dok u E2 ima 11. Glikoprotein E2 sadrži varijabilne regije što omogućuje virusu izbjegavanje imunološkog odgovora (Steinmann i sur., 2013).

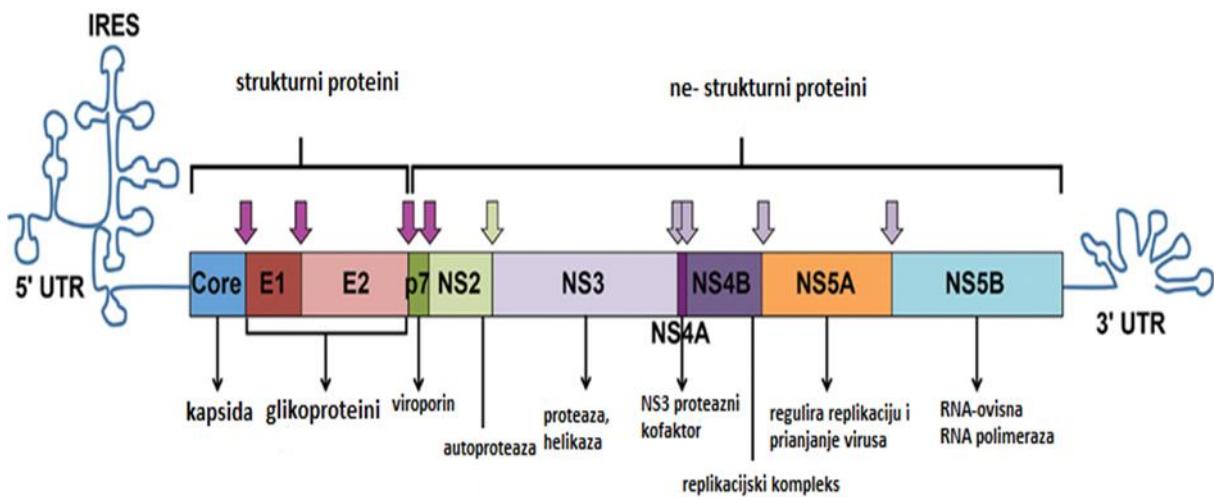
Protein p7 je viroporin koji formira ionski kanal i značajan je za infektivnost virusa. Protein se nalazi na ER-u i sudjeluje u regulaciji unutarstanične pH vrijednosti te potiče replikacijski ciklus virusa.

Protein NS2 je ne-strukturalni protein koji se sastoji od dvije transmembranske domene i C' kraja u citoplazmi za koju se veže N' kraj proteina NS3 te na taj način formira cisteinsku proteazu NS2-3. Ovaj enzim cijepa virusni poliprotein između podjedinica proteina NS2 i NS3 i stvara funkcionalne proteine neophodne za sastavljanje zrelih viriona. Sposobnost cijepanja pojačava se dodatkom cinka što ukazuje da bi cisteinska proteaza NS2-3 mogla biti metaloproteinaza (Wu i sur., 2019).

Protein NS3 ima dvojaku funkciju te djeluje kao RNA helikaza i serinska proteaza čiju aktivnost modulira protein NS4A. Oba proteina nalaze se na ER-u te cijepaju poliprotein HCV-a. Helikazna domena sudjeluje u vezanju RNA, a njezinu aktivnost regulira proteazna domena NS3 u kombinaciji s RNA-ovisnom RNA polimerazom NS5B (McGivern i sur., 2015). Protein NS4A sastoji se od 54 aminokiseline i nalazi se na membrani ER-a i mitohondrija (Dabral i sur., 2014). Sam protein ima važnu ulogu u modulaciji proteazne aktivnosti enzima NS3 te u kombinaciji s NS4A ima RNA-helikaznu aktivnost i sudjeluje u fosforilaciji proteina NS5A (McGivern i sur., 2015).

Protein NS4B je hidrofobni protein koji ima ulogu u modulaciji aktivnosti RNA-ovisne RNA polimeraze NS5B, kao i u formiranju „membranske mreže” (engl. *membranous web*) na kojima se odvija replikacija virusa (Choi i sur., 2013).

Protein NS5A je fosforilirana metaloproteinaza ovisna o cinku koja ima važnu ulogu u replikaciji virusa (Manns i sur., 2017). Protein NS5B je RNA-ovisna polimeraza RNA koja koristi lanac RNA kao kalup i sinetetizira komplementarnu RNA. Nalazi se na ER-u i ima ključnu ulogu u formiranju replikacijskog kompleksa HCV-a.



Slika 2. Genom virusa hepatitisa C. Genom HCV-a se sastoji od otvorenog okvira čitanja (ORF) okruženog 5' i 3' ne-translatiranim regijama (UTR). Prevođenje ORF-a posredovano IRES-om dovodi do stvaranja poliproteina koji se procesira u 10 virusnih proteina. Cijepanje proteina jezgre iz E1 uključuje stanične signalne peptidaze, koje također cijepaju E1, E2 i p7 od poliproteina. Proteaza NS2-NS3 se automatski cijepa. Proteaza NS3 smještena u prvoj trećini NS3, uz pomoć svog kofaktora vezanog na membranu, NS4A, cijepa preostale proteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B. (engl. *internal ribosome entry site*, IRES, interno vezno mjesto ribosoma, engl. *untranslated region*, UTR, netranslatirajuća regija) (preuzeto i prilagođeno prema: Abdel-Hakeem i sur., 2014)

1.3. Replikacijski ciklus HCV-a

Prvi korak u ciklusu replikacije HCV-a je ulazak viriona u stanicu vezanjem za receptore na staničnoj membrani hepatocita putem interakcije glikoproteina E1 i E2 s glikozaminoglikanima. Takav put im omogućava interakciju s čimbenicima prihvaćanja i receptorima na površini hepatocita (Dubuisson i sur., 2014). Inicijalno prihvaćanje HCV-a za stanice temelji se na niskoafinitetnoj interakciji s lipoproteinskim receptorima niske gustoće (engl. *low density lipoprotein receptor*, LDL-R) i glikozaminoglikanima prisutnim na heparan-sulfat proteoglikanima koji mogu reagirati s apolipoproteinom E (apoE) udruženim s virionom. Osim ovih receptora, još su četiri molekule na staničnoj membrani važne za ulazak viriona HCV-a: CD81 (engl. *cluster of differentiation 81*, protein iz porodice tetraspanina, TSPAN28), čistački receptor klase B tipa 1 (engl. *scavenger-receptor class B type 1*, SRB1), kladin 1 (CLDN1) i okladin (OCLN) (Lindenbach i sur., 2014). Otkrivene su i druge molekule koje su važne za ulazak viriona HCV-a, uključujući receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), Ephrin receptor A2 i receptor kolesterola sličnog Niemann-Pick C1(NPC1L1 (engl. *Niemann-Pick C1-like 1*) (Fénéant i sur., 2014). In vivo, ulazak u stanicu odvija se u nekoliko koraka: glikoprotein E2 se veže s molekulama SR-B1 i CD81

(Pol i sur., 2019). Interakcija između CD81 i glikoproteina E2 ključna je za prvu fazu vezanja viriona za staničnu membranu, nakon čega se receptorski sklop s pričvršćenim virionom pomiče i dolazi do interakcije s proteinima CLDN1 i OCLN (Dubuisson i sur., 2014).

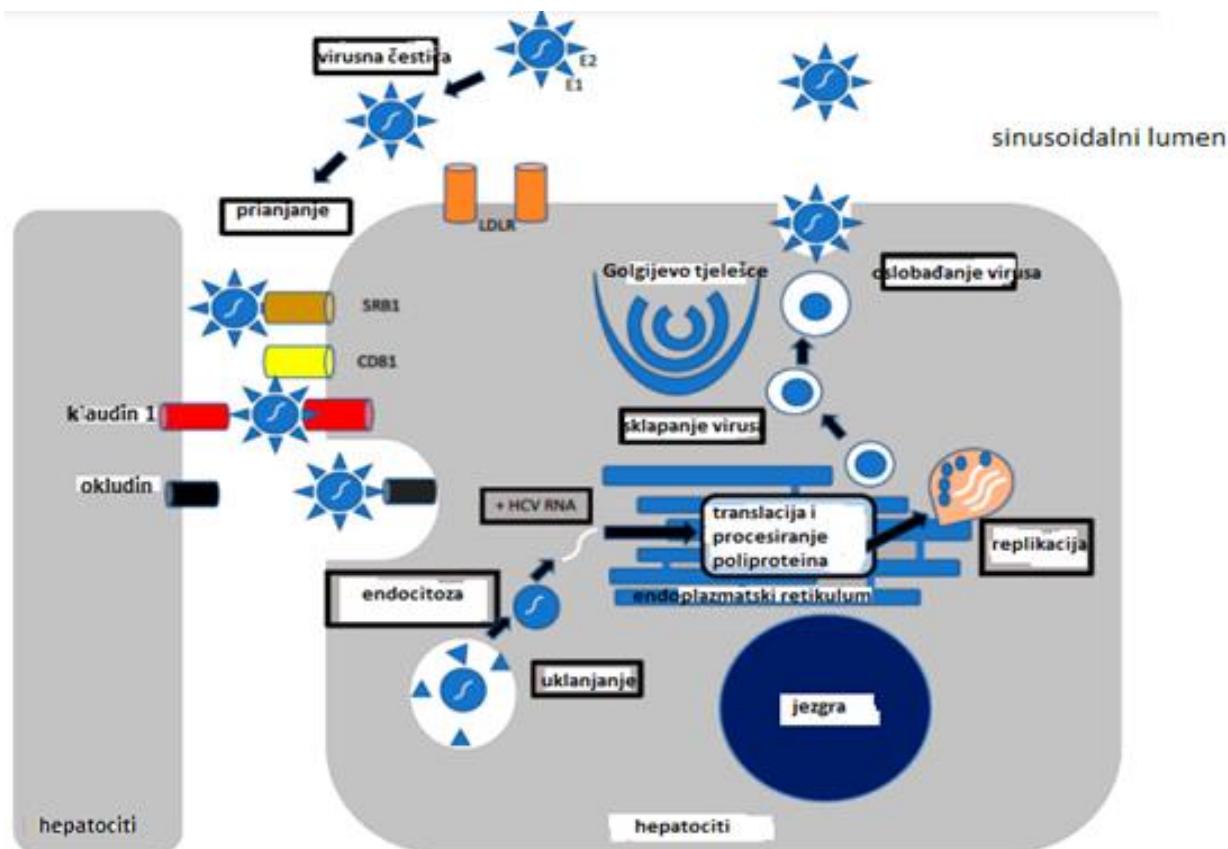
Virus hepatitisa C ulazi u stanicu endocitozom posredovanom u obliku klaritinskih vezikula povezan s CD81/CLDN1 te dolazi do fuzije s Rab5-pozitivnim endosomima (Pol i sur., 2019). Unutar endosoma, dolazi do fuzije i otpuštanja viralne RNA u citosol prilikom čega dolazi do procesa translacije poliproteina i replikacije.

Translacija RNA u poliprotein se odvija u ER-u i započinje vezanjem 5'UTR IRES na ribosom. Primarni produkt translacije, prekursorski poliprotein, sastoji se od ~3000 aminokiselina i sadrži strukturne i NS proteine HCV-a. Poliprotein se cijepa na tri strukturna proteina (protein jezgre, proteini ovojnica E1 i E2), kao i sedam NS proteina (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) važnih za replikaciju virusa uz dodatak proteina F ili proteina alternativnog okvira čitanja (engl. *alternative reading frame protein*, ARFP). Proteini NS3/4A, NS4B, NS5A i NS5B formiraju replikacijski sklop koji omogućuje umnažanje genomske RNA pri čemu ključnu ulogu ima enzim NS5B (RNA-ovisna RNA polimeraza) (Lohmann, 2013). Signalne peptidaze stanice cijepaju poliprotein između prekursora nukleokapside i E1. Dodatnim cijepanjem prekursora signalnom peptid peptidazom nastaju kapsidni proteini, E1, E2 te p7. Proteini NS2/3 i NS3/4 cijepaju ostatak poliproteina. Dobiveni kapsidni proteini tvore homodimere i spremaju se u citosolne LD za što su potrebne MAPK citosolne fosfolipaze A2, PLA2G4A i diacilglicerol acetiltransferaza. Glikoproteini E1 i E2 sintetiziraju se u nekovalentno vezane heterodimere. Proteini NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B tvore sklop na membrani ER-a koji dovodi do replikacije RNA (Slika 3) (Lindenbach i sur., 2013).

Protein NS4B dovodi do stvaranja specifične strukture pod nazivom membranska mreža. Membranska mreža smještena je uz ER te ima ulogu u replikaciji i sklapanju virusnih čestica (Neufeldt i sur., 2016).

Proces sklapanja virusnih čestica počinje interakcijom nukleokapsidnih proteina i proteina NS5A, dok protein NS2 i p7 sudjeluju u samoj organizaciji kompleksa za sastavljanje viriona i oslobađanju lipovirusnih čestica iz stanice. Kapsidni proteini transportiraju se do novonastalih čestica međudjelovanjem p7, NS2 i NS3/4A te formiraju nukleokapsidu. Formiranje virusnih čestica HCV-a sastoji se od rane i kasne faze. U ranoj fazi dolazi do tvorbe LD i povezivanja s nukleokapsidnim proteinom. Unutarstanični rezervoari kolesterola i triglicerida su LD te su okružene fosfolipidnom membranom. Nakon toga dolazi do povezivanja virusnih proteina u 3 osnovna sklopa: nukleokapsidni, sklop NS2 i replikacijski sklop. Istovremeno dolazi do njihove relokacije u blizinu LD, mjesta formiranja nukleokapsidom okružene RNA te reorganizacije membrana u povezanosti sa staničnim

čimbenicima. U kasnoj fazi, virusna čestica prolazi kroz membrane ER i GA te eksekrecijom izlazi iz stanice, koristeći VLDL sekrecijski put (Popescu i sur., 2014).

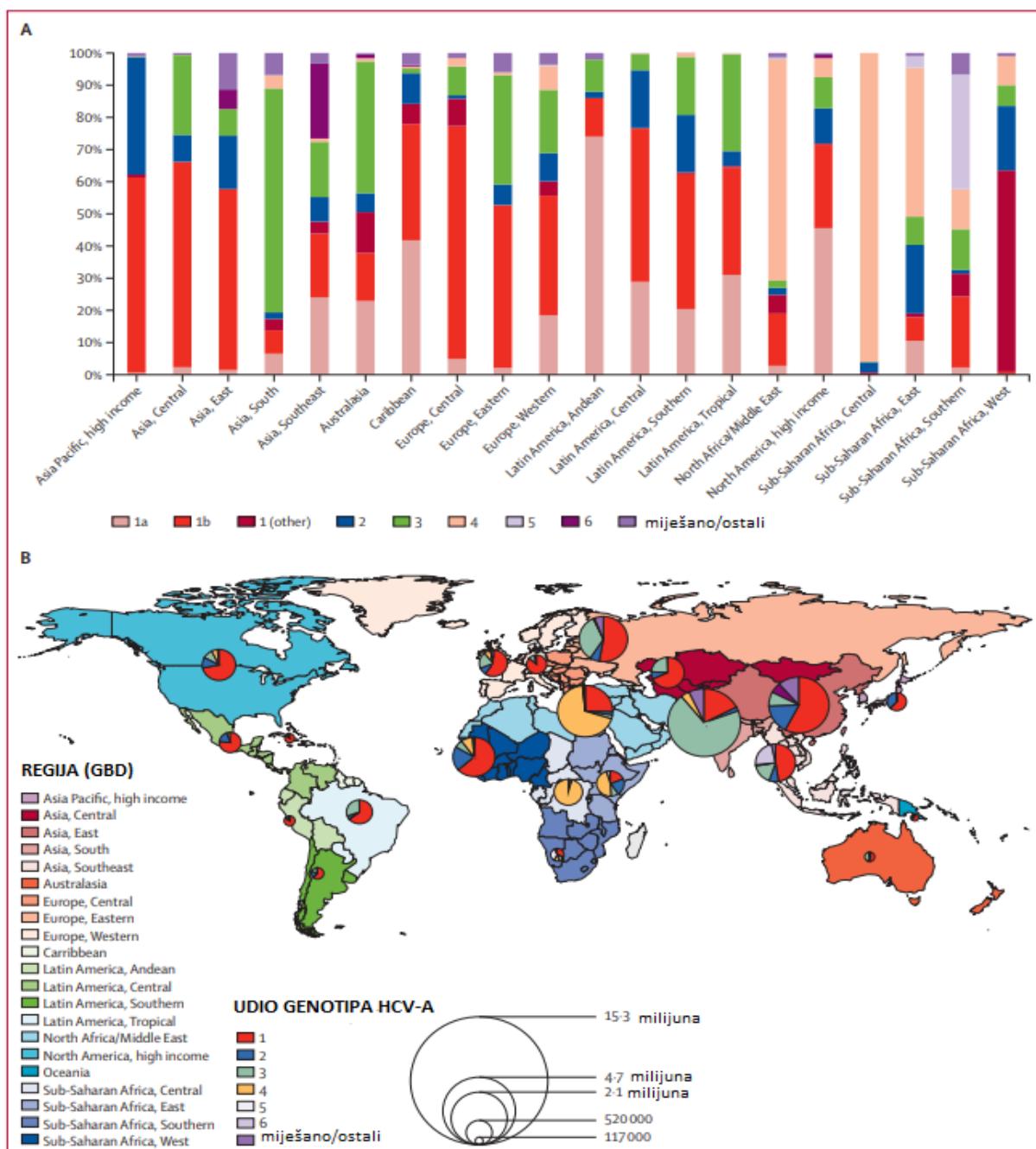


Slika 3. Replikacijski ciklus virusa hepatitis C. Virus se preko svojih glikoproteina ovojnica veže na stanične receptore domaćina kao što su kladin-1, receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR), čistački receptor klase B tipa 1 (SRB1), klaster diferencijacije (CD81) i receptor lipoproteina niske gustoće (LDLR) za pričvršćivanje i ulazak u stanice domaćina. Nakon vezivanja, ulazak HCV-a se događa putem endocitoze posredovane klatrinom. Oslobađa se u citoplazmu RNA-HCV-a. Translacija RNA-HCV-a putem unutarnjeg mesta vezanja ribosoma (IRES) na endoplazmatskom retikulumu (ER) dovodi do poliproteina koji se podvrgava procesuiranju u ne-strukturne i strukturne proteine. Nestruktturni protein NS4B inducira stvaranje membranske replikacijske mreže, gdje se replikacija virusne RNA događa djelovanjem RNA-ovisne polimeraze RNA. Pozitivni RNA genom u nastajanju koristi se za sintezu virusnih proteina, daljnju replikaciju RNA ili stvaranje novih viriona. Korištenje puteva masnih kiselina zajedno sa struktturnim proteinima dovodi do sastavljanja i oslobođanja virusa. (prilagođeno prema: Chigbu i sur., 2019)

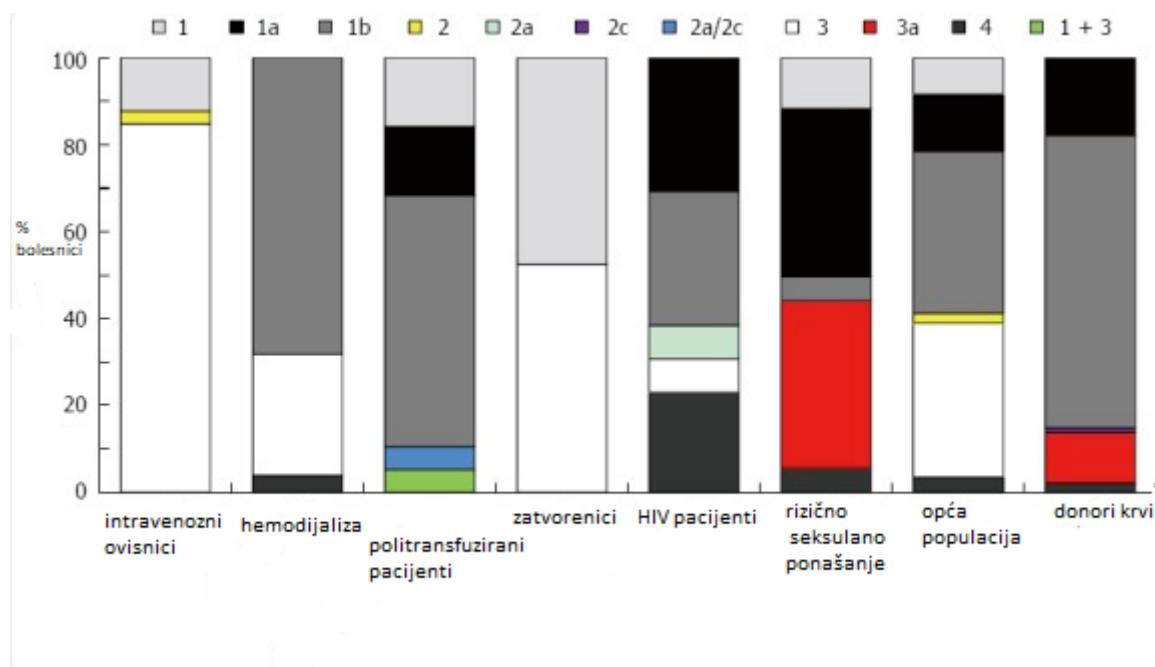
1.4. Genotipovi HCV-a i molekularna epidemiologija infekcije u svijetu i Hrvatskoj

Izolati HCV-a iz raznih dijelova svijeta pokazuju visoku genetsku raznolikost. Virus HCV se dijeli u 8 genotipova koji se razlikuju u slijedu nukleotida za 31–33%. Genotipovi se dijele u 90 podtipova koji pokazuju manju raznolikost u slijedu nukleotida (20–25%). Kriteriji za sistematizaciju novog genotipa ili podtipa su dostupnost potpune sekvene kodirajuće regije genoma koja stvara zasebnu filogenetsku skupinu, opisana je u najmanje tri izolata koji nisu epidemiološki povezani i nije nastala rekombinacijom prethodno poznatih genotipova ili podtipova (HCV classification, 2021). Genotipovi i podtipovi HCV-a određuju se sekvenciranjem gena NS5B ili standardiziranim testovima koji se temelje na kombinaciji metode lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i reverzne hibridizacije. Rezultati analize istraživanja o molekularnoj epidemiologiji infekcije HCV-om u različitim dijelovima svijesta pokazuju da je na globalnoj razini najčešći genotip 1 s udjelom oko 44%, a zatim slijede genotipovi 3 (udio 25%) i 4 (udio 15%) (Slika 4, Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017). Postoji devet rekombinanti virusa hepatitisa C od kojih je najučestalija RF2k/1b (HCV classification, 2021).

Analiza molekularne epidemiologije infekcije HCV-om u Hrvatskoj koja je obuhvatila ukupno 3,655 bolesnika s CHC-om uključenih u skrb kliničkih centara u Zagrebu i Splitu u razdoblju od 2008. do 2015. godine pokazala je da je 56,6% ispitanika zaraženo genotipom 1, a zatim slijede genotip 3 (37,3%), genotip 4 (4,2%) i genotip 2 (1,8%). Analiza raspodjele podtipova genotipa 1 u skupini od 1,488 bolesnika pokazala je veću učestalost podtipa 1b (54%) u odnosu na podtip 1a (46%). Raspodjela genotipova i podtipova HCV-a u Hrvatskoj pokazala je i određene regionalne razlike pri čemu je genotip 1 najčešći u srednjoj/sjeverozapadnoj i istočnoj Hrvatskoj dok je genotip 3 najčešći u ispitanika iz područja srednjeg i južnog dijela Jadrana (49,1%) (Vince A i sur., 2018). Zastupljenost genotipova HCV-a u Hrvatskoj razlikuje se i obzirom na rizične skupine za infekciju (Slika 5), pri čemu se ističe visoka zastupljenost genotipa 3 u PWID (Vilibić-Čavlek i sur., 2015).



Slika 4. Raspodjela genotipova virusa hepatitisa C u svijetu po regiji GBD (A) i genotipu HCV-a i ukupnom broju zaraženih po regiji GBD(B). (engl. *Global Burden of Disease*, globalno opterećenje bolešću, GBD) (preuzeto i prilagođeno prema: Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017)



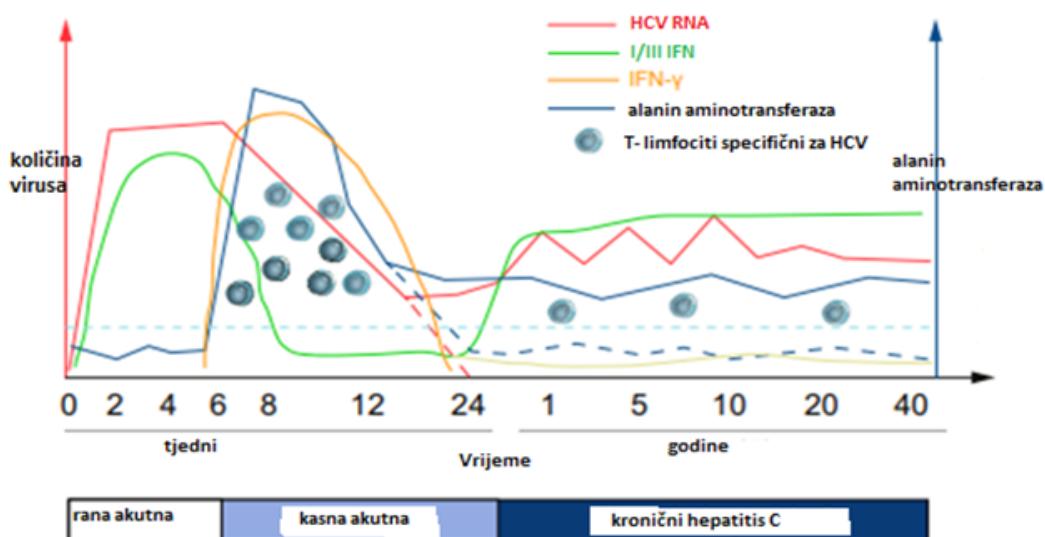
Slika 5. Raspodjela genotipova virusa hepatitisa C u rizičnim skupinama u Hrvatskoj. (preuzeto i prilagođeno prema: Vilibić-Čavlek i sur., 2015)

1.5. Akutna i kronična infekcija HCV-om

Akutna infekcija HCV-om najčešće je asimptomatska, u 20-30% bolesnika može uzrokovati slabost, mučninu i bol, praćenu tamnom mokraćom i žuticom, pri čemu su klinički simptomi slični onima u infekciji drugim virusima hepatitisa. Replikacija HCV-a u zaraženih osoba dokazuje se određivanjem broja kopija RNA HCV-a u serumu zaražene osobe metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u stvarnom vremenu s reverznom transkripcijom s granicom detekcije ≥ 15 internacionalnih jedinica po ml (EASL recommendations on treatment of hepatitis C, 2020). Vremensko razdoblje akutne infekcije definirano je kao prvih 6 mjeseci od infekcije HCV-om. Tijekom akutne infekcije, RNA HCV-a može se otkriti najčešće nakon 10 dana od infekcije uz povećane koncentracije enzima alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST) i kod nekih bolesnika bilirubina (Slika 6) (Kasper i sur., 2017).

U razdoblju od 6 mjeseci nakon infekcije, efektorski mehanizmi urođene i specifične imunosti uklanjaju infekciju u 20-50% bolesnika koji se najčešće u potpunosti oporave. Iskorjenjivanje virusa također se dokazuje primjenom metoda molekularne dijagnostike. Kronična infekcija HCV-om nastaje u oko 50% do 85% zaraženih osoba. Replikacija HCV-a u hepatocitima te upalna reakcija imunosnog sustava na infekciju tijekom kronične infekcije aktiviraju brojne mehanizme koji dovode do nastanka fibroze, ciroze te u konačnici mogućnosti nastanka HCC-a, kao komplikacija kroničnog

hepatitisa C. U dijagnostičkim se postupcima kronična infekcija dokazuje mjerljivom viremijom u serumu 6 mjeseci od zaraze ili nakon prvog dokaza virusne replikacije (Sung i sur., 2014). Viremija u serumu ne korelira s opsegom oštećenja jetre. Kronična infekcija HCV-om povezana je i s metaboličkim poremećajima poput inzulinske otpornosti, nastanka šećerne bolesti tipa 2 i steatoze jetre. Potrebno je istaknuti da postoje dokazi o povezanosti genotipa virusa (genotip 3) i pojave steatoze jetre. Povećana učestalost steatoze kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C uzrokovanim genotipom 3 ukazuje na određene posebnosti imunopatogeneze ove bolesti obzirom na genotip HCV-a (Kasper i sur., 2017). Virološki čimbenici koji su povezani s povećanim rizikom od nastanka kronične infekcije su povećana genetska raznolikost virusa u kvazispecijesu oboljele osobe koja je uvjetovana greškama RNA polimeraze (10-3 stopa mutacije), strukturalna obilježja viriona poput vezanja na lipoproteine koja onemogućuju učinkovitu humoralnu imunosnu reakciju na virus te replikacija virusa unutar zatvorene mreže ER-a koji također onemogućuje prepoznavanje infekcije i eliminaciju virusa.



Slika 6. Tijek infekcije virusom hepatitis C. U roku od nekoliko dana nakon infekcije, virusno opterećenje brzo raste (crvena linija). U ovoj ranoj fazi akutne infekcije (prvih 4-8 tjedana), urođeni imunosni odgovor potaknut IFN-om tipa I i III (zelena linija) može ograničiti replikaciju virusa. Uz nakupljanje HCV specifičnih T-limfocita u kasnoj fazi akutnog kroničnog hepatitis dolazi do ekspresije gena IFN- γ u jetri (žuta linija). Istodobno, dolazi do povećanja razina alanin aminotrasferaza (plava linija). U kasnom akutnom kroničnom hepatitisu, virusna replikacija je inhibirana, a u oko 30% bolesnika HCV se potpuno iskorjenjuje (isprekidana crvena linija) i razine alanin transaminaze se vraćaju na normalu (isprekidana plava crta). U 70% bolesnika HCV opstaje (puna crvena linija), a alanin transaminaza ostaje povišena (puna plava linija). U kroničnoj fazi

infekcije HCV-om, stanični infiltrati opstaju na nižoj razini, ali ekspresija potaknuta IFN-γ nestaje. (preuzeto i prilagođeno prema: Heim i sur., 2014)

Genetski čimbenici domaćina su važni, posebice raznolikost citokinskih gena koji kodiraju sintezu receptora NK-stanica, kao i humanih leukocitnih antigena (eng. *human leucocyte antigen*, HLA) razreda I i II. Navedeni geni imaju značajnu ulogu u tijeku infekcije HCV-om i utječu na vjerojatnost nastanka kronične infekcije. Raznolikost *KIR2DS4/KIR2DS1/KIR2DL1* rs35440472-A (engl. *killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIR) i *HLA-C* rs1130838-A povezani su s povećanom osjetljivošću na infekciju HCV-om (Shen i sur., 2021). Također, raznolikost rs12979860 i rs8099917 u genu *IFN-λ4* koji kodira sintezu interferona (IFN) lambda 4, citokina koji iskazuje snažan antivirusni učinak, povezani su s učestalosti iskorjenjivanja infekcije HCV-om tijekom akutne infekcije (Fang i sur., 2020; Attallah i sur., 2021). Uz to, određeni HLA aleli razreda I i II povezani su sa spontanom eliminacijom infekcije HCV-om. Multivarijatna logistička regresijska analiza pokazala je da je HLA alel DQB1*03:01 povezan s većom učestalosti spontane eliminacije HCV-a tijekom akutne infekcije u osoba azijskog porijekla, neovisno o dobi, spolu i genotipu virusa (Huang i sur., 2019). U osoba evropskog porijekla, Ursu i suradnici su dokazali povećanu učestalost alela HLA-A*23:01, HLA-B*44:02, HLA-C*04:02 i gena *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR2DS4*, *KIR3DL3* u osoba kod kojih se razvila kronična infekcije u usporedbi s osobama koje su eliminirale infekciju (Ursu i sur., 2020).

Klinički napredak i razvoj bolesti jetre povezan je s raznim predisponirajućim čimbenicima od kojih su najznačajniji visoka životna dob, koinfekcija virusom HIV-1 (engl. *human immunodeficiency virus type I*) i/ili virusom HBV (engl. *hepatitis B virus*), prekomjerno konzumiranje alkohola, steatoza jetre, hemokromatoza, menopauza, genotip virusa i viremija (Vince, 2019).

1.6. Mehanizmi nespecifične i specifične imunosti u infekciji HCV-om

1.6.1. Receptori za prepoznavanje patogena

Nespecifična (urođena) imunosna reakcija započinje prepoznavanjem nukleinskih kiselina, proteina i glikoproteina patogena putem receptora za prepoznavanje molekularnih struktura (eng. *pattern recognition receptors*, PRR). Receptori nespecifičnog imunosnog sustava sistematiziraju se u nekoliko skupina: receptore slične proteinu Toll (engl. *Toll-like receptors*, TLR), receptore slične proteinu RIG-I (engl. *Retinoic acid-inducible gene I like receptors*, RLR), receptore slične proteinu NOD (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*, NLR), lektinske receptore tipa C (engl. *C-type lectin receptors*, CLR) i receptore za molekule DNA u citosolu (engl. *cytosolic DNA sensors*, CD) (Gao i sur., 2020). U infekciji HCV-om najvažniju ulogu imaju receptori TLR.

1.6.2. Receptori TLR u infekciji HCV-om

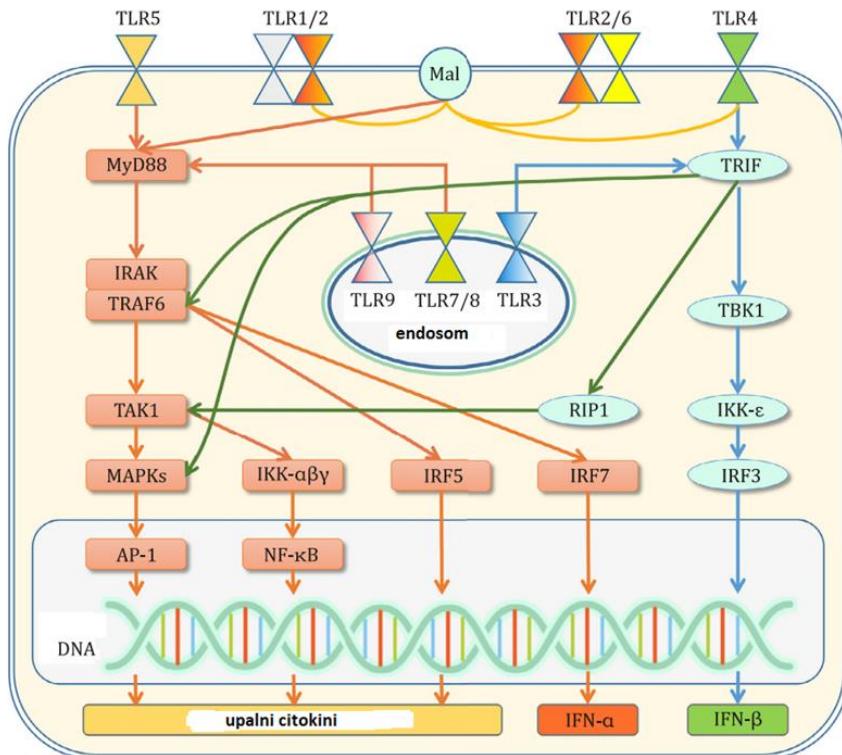
U čovjeka je otkriveno 11 receptora TLR, pri čemu su receptori TLR1-2, TLR4-5, TLR6 i TLR10 izraženi na staničnoj membrani dok su unutarstanični TLR3, TLR7 i TLR8-9 izraženi na membranama endosoma. Receptori TLR sastoje se od ektodomene s ponavljačim regijama bogatim leucinom koje posreduju u prepoznavanju molekularnih obrazaca patogena (eng. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) ili molekularnih obrazac povezanih s oštećenjem staničnih molekula (eng. *damage-associated molecules patterns*, DAMP) transmembranske domene i citoplazmatske Toll/IL-1 receptorske domene (TIR) koja aktivira prijenos signala s receptora u jezgru stanice. Receptori TLR vežu molekule PAMP ili DAMP u obliku homo- ili heterodimera te aktiviraju adapterske proteine poput čimbenika diferencijacije mijeloidnih stanica (MyD88) i molekule TRIF (engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*), koji pokreću prijenos signala u jezgru i aktiviraju molekule iz skupine aktivatora transkripcije staničnih gena poput NF-κB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), IRF (engl. *interferon regulatory factors 3 i 7*, IRF-3, IRF-7) ili/i kinaze MAP (engl. *mitogen-activated protein kinase*). Na taj način, TLR reguliraju ekspresiju gena koji kodiraju sintezu IFN klase I, II i III, prouparnih, imunoregulacijskih te protuupalnih citokina koji omogućuju započinjanje nespecifične imunosne reakcije na određeni patogen (Slika 7).

Aktivacija receptora TLR1/2/6 potiče sintezu prouparnih citokina poput čimbenika nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF-α), interleukina-6 (IL-6), IL-8 i protuupalnog citokina IL-10. Nakon aktivacije receptora TLR3 sintetizira se IFN-β, dok nakon aktivacije receptora TLR4 dolazi do sinteze imunoregulacijskog citokina IL-12, prouparnih citokina IL-1β, IL-6, IL-18, TNF-α, transformirajućeg čimbenika rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF-β), kao i IFN-γ. Nakon aktivacije receptora TLR7/8 sintetiziraju se interferoni, dok aktivacija receptora TLR9 uzrokuje sintezu TNF-α, IFN i IL-12 (Gao i sur., 2020).

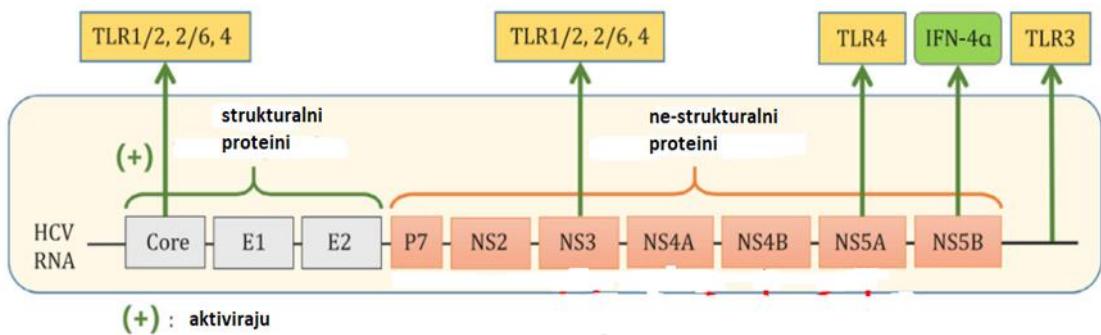
Receptori slični proteinu Toll su izraženi u hepatocitima i u različitim stanicama imunosnog sustava jetre. Biološka uloga receptora TLR u imunoreakciji na infekciju HCV-om je kompleksna i dvojaka: poticanje prepoznavanja viralne RNA i proteina te glikoproteina HCV-a koja aktivira mehanizme nespecifične i specifične imunosti s ciljem eliminacije patogena, ali i aktivaciju upalne reakcije u jetri koja ima važnu ulogu u patogenezi fibroze.

Receptori TLR prepoznaju viralne proteine, kao i viralnu nukleinsku kiselinu: TLR1/2/4/6 prepoznaju kapsidni protein i protein NS3, TLR4 prepoznaje protein NS5A dok TLR3 prepoznaje intermedijerne produkte replikacije HCV-a (Slika 8) (Gao i sur., 2020). Posebno značajnu ulogu u nespecifičnoj imunoreakciji na HCV ima TLR7 koji prepoznaje genomsku virusnu RNA. Receptor TLR-7 je izražen na membranama endosoma plazmacitoidnih dendritičnih stanica (pDC) koje su najznačajni stanični izvor IFN, dok je ekspresija ovog receptora na mijeloidnim DC inducibilna. Aktivacija DC

putem TLR7 indirektni je mehanizam kojim ovaj receptor aktivira efektorske mehanizme specifične imunosti te TLR u konačnici predstavljaju poveznicu između mehanizama nespecifične i specifične imunosti čovjeka (Du i sur., 2018).



Slika 7. Receptori slični proteinu Toll (engl. *Toll-like receptors*, TLR) i srodnii signalni putovi. Osim TLR3, nizvodni signalni putovi TLR-a mogu biti stimulirani putem MyD88, koji inducira sintezu citokina TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 i IFN- α . Neovisni signalni put MyD88 inducirani je samo s TLR3 i TLR4 i prenosi ga TRIF, koji potiče sintezu IFN- β u stanicama. Osim toga, putevi prijenosa signala ovisni o MyD88 i neovisni o MyD88 su u interakciji. Prijenosnik TRIF u neovisnom putu MyD88 aktivira NF- κ B kroz RIP1, TRAF6 ili aktivira AP-1 kroz MAPK, što na kraju dovodi do sinteze IFN- α i upalnih čimbenika te potiče napredovanje infekcije HCV-a. (preuzeto i prilagođeno prema: Gao i sur., 2020)



Slika 8. Prikaz strukturalnih i ne-strukturalnih proteina virusa hepatitisa C i njihov učinak na receptore slične proteinu Toll (engl. *Toll-like receptors*, TLR) i srodne molekule. Proteini jezgre i protein NS3 HCV-a aktiviraju urođeni imunitet putem TLR2 i TLR4. Protein NS5A veže se na TLR4 i sudjeluje u upalnom odgovoru. Intermedijarni proizvodi replikacije RNA HCV-a mogu se vezati na TLR3. Protein NS5A također inhibira put ovisan o MyD88, utječući na signalizaciju srodnih TLR-a, što može smanjiti sintezu IFN-a i upalnih citokina. Proteini NS4A, NS4B i NS5A mogu poremetiti antivirusni odgovor u kojem protein NS5B sintetizira ligand TLR3 za promicanje sinteze IFN- β . (preuzeto i prilagođeno prema: Gao i sur., 2020)

1.6.3. Citokini u ranoj fazi nespecifične imunosti na infekciju HCV-om

Citokini su glikoproteini male molekularne mase koji posreduju u međustaničnim interakcijama te potiču proliferaciju, diferencijaciju, rast ili apoptozu ciljnih stanica, reguliraju imunosni odgovor domaćina te imaju važnu ulogu u patogenezi brojnih bolesti (Boldeanu i sur., 2020). Vezanje citokina na specifične stanične receptore potiče prijenos signala putem tirozinskih kinaza (najčešće iz porodice Janus kinaza, Jak1, Jak2, Jak3 i Tyk2) i aktivatora transkripcije iz porodice STAT (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) u konačnici aktivira transkripciju gena čiji proteinski produkti mijenjaju biološka obilježja ciljne stanice (Bohmwald i sur., 2019; Morris i sur., 2018). Citokini su pleiotropne molekule koje mogu imati sinergistički, aditivni ili antagonistički učinak, a njihova uloga u imunoreakciji na infekciju HCV-om intenzivno se istražuje.

Obzirom na heterogenost ove skupine modulatora biološkog odgovora, razlikujemo nekoliko načina njihove sistematizacije. U ovom radu primjenjuje se sistematizacija citokina prema strukturi njihovih receptora, sukladno metodološkom pristupu stručnog društva International Society for Interferon and Cytokine Research. Tablica 1 prikazuje sistematizaciju citokina, njihovih receptora, kao i najvažnija biološka obilježja pojedinih citokina.

Tablica 1. Sistematizacija i odabrana biološka obilježja citokina i citokinskih receptora.

| Citokini i podjedinice | Glavni stanični izvor | JAK/STAT signalni put | Citokinski receptori | Glavne ciljne stanice i biološki učinci |
|---|--|--|------------------------|--|
| Članovi porodice citokina tipa I | | | | |
| Interleukin-2 (IL-2) | T-limfociti | Jak1, Jak2, Jak3 STAT1, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 | CD25 CD122 CD132 | T-limfociti: proliferacija i diferencijacija u izvršne i memorijске stanice, poticanje razvoja, preživljavanje; proliferacija i aktivacija NK-stanica, B-limfociti: proliferacija, sinteza protutijela |
| Interleukin-3 (IL-3) | T-limfociti | Jak1, Jak2 STAT1, STAT3, STAT5 | CD123 CD131 | poticanje sazrijevanja svih krvotvornih loza |
| Interleukin-4 (IL-4) | Th2 stanice, mastociti | Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2 STAT1, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 | CD124 CD132 | B-limfociti: promjene izotipa u IgE T-limfociti: proliferacija, diferencijacija u Th2 makrofagi: aktivacija alternativnim putem komplemenata i inhibicija klasične aktivacije mastociti: proliferacija |
| Interleukin-5 (IL-5) | Th2 stanice, urođene limfoidne stanice skupine 2 | Jak1, Jak2 STAT3, STAT5 | CD125 CD131 | eozinofili: aktivacija, pojačano stvaranje B-limfociti: proliferacija, sinteza IgA |
| Interleukin-6 (IL-6) | makrofagi, endotelne stanice, T stanice | Jak1, Jak2, Tyk2 STAT1, STAT3 | CD126 CD130 | stanice jetre: sinteza proteina akutne faze B-limfociti: proliferacija stanica koja sintetiziraju protutijela |
| Interleukin-7 (IL-7) | fibroblasti, stromalne stanice koštane srži | Jak1, Jak3 STAT1, STAT2, STAT3, STAT5, STAT6 | CD127 CD132 | nezrele limfoidne progenitorske stanice: proliferacija ranih B i T progenitorskih stanica T-limfociti: preživljavanje naivnih i memorijskih stanica |

| | | | | |
|--|---|---|-----------------------------------|--|
| Interleukin-9 (IL-9) | CD4+ T- limfociti | Jak1, Jak3,Tyk2 STAT1, STAT3, STAT5 | CD129 CD132 | mastociti, B-limfociti, T-limfociti: preživljavanje i aktivacija |
| Interleukin-11 (IL-11) | stromalne stanice koštane srži | Jak1, Jak2,Tyk2 STAT1, STAT3 | IL-11R α CD130 | stvaranje trombocita |
| Interleukin-12 (IL-12) | makrofagi, dendritične stanice | Jak2,Tyk2 STAT1, STAT3,STAT4, STAT5, STAT6 | CD212 IL-12R β 2 | T-limfociti: diferencijacija u Th1 NK- stanice: sinteza IFN- γ , pojačavanje citotoksičnosti |
| Interleukin-13 (IL-13) | Th2 stanice, NKT stanice, mastociti | Jak1, Jak2, Jak3,Tyk2 STAT1, STAT3, STAT5, STAT6 | CD213a1 CD213a2 CD132 | B-limfociti: promjene izotipa u IgE epitelne stanice: povećana sinteza sluzi fibroblasti: povećana sinteza kolagena makrofagi: aktivacija alternativnim putem komplemenata |
| Interleukin-15 (IL-15) | makrofagi, druge vrste stanica | Jak1, Jak2, Jak3,Tyk2 STAT1,STAT2, STAT3,STAT4, STAT5, STAT6 | IL-15R α CD122 CD132 | NK-stanice: proliferacija T-limfociti: preživljavanje i proliferacija memorijskih CD8+ T-limfocita |
| Interleukin-16 (IL-16) | T-limfociti, mastociti, eozinofili, epitelne stanice | SAPK | CD4 | CD4+ T-limfociti, monociti, eozinofili |
| Interleukin-17A (IL-17A) Interleukin-17F (IL-17F) | Th17 stanice, urođene limfoidne stanice skupine 3 | STAT3 | CD217 IL-17RC | endotelne stanice: povećana sinteza kemokina makrofagi: povećana sinteza kemokina i citokina epitelne stanice: sinteza GM-CSF i G- CSF |
| Interleukin-21 (IL-21) | Th2 stanice, Th17 stanice, Tfh stanice | Jak1, Jak3 STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 | CD360 CD132 | B-limfociti: aktivacija, proliferacija, diferencijacija Tfh stanice: razvoj Th17 stanice: pojačano stvaranje NK-stanice: funkcionalno sazrijevanje |

| | | | | |
|--|--|---|--------------------------|---|
| Interleukin-23 (IL-23) | makrofagi, dendritične stanice | Jak2,Tyk2 STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 | IL-23R CD212 | T-limfociti: diferencijacija i povećanje broja Th17 citokina |
| Interleukin-25 (IL-25) | makrofagi, mastociti, eozinofili, STAT5 mukozne epitelne stanice | | IL-17RB | T- limfociti i druge vrste stanice: ekspresija IL-4, IL-5, IL-13 |
| Interleukin-27 (IL-27) | makrofagi, dendritične stanice | Jak1,Jak2,Tyk2 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 | IL-27R α CD130 | T-limfociti: inhibicija ekspresije Th1 stanica |
| Interleukin-31 (IL-31) | Th2 stanice | Jak1,Jak2 STAT1, STAT3, STAT5 | IL-31RA OSMR CD130 | aktivacija staničnog imuniteta protiv patogena |
| Čimbenik matičnih stanica (c-Kit ligand) | stromalne stanice koštane srži | Jak2 STAT1, STAT3, STAT5 | CD117 | pluripotentne krvotvorne matične stanice: poticanje sazrijevanja svih hepatopoetskih loza |

Članovi porodice citokina tipa II

| | | | | |
|------------------------|---|---|-------------------------|--|
| Interferon- α | plazmacitoidne dendritične stanice,makrofagi | Jak1,Jak2,Tyk2 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 | IFNAR1 CD118 | sve stanice: antivirusni odgovor NK-stanice: aktivacija |
| Interferon- β | fibroblasti, plazmacitoidne dendritične stanice | Jak1,Jak2,Tyk2 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 | IFNAR1 CD118 | sve stanice: antivirusni odgovor NK-stanice: aktivacija |
| Interferon- γ | Th1 stanice, NK-stanice | Jak1,Jak2,Tyk2 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 | CD119 IFNGF2 | makrofagi: klasična aktivacija B-limfociti: prekapčanje izotipa T-limfociti: diferencijacija Th1 razne stanice: predočanje antigena T-stanicama |
| Interleukin-10 (IL-10) | makrofagi, T-limfociti | Jak1,Jak2,Tyk2 STAT1, STAT2, STAT3 | CD210 IL-10R β | makrofagi, dendritičke stanice: inhibicija ekspresije IL-12, kostimulacijskih molekula i MHC |

| | | | | |
|--|--------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| Interleukin-19 (IL-19) | makrofagi | Jak1,Jak2, Tyk2 STAT1, STAT3, STAT5 | IL-20R α IL-10R β | makrofagi: potiče sintezu IL-1 i TNF |
| Interleukin-22 (IL-22) | Th17 stanice | Jak1, Tyk2 STAT1, STAT3, STAT5 | IL22R1 α IL-10R β | epitelne stanice: sinteza defenzina hepatociti: preživljavanje |
| Interleukin-26 (IL-26) | T-limfociti, monociti | STAT1, STAT3 | IL-20R1 IL-10R2 | poticanje sinteze proupalnih citokina i stvaranje Th17 stanica |
| Interferon tipa III | dendritične stanice | Jak1,Tyk2 STAT1,STAT2 | IFNLRN1 CD210B | epitelne stanice: antivirusni odgovor |
| Čimbenik inhibicije leukemije (LIF) | stromalne stanice koštane srži | Jak1,Jak2 STAT1, STAT3, STAT5 | CD118 CD130 | matične stanice: sprječavanje diferencijacije |
| Onkostatin M | stromalne stanice koštane srži | Jak1,Jak2 STAT1, STAT3, STAT5, STAT6 | OSMR CD130 | endotelne stanice: regulacija sinteze hematopoetskih citokina tumorske stanice: sprječavanje proliferacije |

Nadporodica citokina TNF

| | | | | |
|----------------------------|---|------|--------|---|
| čimbenik tumorske nekroze | Makrofagi, NK- stanice, T- limfociti | NFkB | CD120a | endotelne stanice: aktivacija neutrofili: aktivacija hipotalamus:vrućica mišići, masno tkivo: katabolizam |
| limfotoksin- α | T-limfociti, B-limfociti | PI3K | CD120a | endotelne stanice: aktivacija neutrofili: aktivacija hipotalamus: vrućica mišići, masno tkivo: katabolizam |
| limfotoksin- $\alpha\beta$ | T-limfociti, folikularni B- limfociti, NK-stanice | PI3K | HVEM | stromalne stanice limfoidnog tkiva i folikulske dendritične stanice |
| BAFF | dendritične stanice,monociti, B-PI3K limfociti | | BAFF-R | B-limfociti: preživljavanje, proliferacija |

| | | | | |
|---|---|----------------------------|-------------------|---|
| APRIL | dendritične stanice,monociti, B-PI3K limfociti | | TACI | B-limfociti: preživljavanje, proliferacija |
| Osteoprotegrin (OPG, TNFSF11B) | osteoblasti | PI3K | RANKL | preteče osteoklasta: sprječavanje diferencijacije osteoklasta |
| Porodica citokina IL-1 | | | | |
| Interleukin-1 α (IL-1 α) | makrofagi, dendritične stanice, NF- κ B JNK,p38 fibroblasti, endotelne stanice, keratinociti, hepatociti | | CD121a IL-1RAP | endotelne stanice: aktivacija hipotalamus:vrućica jetra:sinteza proteina akutne faze |
| Interleukin-1 β (IL-1 β) | makrofagi, dendritične stanice, NF- κ B JNK,p38 fibroblasti, endotelne stanice, keratinociti, hepatociti | | CD121a IL-1RAP | endotelne stanice: aktivacija hipotalamus:vrućica jetra: sinteza proteina akutne faze |
| Antagonist receptora za interleukin-1 (IL-1Ra) | makrofagi | NF- κ B JNK,p38 | CD121a IL-1RAP | različite stanice: kompetitivni antagonist IL-1 |
| Interleukin-18 (IL-18) | monociti, makrofagi, dendritične stanice, keratinociti, Kupfferove stanice, hondrociti | NF- κ B | CD218a CD218b | NK stanice i T-limfociti: sinteza IFN- γ monociti: ekspresija GM-CSF, TNF, IL- β |
| Interleukin-33 (IL-33) | endotelne stanice, stanice glatkog mišića, keratinociti, fibroblasti | NF- κ B, MAPK, PI3K | ST2 | T-limfociti: razvoj Th2 Limfoidne stanice urođene imunosti: aktivacija limfoidnih stanica urođene imunosti skupine 2 |

*prilagođeno prema (Abbas i sur. 2018)

Kazalo: IL-11R α - citokinski receptor interleukin 11 alfa, IL-12R β 2- citokinski receptor interleukin 12 beta dva, IL-17RC- citokinski receptor interleukina 17 C, IL-23R- citokinski receptor interleukina 23, IL-17R β - citokinski receptor interleukina 17 beta, IL-27R α - citokinski receptor interleukina 27 alfa, IL-31R α - citokinski receptor interleukina 31 alfa, Nk-stanice- prirodne ubilačke stanice, IFNAR1- alfa lanac interferona alfa/beta receptora, IFNGF2- citokinski receptor interferona δ , IL-10R β - citokinski receptor interleukina 10 beta, IL-20R α -citokinski receptor interleukina 20 alfa, IL-22R α - citokinski receptor interleukina 22 alfa, IL-22R β - citokinski receptor interleukina 22 beta, IL-20R1- citokinski receptor interleukina 20 alfa, IL-20R2- citokinski receptor interleukina 20 beta, IFNLRN1 – citokinski receptor interferona tipa III, OSMR- citokinski receptor onkostatina M, HVEM- citokinski receptor limfotoksins- $\alpha\beta$, BAFF-citokinski B-stanični aktivacijski receptorski čimbenik, APRIL-proliferirajući inducirajući ligand,TACI- tumorski receptorski faktor nekroze superfobiteljski član 13B, RANKL- aktivator receptora nuklearnog čimbenika kapa beta liganda, ST2- citokinski receptor obitelji IL-1, IL-1RAP-interleukin 1 receptorski protein, PI3K- fosfoinozid 3-kinaza,MAPK- mitogenom aktivirana protein kinaza, NF- κ B - nuklearni faktor kapa aktiviranih B stanica, JNK-c-Jun N-terminalna kinaza, Tyk2-tirozin kinaza 2, Jak1,Jak2,Jak3-janus kinaza 1,2,3, STAT1,STAT2, STAT3,STAT4,STAT5,STAT6- transduktor signala i aktivator transkripcije 1,2,3,4,5,6

Prepoznavanje PAMP HCV-a putem receptora nespecifične imunosti potiče sintezu antivirusnih citokina (IFN klase I, II i III), proučalnih citokina (IL-6, IL-1 β , IL-18 i TNF- α), kemokina IL-8, protuupalnog citokina IL-10, imunoregulacijskog citokina IL-12 koji imaju važnu ulogu u nespecifičnoj imunoreakciji na HCV i razvoju upale, kao i aktivaciju mehanizama stanične imunosti (Gao i sur., 2020).

1.6.4. Interferoni

Interferoni su citokini koji iskazuju antivirusni, antiproliferacijski i imunomodulacijski učinak. Interferoni razreda I dijele se na IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- ω , IFN- κ , IFN- δ , IFN- τ i IFN- ζ . Citokin IFN- α ima 12 podtipova koji se nalaze na kromosomu 9 (Li i sur., 2018). Interferon razreda II je IFN- γ , dok se u IFN razreda III ili IFN- λ ubrajaju IFN- $\lambda 1$, - $\lambda 2$, - $\lambda 3$ i - $\lambda 4$. Receptori IFN razreda I su IFN- α/β R1 i IFN- α/β R2, dok su receptori razreda II IFN- γ R1/CD119 i IFN- γ R2. Interferoni ovise o JAK/STAT signalnom putu, tj. o transkripcijskim čimbenicima Jak1, Jak2, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 i STAT6.

Interferoni razreda I i razreda II iskazuju antivirusni učinak putem aktivacije brojnih interferonom-potaknutih gena (eng. *interferon-stimulated genes*, ISG) čiji proteinski produkti inhibiraju virusnu replikaciju na razini translacije i transkripcije te na taj način ograničavaju ili eliminiraju infekciju (Wieland i sur., 2014). Kao rezultat infekcije HCV-om dolazi do sinteze IFN- α i IFN- β u inficiranim hepatocitima. Interferon inducira apoptozu inficiranih hepatocita te inhibira replikaciju virusa putem dva ISG-a, protein kinaze R (PKR) i oligoadenilat sintetaze (OAS). Interferon pojačava ekspresiju antiga HCV-a na površini hepatocita što čini inficirane stranice lakše vidljivima imunosnom sustavu. Viralna proteaza NS3/4A sprječava fosforilaciju transkripcijskog čimbenika IRF3, dok kapsidni protein HCV-a inhibira ekspresiju ISGF3 (engl. *IFN-stimulated gene factor 3*). Virusna polimeraza NS5A inhibira aktivaciju PKR i 2'5' oligoadenilat sintetaze. Najznačajniji stanični izvor IFN razreda I i II su pDC koje aktivira prepoznavanje viralne RNA putem TLR7 pri čemu nisu prijemljive za infekciju HCV-om (Chigbu i sur. 2019).

Imunoregulacijski citokin IFN- γ u nespecifičnoj imunosti ima značajnu ulogu u biologiji NK-stanica i regulaciji aktivnosti fagocitne funkcije mononuklearnih stanica, dok u specifičnoj imunosti ima važnu ulogu u diferencijaciji Th1 stanica specifične imunosti. Sintetiziraju ga aktivirane NK-stanice (engl. *natural killer cells*, NK-cells) i T-limfociti, a ostvaruje svoj biološki učinak vezanjem na dva receptora IFNGR1 (engl. *Interferon gamma receptor 1*) i IFNGR2.

1.7. Proupalni i protupalni citokini

Glavni način na koji se sustav urođene imunosti nosi sa zarazom i tkivnim oštećenjem je pokretanje akutne upale, što uključuje nakupljanje leukocita, plazmatskih bjelančevina i tekućine, koji se iz krvi premještaju u izvanžilno tkivno mjesto zaraze ili ozljede. Najčešći leukociti koji dolaze iz krvi na mjesto akutne upale jesu neutrofili, no s vremenom sve prisutniji postaju monociti koji se u tkivu pretvaraju u makrofage. Među plazmatskim bjelančevinama koja ulaze na mjesto upale su bjelančevine komplemenata, protutijela i bjelančevine akutne faze. Njihova doprema iz krvi na mjesto upale ovisi o reverzibilnim promjenama u tkivu zahvaćenom upalom koju potiču citokini i mali molekularni posrednici koje na podražaj s obrascima PAMP ili DAMP stvaraju one stanice koje su već prisutne u tkivu, poput mastocita, makrofaga i endotelnih stanica. Akutna upala može se razviti za nekoliko minuta i trajati danima, dok se kronična upala nastavlja na akutnu ukoliko se zaraza ne ukloni. Jedan od najranijih odgovora sustava urođene imunosti za zarazu i tkivno oštećenje je izlučivanje citokina iz tkivnih stanica. Tri najvažnija proupalna citokina urođene imunosti su TNF- α , IL-1 i IL-6. Posrednik akutnog upalnog odgovora na bakterije i druge zarazne mikroorganizme je TNF- α . Receptori za TNF članovi su velike porodice bjelančevina od kojih su mnogi uključeni u imunosne i upalne odgovore. Interleukin-1 (IL-1) također je posrednik akutnog upalnog odgovora koji ima mnoge sličnosti s TNF- α . Glavni stanični izvor za IL-1 su aktivirani mononuklearni fagociti, kao i za TNF- α . Za razliku od TNF- α , IL-1 osim makrofaga stvara velik broj neutrofila, epitelnih i endotelnih stanica. Dva su oblika molekule IL-1, IL-1 α i IL-1 β te se vežu za isti receptor koji se zove receptor interleukina-1 (IL-1R). Glavni biološki aktivni oblik koji se izlučuje je IL-1 β . Za stvaranje IL-1 potrebna su dva signala: jedan koji aktivira transkripciju gena i stvaranje prethodičnog polipeptida pro-IL-1 β i drugi koji aktivira inflamasome i potiče na proteolitičko cjepanje prethodnika te tako stvara zreli protein IL-1 β . Interleukin-6 (IL-6) je još jedan značajan citokin za akutni upalni odgovor koji se veže na receptor za IL-6 (IL-6R) te uzrokuje sintezu različitih posrednika upale u jetri, potiče stvaranje neutrofila u koštanoj srži i pospješuje diferencijaciju pomočničkih T stanica koje luče IL-17. Citokin IL-6 stvaraju mononuklearni fagociti, endotelne stanice krvnih žila i fibroblasti nakon podražavanja pomoću PAMP te u odgovoru na IL-1 i TNF. TNF i IL-1 potiču endotelne stanice na izražavanje E-selektina i povećavaju izražaj liganada za leukocitne integrine TNF i IL-1. Također, potiču različite stanice na lučenje kemokina, kao što su CXCL-1 i CCL-2, koji se vežu na receptore neutrofila i monocita te povećavaju sklonost leukocitnih integrina za njihove ligande te potiču usmjereni kretanje leukocita (Abbas i sur., 2018).

1.7.1. Protuupalni citokin IL-10- mehanizam imunosupresivnog učinka u upali

Citokin IL-10 ima imunosupresivni ili imunostimulativni učinak na različite vrste stanica te je kodiran antifibrotičnim modulatorom IL-10. Limfociti Th2, B-limfociti, monociti i makrofazi luče IL-10. Nekoliko istraživanja je pokazalo povišene serumske koncentracije IL-10 i IL-12 kod bolesnika s kroničnim infekcijom HCV-a, što je pokazivalo povezanost sa stupnjem upale ili je imalo pozitivnu statističku korelaciju s napretkom bolesti HCV-a (Sghaier i sur., 2022). Citokin IL-10 smanjuje ekspresiju Th1 citokina, antiga MHC razreda II (engl. *major histocompatibility complex*) i kostimulacijskih molekula na makrofazima te može blokirati aktivnost NF-κB i uključen je u regulaciju JAK-STAT signalnog puta (Feng i sur., 2020).

1.8. NK-stanice

Urođeno ubilačke ili NK-stanice imaju iznimno značajnu ulogu u nespecifičnoj imunoreakciji na virusu direktnim (citotoksični učinak na zaražene stanice) i indirektnim mehanizmima tj. putem sinteze citokina (poglavito IFN-γ koji aktivira i mehanizme specifične stanične imunosti) (Abbas i sur., 2018). Najznačajniji fenotipski biljezi NK-stanica su molekule CD16 i CD56. NK-stanice koje eksprimiraju manji broj molekula CD56 (tzv. CD56dim stanice) iskazuju snažnu citotoksičnu aktivnost, izražavaju veće koncentracije perforina i imaju veći repertoar receptora u usporedbi s CD56bright stanicama koje ne iskazuju snažan citotoksični učinak, no iznimno su značajne kao stanični izvor proupatnog citokina TNF-α i IFN-γ. Aktivnost NK-stanica u zdravih osoba suprimirana je interakcijom inhibicijskih receptora KIR, receptora 7NKG2A/CD94, leukocitnih inhibicijskih receptora i molekule Siglec 7 s molekulama MHC-a izraženim na zdravim stanicama. U virusnim infekcijama, NK-stanice se aktiviraju putem receptora citotoksičnosti (NKp30, NKp44 i NKp46) i DNAMI1, receptora sličnih lektinu tipa C (npr. NKG2D i NKp80) i koaktivirajućih receptora (Björkström i sur., 2022).

Infekcija HCV-om povezana je s fenotipskim i funkcionalnim promjenama NK-stanica koje dovode do promjena u frekvenciji CD56dim i CD56bright NK-stanica, promjena u staničnom fenotipu (porast ekspresije receptora NKG2A i KIR3DS1), aktivacijskom statusu, citotoksičnom potencijalu i sintezi citokina (smanjenje sinteze IFN-γ i porast sinteze IL-10) (Tomer i sur., 2020).

1.9. Specifična imunost u infekciji HCV-om

Najvažniju ulogu u specifičnoj imunoreakciji na HCV imaju citotoksično-supresorski CD8+ T-limfociti, različite funkcionalne subpopuacije CD4+ T-limfocita, kao i citokini koji reguliraju njihove biološke funkcije. U osoba kod kojih je tijekom akutne infekcije postignuto iskorjenjivanje virusa, dokazan je opsežan poliklonski odgovor CD4+ i CD5+ T-limfocita specifičnih za HCV, kao i povećana koncentracija IL-2, IFN- γ , TNF- α i IL-17A u usporedbi s osobama oboljelih od kroničnog hepatitisa C (Park i sur., 2013). Najvažniju ulogu u poticanju rasta i proliferacije T-limfocita imaju IL-2 i IL-15 koji iskazuju redundantna biološka obilježja.

1.9.1. CD8+ limfociti

Subpopulacija CD8+ T-limfocita putem specifičnih T-staničnih receptora prepoznaće antigenične epitope prezentirane u sklopu molekula MHC-a razreda I na antigen-prezentirajućim stanicama, a putem dodatnih interakcija s kostimulacijskim i adhezijskim molekulama se diferenciraju u citotoksične stanice koje potiču apoptozu virusom-zaraženih stanica.

U ranoj fazi infekcije, CD8+ T-limfociti specifični za HCV iskazuju nizak proliferativni potencijal, smanjenu sposobnost sinteze IFN- γ , smanjenu ekspresiju receptora za IL-7 (CD127), te pojačanu ekspresiju receptora PD-1 (engl. *programmed cell death protein*) što dovodi do njihove apoptoze.

Dva su glavna mehanizma povezana s neuspjehom CD8+ T-limfocita specifičnih za HCV u kontroli virusne infekcije. Mutacije u genima koji kodiraju sintezu strukturnih, ali i ne-strukturnih proteina uzrokovane pogreškama viralne polimeraze dovode do promjena strukture imunogeničnih epitopa HCV-a koje postojeći klonovi CD8+ T-limfocita ne mogu prepoznati. Ovaj mehanizam virusnog izbjegavanja imunosnog sustava naziva se virusnim bijegom (engl. *viral escape*). Promjena metaboličkih, epigenetskih i funkcionalnih obilježja CD8+ T-limfocita specifičnih za HCV, smanjenje sposobnosti sinteze IFN- γ i TNF- α , kao i povećana ekspresija molekula PD-1 i TIM-3 dovodi do gubitka njihovih efektorskih antivirusnih funkcija (Hofmann i sur., 2021). Funkcionalni kapacitet CD8+ T-limfocita specifičnih za HCV može se djelomično oporaviti primjenom protutijela koja blokiraju receptor PD-1 ili ligacijom receptora CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein*) ili TIM-3 (engl. *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*) in vitro (Fernández-Ponce i sur., 2017).

1.9.2. Pomoćnički CD4+ limfociti

Aktivacija pomoćničkih CD4+ T-limfocita temelji se na prepoznavanju antigeničnih peptida prezentiranih u sklopu molekula MHC razreda II na antigen-prezentirajućim stanicama putem specifičnih T-staničnih receptora uz dodatne kostimulacijske signale. Aktivacija CD4+ T-limfocita

preduvjet je njihove diferencijacije kod funkcionalne populacije koje se klasificiraju prema biološkim obilježjima i citokinima koje sintetiziraju Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg i Tf_h stanice (Slika 9). Citokini IL-12 i IFN- γ potiču diferencijaciju naivnih CD4+ T-limfocita u Th1 stanice aktivacijom transkripcijskih čimbenika T-bet, STAT1 i STAT4. Glavna biološka uloga Th1 stanica koje sintetiziraju IFN- γ , IL-2 i TNF- α je aktivacija stanične imunosti koja ima zaštitnu ulogu u virusnim infekcijama poput infekcije HCV-om. Interleukin-4 potiče diferencijaciju Th2 stanica koje potiču humoralni imunosni odgovor aktivacijom transkripcijskog čimbenika STAT6 i transkripcijskog čimbenika GATA-3 (engl. *GATA Binding Protein 3*). Stanice Th2 sintetiziraju IL-4, IL-5, IL-13 i IL-10 koji potiču rast i diferencijaciju B-limfocita u plazma stanice. Infekcija HCV-om najčešće je povezana s diferencijacijom u Th2 citokinski profil koji ne omogućuje zaštitu od virusnih infekcija. Prepostavlja se da vezanje kapsidnog proteina HCV-a i receptora za komplement C1 (engl. *complement component*) koji je izražen na membrani monocita/makrofaga dovodi do smanjenja sinteze imunoregulacijskog citokina IL-12 koji poticanjem sinteze IFN- γ omogućuje diferencijaciju Th1 stanica.

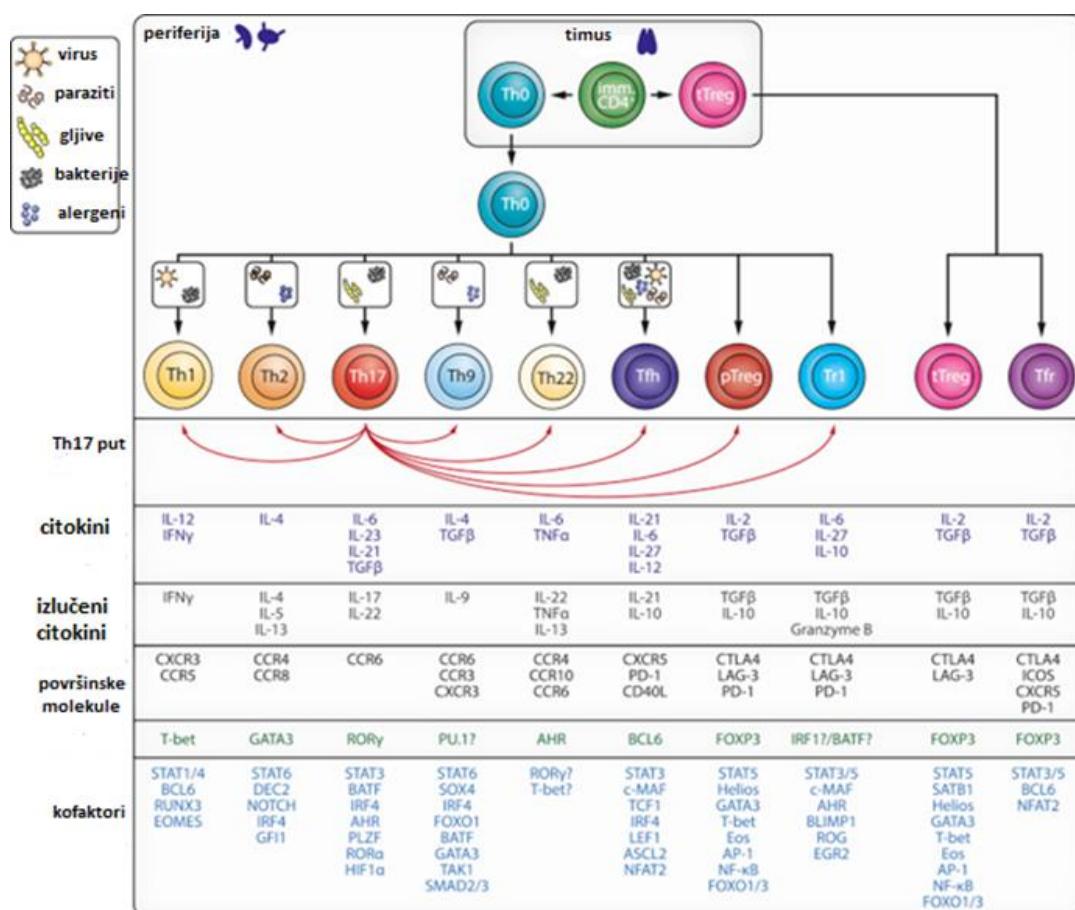
Diferencijaciju Th9 stanica potiču TGF- β i IL-4, a njihova glavna biološka uloga je da potiču nastanak upale u različitim tkivima. Efektorski citokin im je IL-9. Citokin IL-4 ovisi o JAK-STAT signalnom putu, tj. o transkripcijskim čimbenicima Jak1, Jak2, Jak3 te STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 i STAT6, dok se transkripcijski čimbenici TGF- β povezuju s receptorskим kinazama koje posreduju signalizaciju ovisno o fosforilaciji, uglavnom sa SMAD proteinima (Tzavlaki i sur., 2020).

Stanice Th17 sintetiziraju IL-17, IL-17F, IL-22 i IL-21 te imaju važnu ulogu u patogenezi infektivnih bolesti poticanjem lokalne stanične imunoreakcije, a uključeni su i u patogenezu autoimunih bolesti. Diferencijacija stanica Th17 ovisi o transkripcijskim čimbenicima ROR γ t i STAT3 uz iznimno važnu ulogu čimbenika rasta TGF- β te citokina IL-6 i IL-21. U kroničnom hepatitisu C dolazi do sinteze prouparnih citokina IL-1 β , IL-6, IL-23 i TNF- α koji potiču diferencijaciju stanica Th17 i intenzivnu sintezu Th17 citokina koji imaju značajnu ulogu u razvoju upalne reakcije u jetri te, indirektno, patogenezi fibroze.

Stanice Th22 nastaju diferencijacijom naivnih CD4+T- limfocita u prisustvu TNF- α i IL-6 te sintetiziraju IL-22 koji ima važnu ulogu u održavanju homeostaze epitela u probavnom sustavu, jetri i plućima (Slika 10) (Stadhouders i sur., 2018).

Regulacijski CD4+CD25+ T-limfociti (T-reg) imaju važnu ulogu u utišavanju T-staničnog imunosnog odgovora direktnim međustaničnim interakcijama, ali i indirektno sintezom protuupalnog citokina IL-10 (Göschl i sur., 2019). Ključni citokin koji regulira diferencijaciju i funkciju Treg je IL-2. Citokin IL-2 ovisi o JAK-STAT signalnom putu tj. o transkripcijskim čimbenicima Jak1, Jak2, Jak3 te STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 i STAT6. U infekciji HCV-om povećana aktivnost populacije Treg pridonosi smanjenju opsega funkcije CD8+ T-limfocita (Zhai i sur., 2015).

Važnu ulogu u specifičnoj humoralnoj imunosti na HCV ima subpopulacija Tfh stanica koja se najčešće nalazi unutar B-staničnih folikula (engl. *follicular B-helper cells*) sekundarnih limfoidnih organa te ima važnu ulogu u sintezi neutralizirajućih protutijela u virusnim infekcijama (Fahey i sur., 2011). Stanice Tfh sintetiziraju IL-21, IL-6, IL-27 i IL-12, dok su važni transkripcijski čimbenici BCL6 (engl. *B cell lymphoma 6*) i STAT3.



Slika 9. Diferencijacija CD4+ T-limfocita. Prikaz razvoja različitih pomoćnih (Th) podskupova, uključujući regulatorne T stanice (Treg) od nezrelih. Diferencijacija CD4+ T-limfocita u timusu. Naivne periferne Th (Th0) stanice se diferenciraju u Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 i folikularne Th (Tfh) stanice kao posljedica infekcije s indiciranim patogenima ili izloženošću alergenima. (preuzeto i prilagođeno prema: Stadhouders i sur., 2018)

1.10. Humoralna imunost u infekciji HCV-om

Humoralni imunosni odgovor određen je protutijelima specifičnim za određene antigenične epitope. Nakon prepoznavanja antiga putem B-staničnog receptora, uz pomoć kostimulacijskih signala posredovanih pomoćničkim CD4+ T-limfocitima te djelovanjem Th2 citokina dolazi do proliferacije i klonalne ekspanzije B-limfocita te njihove diferencijacije u plazma stanice koje sintetiziraju protutijela (Abbas i sur., 2011).

Protutijela specifična za HCV pojavljuju se u serumu nekoliko tjedana od infekcije HCV-om u većine zaraženih osoba. Detekcija protutijela specifičnih za HCV prvi je dijagnostički test koji se primjenjuje u postupku otkrivanja infekcije HCV-om. Biološka funkcija protutijela specifičnih za HCV je ograničena. U virusnim infekcijama, protutijela imaju važnu ulogu u obrani od vanstaničnih viriona. Međutim, obzirom na specifičnosti građe viriona HCV-a i povezanost viriona s lipoproteinima i apolipoproteinima, protutijela nisu učinkovit mehanizam zaštite od infekcije zbog otežanog prepoznavanja ciljnih antigeničnih epitopa. U dijelu zaraženih osoba ne sintetiziraju se protutijela specifična za strukturni glikoprotein E2 zbog hiperavrijabilnosti ciljne regije neutralizacijskih protutijela HVR1 (Irshad i sur., 2019). Protutijela specifična za određeni genotip HCV-a ne zaštićuju domaćina od ponovne infekcije istim genotipom odnosno drugim genotipovima virusa.

Kapsidni protein HCV-a može direktno aktivirati B-limfocite što dovodi do pojačane ekspresije aktivacijskog biljega CD69, intenzivne proliferacije B-limfocita, sinteze protutijela razreda IgM i IgG te povećane ekspresije površinskih kostimulacijskih biljega CD86 (B7-2), CD154 (CD40L) i CD195 (CCR5). Prekomjerna aktivacija B-limfocita povezana je s razvojem krioglobulinemije koja je česta kod bolesnika s CHC-om (Lauletta i sur., 2012).

1.11. Molekularni i stanični mehanizmi u imunopatogenezi fibroze jetre

Jetra je središnji organ ljudskog organizma odgovoran za homeostazu te jedini unutarnji organ koji iskazuje sposobnost regeneracije (Acharya i sur., 2021). Stanice jetre dijele se na dvije skupine, parenhimske i ne-parenhimske stanice. Parenhimske stanice jetre tj. hepatociti čine oko 60% ukupnog broja jetrenih stanica, te oko 80% ukupnog staničnog volumena jetre. Najznačajnije biološke funkcije hepatocita su biotransformacija i detoksifikacija ksenobiotika, sinteza proteina plazme, metabolički ciklusi lipida i ugljikohidrata i sinteza žući (Tanaka i sur., 2016; Zhou i sur., 2016). Jetrene sinusoide okružene su fenestriranim endotelnim stanicama koje sadrže stanice imunosnog sustava koje se nazivaju ne-parenhimskim jetrenim stanicama. Ne-parenhimske jetrene stanice čine oko 35% ukupnog broja stanica te oko 17% ukupnog staničnog volumena jetre. U ovu skupinu stanica ubrajaju se jetrene sinusoidne endotelne stanice (engl. *liver sinusoidal liver cells*, LSEC, zastupljenost

oko 44%), rezidentni makrofagi jetre ili Kupfferove stanice (zastupljenost oko 33%), zvjezdaste stanice jetre (engl. *hepatic stellate cells*, HSC, 10-25%) i jetrene NK-stanice (5%) (Acharya i sur., 2021). Stanice LSEC imaju posebno značajnu ulogu u fiziološkim procesima u jetri, kao i u urođenoj te specifičnoj lokalnoj imunosti pri čemu djeluju kao antigen-prezentirajuće stanice, potiču dijapedezu leukocita putem adhezijskih molekula i kemokina te imaju važnu ulogu u procesima fibrinogeneze i onkogeneze u jetri (Shetty i sur., 2018).

Fibrinogeneza je složen fiziološki proces zacjeljivanja oštećenog tkiva jetre tijekom kojeg se komponente vanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) izlučuju u perisinusoidne prostore (prostori Disse) kako bi izolirali oštećeni dio tkiva stvaranjem kapsule uz infiltraciju stanica imunosnog sustava te započinju procese oporavka tkiva. Molekularni mehanizmi procesa fibrinogeneze detaljno su istraženi te uključuju međustanične interakcije između hepatocita, ne-parenhimskih stanica jetre i stanica imunosnog sustava, kao i aktivaciju i modulaciju signalnih puteva modulatora biološkog odgovora.

U zdravoj jetri, ECM sadrži glikoproteine tj. fibronektin, laminin, ne-fibrogenični kolagen tipa IV i proteoglikane poput heparan sulfata. Komponente ECM-a organizirane su u matriks sličan laticama koji omogućuju održavanje strukture parenhima jetre i međustaničnu komunikaciju. Aktivacija fibrinogeneze nakon oštećenja hepatocita uzrokuje značajne promjene u kinetici sinteze komponenti ECM-a iz posebne stanične populacije miofibroblasta za šest do osam puta. Dugotrajna aktivacija puteva fibrinogeneze u jetri tijekom kroničnog hepatitisa C uzrokuje značajne promjene u sastavu ECM-a tj. do zamjene ne-fibrogeničnog kolagena tipa IV s fibrogeničnim kolagenom tipa I i II uz pojačanu sekreciju fibronektina, hijaluronske kiseline i α -aktina glatkih mišićnih stanica (Acharya i sur., 2021). Povećana sinteza i ugrađivanje kolagena tipa I u ECM u konačnici uzrokuje fiziološke promjene jetre karakteristične za fibrozu. Enzimi iz porodice matriks metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP) i kolagenaza omogućuju enzimsku razgradnju komponenata ECM-a u zdravoj jetri. U fibrotičnoj jetri miofibroblasti sintetiziraju enzime iz skupine tkivnih inhibitora metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase 1*, TIMP1) koji inhibiraju aktivnost enzima MMP i sprječavaju enzimsku razgradnju ECM-a. Tijekom kroničnog hepatitisa C i dugotrajne aktivacije fibrinogeneze postupno dolazi do vezanja kolagenskih i elastinskih vlakana u kompleksne molekularne strukture nedostupne enzimima koji razgrađuju komponente ECM-a. Tijekom fibrinogeneze dolazi i do morfoloških promjena stanica jetre od kojih su posebno značajne defenestracija endotelnih stanica i gubitak mikrovila na bazalnoj membrani hepatocita što uzrokuje otežanu izmjenu nutrijenata, metabolita i signalnih molekula između hepatocita i krvi.

Taloženje kolagena tipa I oko jetrenih režnjeva i unutar sinusoidalnih prostora u jetri mijenja strukturu organizaciju hepatocita u jetri, sprječava izmjenu nutrijenata i signalnih molekula iz krvi kroz sinusoidalne prostore do hepatocita te onemogućuje njihovu biološku funkciju. Uz to,

nakupljanje kolagena povećava mehaničku tvrdoću ECM-a koji uzrokuje vazokonstrikciju jetrenih krvnih žila (posebice jetrene portalne vene) te dovodi do portalne hipertenzije koja je povezana s klinički značajnim komplikacijama jetrene bolesti uključujući dekompenziranu cirozu (Acharya i sur., 2021). U zdravoj jetri HSC su mirujućeg fenotipa, a njihova najznačajnija biološka funkcija je pohrana vitamina A. Ključni korak u patogenezi fibroze jetre je aktivacija HSC putem solubilnih medijatora upale te njihova diferencijacija u miofibroblaste koji su najznačajniji stanični izvor komponenata ECM-a (Slika 10, Kisseleva i sur. 2021; Schuppan i sur., 2018; Zhang i sur., 2016). Rezultati eksperimentalnih modela *in vivo* pokazuju da su HSC najznačajnije profibrogenične stanice u jetri iz kojih se diferencira čak 82-96% miofibroblasta (Mederacke i sur., 2013). Ekspresija molekule α -SMA primjenjuje se kao molekularni biljeg aktivacije HSC-a, no novija istraživanja primjenom metode sekvenciranja RNA pojedinačnih stanica (engl. *single cell RNA-sequencing*, scRNA-seq) pokazala su postojanje fenotipski i funkcionalno različitih subpopulacija mirujućih HSC i aktiviranih miofibroblasta čiji doprinos profibrotičkim promjenama u jetri za sada nije poznat (Krenke i sur., 2019). Uz aktivirane HSC, i druge populacije stanica jetre mogu se diferencirati u miofibroblaste, poput endogenih portalnih fibroblasta, fibrocita, vaskularnih glatkih mišićnih stanica, fibrocita koji su se diferencirali iz stanica koštane srži, biljarnih epitelnih stanica, rezidentnih progenitorskih stanica jetre, sinusoidalnih endotelnih stanica, mezotelijalnih stanica i perivaskularnih mezenhimalnih stanica (Iwaisako i sur., 2014). Rezultati novijih istraživanja pokazuju da tijekom fibrinogeneze dolazi do diferencijacije miofibroblasta iz hepatocita u procesu tranzicije iz epitelijalnog u mezenhimalni fenotip pri čemu hepatociti postaju i stanični izvor komponenata ECM-a (He i sur., 2020). Histološki, stupnjevi fibroze određuju se prema sistematizaciji METAVIR u 5 stupnjeva, od F0 do F4 (Tablica 2). Zdrava jetra sadržava kolagensko vezivo u portalnim prostorima, oko krvnih žila i žučnih vodova te ispod Glissonove čahure. U kroničnim jetrenim bolestima dolazi do odlaganja vezivnog tkiva oštećenja i nekroze jetrenih stanica pri čemu dolazi do napretka bolesti u više stupnjeve fibroze i ciroze. Hepatocelularni karcinom najčešće nastaje kao komplikacija ciroze.

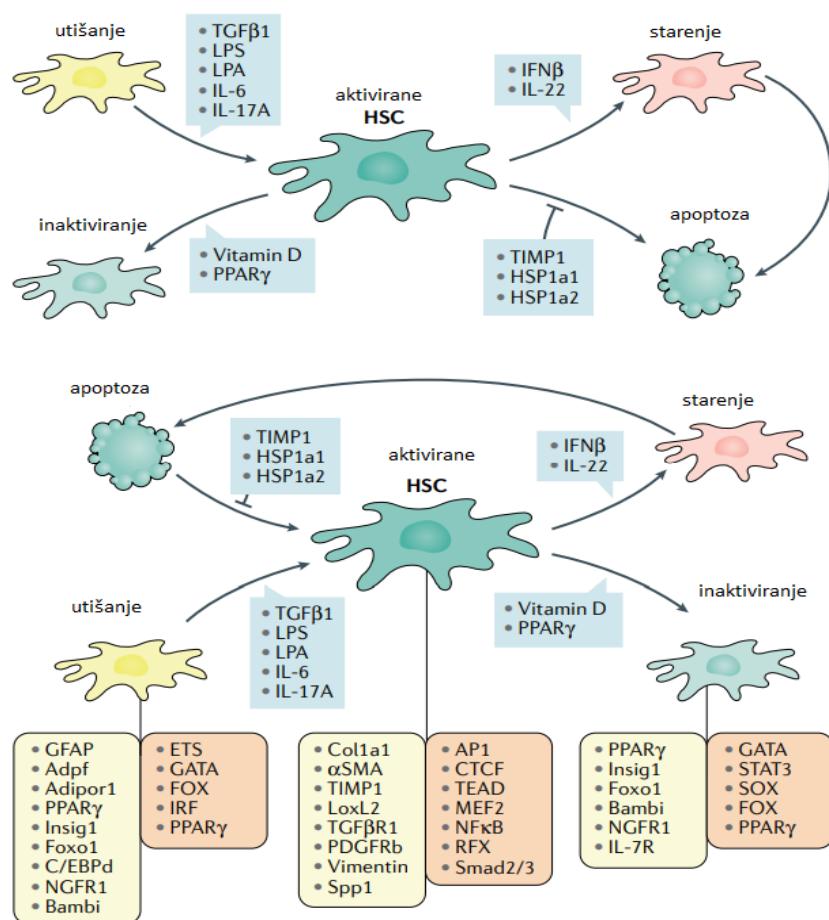
Tablica 2. Stupanj fibroze prema sistematizaciji METAVIR

| Stupanj fibroze | Opis |
|------------------------|--|
| F0 | Nema fibroze |
| F1 | Blaga fibroza-portalna fibroza bez stvaranja septa |
| F2 | Umjerena fibroza-portalna fibroza s nekoliko septa |
| F3 | Teška fibroza- mnogo septa bez ciroze |
| F4 | Ciroza |

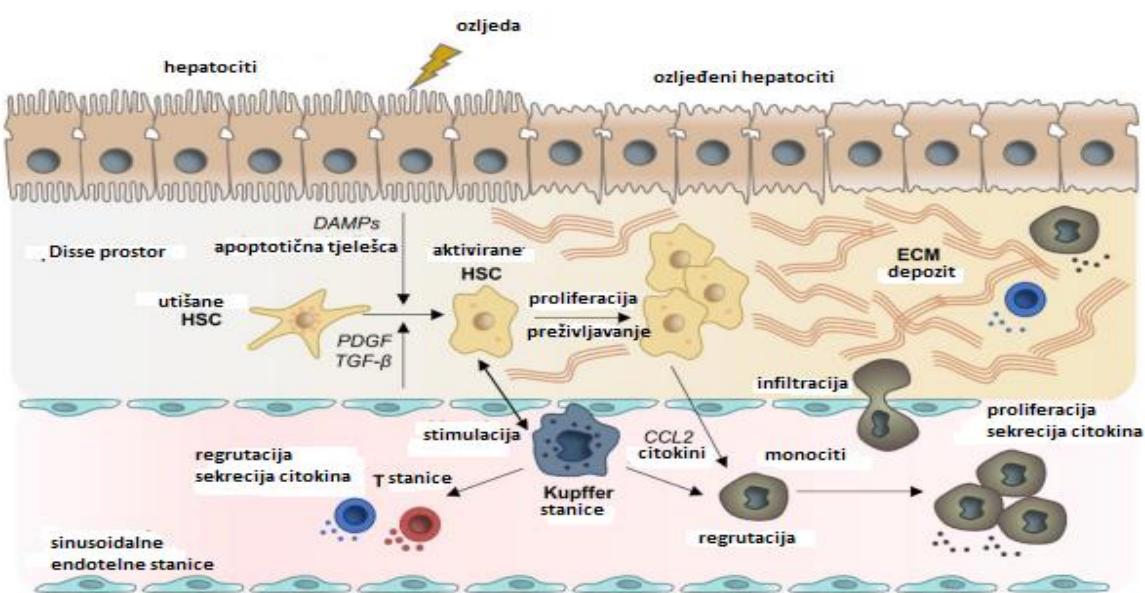
- prema Damjanov i sur. (2017)

Kazalo: METAVIR sustav bodovanja je sustav koji se koristi za procjenu opsega fibroze evaluacijom jetre u pacijenata s hepatitisom C. Stupanj predstavlja količinu fibroze ili ožiljaka.

Funkcionalni i morfološki oporavak fibrotične jetre koji je opisan nakon izlječenja kroničnog hepatitisa C, na staničnoj se razini može povezati s apoptozom miofibroblasta u jetri ili njihovom diferencijacijom u mirujući fenotip (dokazana u oko 50% populacije tih stanica). Uz smanjenje populacije miofibroblasta, značajnu ulogu u oporavku ima i povećana sinteza enzima porodice MMP-a u makrofagima koja omogućuju učinkovitu enzimsku razgradnju komponenata ECM-a. Regeneracija jetrenog tkiva posredovana je progenitorskim stanicama koje nastaju transdiferencijacijom stanica biljarnog epitela. Glavna biološka funkcija rezidentnih jetrenih progenitorskih stanica je diferencijacija u hepatocite i kolangiocite koji će omogućiti obnavljanje tkiva oštećene jetre. Istraživanja *in vitro* pokazala su i da se hepatociti mogu diferencirati u stanice slične progenitorskim jetrenim stanicama iz čega proizlazi hipoteza da su hepatociti fakultativne progenitorske jetrene stanice (Li W i sur., 2020). Molekularni mehanizmi poticanja proliferacije hepatocita tijekom procesa regeneracije jetre nisu u potpunosti istraženi, no pretpostavlja se da ih omogućuju signalni putevi koji se aktiviraju putem receptora EGFR i MET (Michalopoulos i sur., 2021).



Slika 10. Prikaz fenotipskih promjena u jetrenim zvjezdastim stanicama (engl. *hepatic stellate cells*, HSC) za vrijeme razvoja i regresije jetrene fibroze. U fiziološkim uvjetima jetrene zvjezdaste stanice (HSC) pokazuju fenotip u mirovanju, ali kao odgovor na fibrogene podražaje kao što je TGF β 1, HSC se preobražavaju u aktivirane HSC (aktivirani miofibroblasti). Nakon prestanka fibrogenih podražaja oko polovica aktiviranih HSC-a prolazi kroz apoptozu. Citokini IFN β 1 i IL-22 potiču starenje aktiviranih HSC-a. Oni aktivirani HSC koji izbjegnu apoptozu prolaze inaktivacije i dobivaju fenotip nalik mirnom. Povećana razina vitamina D i ponovna ekspresija PPAR γ u aktiviranim HSC olakšava inaktivaciju HSC. Kronična ozljeda aktivira HSC u kolagen tipa I koji producira sintezu HSC ili aktiviranih miofibroblasta. Fenotipske promjene u HSC-u regulirane su na epigenetskoj razini. (preuzeto i prilagođeno prema: Kisseleva i sur. 2021)



Slika 11. Mehanizmi nastanka jetrene fibroze. Kronična ozljeda hepatocita uzrokuje oslobođanje uzoraka povezanih s oštećenjem (DAMP) i apoptotičkih tijela koja aktiviraju jetrene zvjezdaste stanice (HSC) i nakupljaju imunosne stanice. Složene višesmjerne interakcije između aktiviranih HSC i Kupfferovih stanica, kao i urođenih imunosnih stanica, potiču trans-diferencijaciju u proliferativni i izvanstanični matriks (ECM) sintetizirajući miofibroblaste. (preuzeto i prilagođeno prema: Roehlen i sur., 2020)

Interakcija različitih parenhimskih i ne-parenhimskih stanica jetre te stanica imunosnog sustava koje migriraju u jetru tijekom kroničnog hepatitis C posredovana je modulatorima biološkog odgovora pri čemu su najbolje proučeni citokini, kemokini i čimbenici rasta koji se istražuju i kao moguće ciljne inovativnih antifibrotskih lijekova (Slika 11, Kisseleva i sur., 2021).

1.12. Uloga citokina i kemokina u imunopatogenezi fibroze jetre

Povećana sinteza proučalnih citokina i kemokina u Kupfferovim stanicama i neutrofilima bolesnika s kroničnim hepatitisom C potiče migraciju različitih stanica imunosnog sustava (makrofaga, NK-stanica i dendritičnih stanica) u jetru. Lokalna upalna reakcija može potaknuti aktivaciju i proliferaciju HSC, povećanu sintezu komponenata ECM-a te razvoj fibroze odnosno ciroze. Pri tome, HSC također sintetiziraju modulatore biološkog odgovora te utječu na migraciju stanica imunosnog sustava (Weiskirchen i sur., 2016.).

Citokin IL-4 u svojstvu Th2 citokina u kroničnom hepatitisu C potiče humoralu imunost koja ne iskazuje zaštitni učinak u kroničnoj infekciji HCV-om. Ovaj citokin iskazuje profibrotični učinak jer zajedno s enzimom MMP-2 te molekulama ROS, povećava kinetiku sinteze komponenata ECM-a u HSC. Značajnu ulogu u patogenezi fibroze ima i TNF- α koji sprječava apoptozu HSC i na taj način iskazuje profibrotički učinak. Rezultati istraživanja *in vitro* pokazuju da kokultivacija Kupferovih stanica s hepatocitoma zaraženim HCV-om potiče sintezu proučalnih citokina IL-1 β i IL-18 koji također potiču migraciju stanica imunosnog sustava u jetru te u konačnici mogu dovesti do aktivacije HSC i nastanka fibroze (Shrivastava i sur., 2013)

Citokini IL-10, IFN- α , IFN- γ iskazuju antifibrotički učinak tj. smanjuju opseg aktivacije HSC. Pretpostavlja se da biološka ravnoteža citokina koji iskazuju profibrotički i anti-fibrotički učinak u konačnici značajno određuje opseg nastanka fibroze jetre te kinetiku fibrinogeneze.

U imunopatogenezi fibroze značajnu ulogu imaju i kemokini koji svojim koncentracijskim gradijentom između tkiva i tjelesnih tekućina te putem interakcije s kemokinskim receptorima omogućuju migraciju upalnih stanica u jetru. Stanice HSC sintetiziraju kemokine CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL9 i CXCL10, kao i kemokinske receptore CXCR3, CCR5 i CCR7 (Marra i sur., 2014). Kemokine izlučuju i portalni fibroblasti koji također imaju značajnu ulogu u patogenezi fibroze povezane s kolestazom (Dranoff i sur., 2010). Prema dosadašnjim istraživanjima kemokini CCR5, CCR1 i CXCL4 imaju profibrotički učinak, dok CXCL9 i CXCR3 iskazuju antifibrotičko djelovanje (Dhar i sur., 2020). Ekspresiju kemokina u HSC reguliraju i proučalni citokini poput TNF- α (Maher i sur., 2001).

1.13. Čimbenici rasta značajni u patogenezi fibroze jetre

Čimbenici rasta imaju važnu ulogu u imunopatogenezi fibroze jetre kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C te iskazuju profibrotičke, ali i antifibrotičke učinke. Čimbenici rasta s profibrotičkim učincima su: Ang-2, EGF, EPO, FGF, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, TGF- α , TGF- β , VEGF, dok je

čimbenik rasta s antifibrotičkim učinkom SCF, a čimbenik rasta PDGF ima profibrotička i antifibrotička svojstva (Tablica 3).

Tablica 3. Odabrani čimbenici rasta i njihove funkcije.

| ČIMBENIK RASTA | RECEPTOR | SIGNALNI PUT | CILJNO TKIVO/STANICE | UČINAK |
|--|--|---|---|---|
| Angiopoetin 2 (Ang-2) | Receptor tirozin kinaze (Tie-2) | STAT3, STAT5 | stanice krvnih žila | angiogeneza, proliferacija, stanična migracija |
| Epidermni čimbenik rasta (EGF) | Receptor tirozinske kinaze koji kodira <i>c-erbB1</i> (EGFR) | Jak1, Jak2 STAT1, STAT3, STAT5 | tjelesne tekućine, trombociti | mitogeni za sva epitelna tkiva, fibroblaste, eritrocite |
| Eritropoietin (EPO) | Eritropoetski receptor (EpoR) | Jak2 STAT5 | eritroblasti | poticanje diferencijacije eritrocita u koštanoj srži |
| Čimbenik rasta fibroblasta (FGF) | Receptor tirozinskih kinaza za čimbenik rasta fibroblasta (FGFR) | Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2 STAT1, STAT3, STAT5 | fibroblasti, astrociti, endotelne stanice, stanice kostiju i glatkih mišića | mitogen za tkivo mezenhimalnog porijekla te živčana tkiva |
| Čimbenik rasta kolonija granulocita (G-CSF) | Receptor za čimbenik rasta kolonija granulocita (G-CSF-R) | Jak1, Jak2, Tyk2, STAT1, STAT3, STAT5 | koštana srž | potiče diferencijaciju granulocita |
| Čimbenik rasta kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF) | Receptor za čimbenik rasta kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF-R) | Jak1, Jak2, STAT1, STAT3, STAT5, STAT6 | neutrofili, eozinofili, makrofagi | potiče diferencijaciju bijelih krvnih stanica |
| Čimbenik rasta hepatocita (HGF) | Tirozin-protein kinaza Met (c-Met) | Jak1, Jak2 STAT1, STAT3, STAT5 | stromalne stanice | regulira embrionalni razvoj jetre i posteljice |
| Čimbenik rasta kolonija makrofaga (M-CSF) | Receptor za čimbenik rasta kolonija makrofaga (M-CSF-R) | Jak1, Tyk2, STAT1, STAT3, STAT5 | koštana srž | potiče diferencijaciju hematopoetskih matičnih stanica |
| Čimbenici rasta dobiven iz trombocita (PDGF) | Receptor čimbenika rasta za trombocite (PDGFR) | Jak1, Jak2, Tyk2 STAT1, STAT3, STAT5, STAT6 | endotelne stanice, trombociti, makrofagi, fibroblasti | rast stanica, kemotaksija, angiogeneza, osteogeneza |
| Transformirajući čimbenik rasta (TGF- α) | Receptor tirozinske kinaze koji kodira <i>c-erbB1</i> (EGFR) | MAPK, ERK1, ERK2, p38, JNK, NF-KappaB | makrofagi, eozinofili, keratinociti | biološka svojstva slična EGF-u, snažniji angiogeni čimbenik |

| | | | | |
|--|---|--|---|--|
| Čimbenik matičnih stanica (SCF) | Tirozin-protein kinaza KIT (CD117) | Jak2 STAT1, STAT3, STAT5 PI-3, PLC-gamma, MAPK | fibroblasti, stromalne stanice koštane srži | hematopoeza, spermatogeneza, melanogeneza |
| Čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGF) | Receptor čimbenika rasta vaskularnog endotela (VEGFR) | Jak2, Tyk2 STAT1, STAT3, STAT5, STAT6 | stanice krvnih žila | rast stanica, migracija, angiogeneza, antiapoptočki učinak |

Kazalo: MAPK - mitogen aktivirana protein kinaza, NF- κB - nuklearni faktor kapa aktiviranih B stanica, JNK-c-Jun N-terminalna kinaza, Tyk2-tirozin kinaza 2, Jak1, Jak2, Jak3-janus kinaza 1,2,3, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 - transduktor signala i aktivator transkripcije 1,2,3,4,5,6, p38 - mitogen aktivirana protein kinaza, ERK1/2 - izvanstanična signal regulirajuća kinaza

1.13.1. Čimbenici rasta s profibrotičkim učinkom

Transformirajući čimbenik rasta β (engl. *transforming growth factor β* , TGF- β) dio je složene superporodice 30 modulatora biološkog odgovora koji imaju važnu ulogu u regulaciji diferencijacije i rasta različitih vrsta stanica te iskazuju profibrotički biološki učinak (Tzavlaki i sur., 2020). U ljudi su opisane tri izoforme ovog čimbenika rasta, TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 koje su kodirane genima na dugom kraku kromosoma 19 (19q13.1, TGF- β 1), dugom kraku kromosoma 1 (1q41, TGF- β 2) i dugom kraku kromosoma 14 (14q24, TGF- β 3) i koje se vežu u heterotetramerne receptorske sklopove koji sadrže dvije podjedinice tipa I (T β RI, TGFBR1) i tipa II (T β RII, TGFBR2). Prijenosnici unutarstaničnog signala ove porodice čimbenika rasta pripadaju transkripcijskim faktorima Smad koja se dijeli na tri klase: faktori regulirani receptorima ili tzv. R-Smad u koje se ubrajaju Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 i Smad8; medijatori Smad (Co-Smad) koji uključuju Smad4 te inhibički Smad (I-Smad) u koje se ubrajaju proteini Smad6 i Smad7. U jezgri se sklop R-Smad/Co-Smad povezuje s drugim nuklearnim aktivatorima transkripcije gena, najčešće iz porodice proteina STAT. Proteini I-Smad prenose negativni signal i u konačnici potiču proteolitičku razgradnju drugih čimbenika ovog signalnog puta. Receptorski sklop TGF- β R može prenositi signale neovisno o proteinima Smad pri čemu su najznačajnije kinaze iz porodice MPAK (engl. *mitogen-activated protein kinase*), proteini koji vežu GTP (Ras, RhoA, Rac1, CDC42 i mTOR), tirozinske kinaze (PTK2, Src i Abl), kao i aktivator transkripcije NF- κ B. Modulatori iz porodice TGF- β stimuliraju staničnu proliferaciju i diferencijaciju stanica, iskazuju antiapoptotički učinak, potiču ekspresiju proteina ECM-a, pokretljivost i invaziju stanica u jetri te moduliraju metabolizam stanica (Deryck i sur., 2019). U kroničnom hepatitisu C, TGF- β se sintetizira u hepatocitima zaraženim HCV-om. Najvažnije biološke funkcije ovog profibrotičkog čimbenika rasta (prvenstveno izoforme TGF- β 1) značajne za patogenezu fibroze su poticanje proliferacije HSC-a, sprječavanje apoptoze HSC-a, poticanje diferencijacije HSC mirujućeg fenotipa u miofibroblaste koje luče komponente ECM-a, kao i poticanje morfoloških promjena ECM-a koje su karakteristične za razvoj fibroze (Xu i sur., 2022). Proteini koji sudjeluju u prijenosu signala TGF- β 1 imaju važnu ulogu i u mehanizmima poticanja fibroze putem mikroRNA (miRNA). MikroRNA su molekule koje se sastoje od 20-22 nekodirajuća nukleotida te mogu potaknuti razgradnju glasničke RNA ili supresiju translacije vezanjem s komplementarnim sekvencama u ne-translatirajućim genomskim regijama ili u glasničkoj RNA. Infekcija HCV-om mijenja molekularne obrasce ekspresije miRNA u stanicama jetre te ima značajnu ulogu u patogenezi fibroze te nastanku HCC-a. Kapsidni protein HCV-a potiče sintezu miR-19a koja se iz zaraženih hepatocita putem egozsoma transportira do HSC-a te potiče aktivaciju važnih komponenti puta prijenosa signala posredovanog čimbenikom TGF- β (najčešće STAT-3) te iskazuju profibrotički učinak (Zhao i sur., 2019). Vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular*

endothelial growth factor; VEGF) dio je porodice čimbenika rasta koja se sastoji od pet molekula tj. VEGF-A, čimbenika rasta stanica placente (engl. *placental growth factor*; PIGF), VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D. Čimbenik rasta VEGF-A kodiran je genom *VEGF-A* koji svoje biološke funkcije ostvaruje vezanjem na receptore VEGFR1, -2 i 3 (Stuttfeld i sur., 2009). Najbolje proučene biološke uloge VEGF-a su poticanje angiogeneze i vaskulogeneze tijekom embrionalnog razvoja, kao i tijekom oštećenja organa poticanjem mitogeneze stanica vaskularnog endotela, uloga u cijeljenju rana, kao i poticanju migracije monocita i makrofaga (Yamakawa i sur., 2019; Seidkhani-Nahal i sur., 2020). VEGF-A iskazuje i vazodilatacijski učinak te povećava mikrovaskularnu permeabilnost. Čimbenik rasta VEGF ima važnu ulogu u imunopatogenezi fiboze jetre, a sintetiziraju ga HSC, endotelne stanice jetre, kao i stanice hepatoma *in vitro* (Roehlen i sur., 2020). Profibrotički učinak VEGF-a u kroničnom hepatitisu C povezan je s njegovim angiogenim učinkom pri čemu je povišena koncentracija ovog čimbenika rasta u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i HCC-om (Talaat i sur., 2014). Tijekom kronične ozljede jetre, funkcionalne promjene u vaskularnoj arhitekturi jetre odvijaju se u dvije faze. Upalni procesi u jetri i nastanak fiboze uzrokuju hipoksiju koja potiče angiogenezu. Nakon toga, proces zacjeljivanja rana koji je uobičajen u kroničnim bolestima jetre potiče oslobođanje proangiogenih citokina i čimbenika rasta. Aktivirane HSC pospješuju angiogenezu sintezom VEGF-a i Ang-1 te povećavanjem ekspresije receptora VEGFR-2 i Tie-2, a VEGF izravno stimulira proliferaciju, migraciju i kemotaksiju HSC-a. Čimbenik rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*; HGF) iskazuje svoj biološki učinak vezanjem na heparan sulfat te na c-Met receptor ili receptor za HGF (HGFR). Sintetiziraju ga mezenhimske stanice, a djeluje na epitelne stanice, endotelne stanice, T-limfocite i hematopoetske progenitorske stanice. Najznačajnije biološke funkcije HGF-a su poticanje diobe i migracije različitih vrsta stanica, razvoj organa tijekom embriogeneze, regeneracija tkiva i organa i zacjeljivanje rana (Lin i sur., 2018). Ovaj čimbenik rasta sintetiziraju i HSC te ima važnu ulogu u regeneraciji jetre i patogenezi fiboze. Koncentracija HGF-a u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C neovisan je čimbenik povezan sa stupnjem fiboze (Marín-Serrano i sur., 2010). Čimbenik rasta fibroblasta (FGF-2) ili osnovni čimbenik rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor-basic*, bFGF) pripada porodici FGF koja sadrži čak 23 čimbenika rasta koji vežu molekule heparina i heparin sulfata. Čimbenik FGF-b ostvaruje svoju biološku funkciju vezanjem na četiri receptora: FGFR1, FGFR2, FGFR3 i FGFR4. Najvažnije biološke funkcije FGF-b su poticanje proliferacije i diferencijacije stanica porijeklom iz mezoderma i neuroektoderma (posebice epitelnih i mezenhimskih stanica) pri čemu ima i važnu ulogu u cijeljenju rana (Yamakawa i sur., 2019). Ovaj pleiotropni čimbenik rasta potiče angiogenezu te ima važnu ulogu u malignoj promjeni stanica i rastu tumora. Iskorjenjivanje virusa antivirusnim i imunomodulacijskim lijekovima kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C povezano je sa značajnim povećanjem koncentracije FGF-2 u serumu (Janczewska-Kazek i sur., 2006). Čimbenici koji stimuliraju stvaranje

kolonija makrofaga (engl. *macrophage colony stimulating factor*, M-CSF), granulocita (engl. *granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF) te obje stanične populacije (GM-CSF) ubrajaju se u skupinu čimbenika rasta koji, zajedno s IL-3, imaju važnu ulogu u diferencijaciji progenitorskih stanica koštane srži, no iskazuju i imunomodulacijske učinke poticanjem diferencijacije i aktivacije monocita/makrofaga, neutrofila i eozinofila. Čimbenici rasta G-CSF i M-CSF značajni su za mijelopoezu, dok je GM-CSF značajan kao medijator upale i aktivacije imunosnog sustava (Tan-Garcia i sur., 2019). Tan-Garcia i suradnici su dokazali porast koncentracije GM-CSF-a u serumu bolesnika s CHC-om, posebice u onih s višim stupnjem fibroze, kao i povećanu ekspresiju GM-CSF u hepatocitima bolesnika (Tan-Gracia i sur., 2019). Epidermni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) potiče rast epidermalnih stanica (keratinociti), kao i epitelnih stanica vezanjem za specifični receptor EGFR (Wu i sur. 2020; Yamakawa i sur., 2019). Čimbenik rasta EGF potiče rast HSC i na taj način oblikuje razvoj fibroze jetre (Aydın i sur., 2018). Shehata i suradnici su dokazali povišene koncentracije EGF-a u serumu kod bolesnika s HCC-om i CHC-om u usporedbi s bolesnicima s CHC-om bez karcinoma te zdravim osobama ukazujući na moguću ulogu ovog čimbenika rasta u onkogenezi povezanoj s kroničnim virusnim hepatitisom (Shehata i sur., 2013). Transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor α*, TGF-α) kodiran je genom *TGFA* na kromosomu 2p13 i pripada porodici čimbenika rasta sličnih EGF-u. Obzirom na strukturnu homologiju s faktorom rasta EGFR (33%), veže se za identični receptor EGFR te potiče endogenu aktivnost tirozinske kinaze ovog receptora i aktivatora transkripcije NF-kappaβ. Čimbenik rasta TGF-α sintetiziraju različite vrste transformiranih stanica, embrionske stanice, ali i stanice poput makrofaga i keratinocita. Biološki učinci ovog čimbenika rasta uključuju poticanje stanične proliferacije, migracije, embriogeneze, angiogenezu, cijeljenje rana i malignu transformaciju stanica (Tzavlaki i sur., 2020). Prepostavlja se da TGF-α regulira ekspresiju urokinaznog aktivatora plazminogena i enzima iz porodice MMP-a pri čemu utječe na migraciju stanica i strukturu ECM-a. Uz to, TGF-α ima važnu ulogu u onkogenezi. Eksperimenti na modelu transgeničnih miševa pokazali su da trajna povećana ekspresija TGF-α uzrokuje hipertrofiju hepatocita nakon 3 mjeseca, hiperplaziju i displaziju jetre nakon 6-9 mjeseci te inducira nastanak HCC-a u čak 50% životinja tijekom perioda od 40-70 tjedana. U sličnom animalnom modelu, povećana ekspresija TGF-α i gena *c-myc* uzrokuje razvoj HCC-a u 100% eksperimentalnih životinja u razdoblju od 40 tjedana (Caviglia i sur., 2015). Angiopoetini 1–4 (Ang 1–4) pripadaju porodici čimbenika rasta koji svoje biološke učinke ostvaruju putem receptora s aktivnosti tirozinske kinaze Tie-1 i Tie-2. Najbolje su istraženi biološki učinci angiopoetina-1 (Ang-1) i angiopoetina-2 (Ang-2). Čimbenik Ang-1 iskazuje snažan angiogenični učinak vezanjem na receptor Tie-2, dok Ang-2 vezanjem na identičan receptor iskazuje antagonistički učinak učincima Ang-1 (Akwii i sur., 2019). Sinteza Ang-2 potiču medijatori upale, a značajan je za fiziologiju endotelnih stanica pri čemu regulira propusnost endotela (Wang i sur., 2017).

Hernández-Bartolomé i suradnici su pokazali da je omjer koncentracija Ang-2 i Ang-1 povezan sa stupnjem fibroze kod bolesnika s CHC-om što indirektno pokazuje da su ove molekule značajne u patogenezi ove bolesti (Hernández-Bartolomé i sur., 2016).

Adipokini su također značajni čimbenici jetrene fibrogeneze koje sintetiziraju adipociti u masnom tkivu. Adipokin leptin je adipogenični hormon koji potiče fibrogenezu dok regulacijski adiponektin, kao hormon regulacije i ima antifibrogeno djelovanje, što je djelomično potvrđeno istraživanjem koje je pokazalo da se ekspresija adiponektina smanjuje tijekom jetrene fibrogeneze (Di Maira i sur., 2018).

1.13.2 Čimbenik rasta s antifibrotičkim učinkom

Čimbenik matičnih stanica (engl. *stem cell factor*; SCF) ostvaruje svoj biološki učinak vezanjem na receptor c-Kit te regulira diferencijaciju CD34+ matičnih stanica. Važne biološke aktivnosti SCF-a su poticanje sinteze proučalnih citokina, kemokina i histamina u mastocitima koji se nalaze u koži i na epitelu sluznica. Biološka aktivnost SCF-a povezana je s Th2 citokinom IL-4 koji sprječava diferencijaciju kultiviranih fetalnih jetrenih mastocita stimuliranih ovim čimbenikom rasta putem smanjenja ekspresije receptora c-Kit (Xia i sur., 1997). Čimbenik SCF ima značajnu ulogu u regeneraciji jetre. U kombinaciji s GM-CSF, SCF sinergistički potiče proliferaciju i diferencijaciju kolangiocita, imaju važnu ulogu u poticanju proliferacije i migracije mezenhimskih stanica te reguliraju aktivnost enzima koji imaju važnu ulogu u moduliranju matriksa poput TIMP-3, MMP-2 i MMP-9 te u konačnici imaju važnu ulogu u regeneraciji i remoduliranju jetre (Meng i sur., 2012).

1.13.3. Čimbenik rasta s profibrotičkim i antifibrotičkim učinkom

Čimbenik rasta trombocita (engl. *platelet derived growth factor*; PDGF) ostvaruje svoju biološku funkciju u obliku homodimera (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC i PDGF-DD) ili heterodimera PDGF-AB dimera pri čemu su podjedinice povezane disulfidnim vezama (Borkham-Kamphorst i sur., 2015). Čimbenik rasta PDGF se veže za specifične receptore (PDGFR) na membranama ciljnih stanica te se tada formiraju dimeri α i β lanaca (Kazlauskas, 2017). Podjedinice ovog čimbenika rasta kodirane su genima *PDGFA* (kromosom 4), *PDGFB* (kromosom 17), *PDGFC* (kromosom 4), *PDGFD* (kromosom 11), *PDGFAB* (kromosom 3). Najvažnija biološka svojstva ovog čimbenika rasta su regulacija proliferacije i rasta stanica, angiogeneza, i kemotaksija. Povećana ekspresija PDGF-a važna je u imunopatogenezi malignih bolesti, aterosklerozi i nastanku fibroze (Chen i sur., 2013). Čimbenik rasta PDGF je mitogen za HSC u jetri te ima značajnu ulogu u cijeljenju vezivnog tkiva jetre tijekom kroničnih virusnih infekcija (Ying i sur., 2017; Borkham-Kamphorst i sur., 2015). Ovaj

čimbenik rasta ima važnu ulogu u poticanju angiogeneze i procesu regeneracije oštećene jetre u kroničnom hepatitisu C. Međutim, pojačana angiogeneza fiziološki je značajna i u patogenezi malignih bolesti, a dosadašnja istraživanja pokazala su da je povećana ekspresija PDGF-a u tkivu jetre bolesnika s kroničnim hepatitism C povezana sa stupnjem maligne transformacije i nastankom HCC-a (El-Bassiouni i sur., 2012). Novija istraživanja pokazuju da primjena DAA i izlječenje bolesnika s kroničnim hepatitism C ne uzrokuje značajne promjene u koncentraciji PDGF-BB u serumu (Wang i sur. , 2021).

1.14. Liječenje kroničnog hepatitisa C

Znanstvene spoznaje o replikacijskom ciklusu HCV-a omogućile su razvoj DAA koji inhibiraju aktivnost viralne proteaze NS3, proteina NS5A i polimeraze NS5B (Parlati i sur. 2020). U Europi su prema smjernicama stručnog društva European Association for the Study of the Liver (EASL) za liječenje kroničnog hepatitisa C odobreni lijekovi: sofosbuvir, sofosbuvir/velpatasvir, sofosbuvir/velpatasvir/voksilaprevir, glekprevir/pibrentasvir te grazoprevir/elbasvir (EASL recommendations on treatment of hepatitis C, 2020). Sofosbuvir je nukleotidni analog inhibitor polimeraze NS5B koji omogućuje replikaciju HCV-a koji se koristi u kombinaciji s inhibitorom replikacijskog kompleksa proteina NS5A koji je dio replikacijskog kompleksa HCV-a te u kombinaciji s voksilaprevirom, inhibitorom viralne proteaze NS3/4A. Inhibitor viralne proteaze NS3/4A glekprevir koristi se u kombinacijom s pibrentasvirom, inhibitorom proteina NS5A. U liječenju kroničnog hepatitisa C primjenjuje se i kombinacija inhibitora proteina NS5A elbasvira i grazoprevira, inhibitora viralne proteaze NS3/4A. Primjena DAA omogućuje izlječenje tj. iskorjenjivanje virusa u više od 95% bolesnika s kroničnim hepatitism C. Virološki kriterij izlječenja je postizanje trajnog virološkog odgovora tj. SVR-a (engl. *sustained virological response*) koji je definiran kao viremija u serumu manja od 15 internacionalnih jedinica RNA HCV-a nakon 12 ili 24 tjedna od završetka liječenja. Izlječenje je povezano sa smanjenjem rizika od komplikacija bolesti jetre poput fiboze, ciroze i hepatocelularnog karcinoma, poboljšanjem kvalitete života, sprječavanjem stigmatizacije u društvu kojoj su izloženi oboljeli od virusnih hepatitisa, kao i s prestankom širenja infekcije u populaciji (EASL recommendations on treatment of hepatitis C, 2020). Rezultati kliničkih istraživanja nedvojbeno pokazuju da nakon izlječenja dolazi do smanjenja stupnja fiboze u određenom postotku bolesnika (Lambrecht i sur., 2020; Rockey i sur. 2021). U istraživanju provedenom u Hrvatskoj, analiziran je učinak primjene DAA u 205 bolesnika s kroničnim hepatitism C te je u 90 bolesnika dokazano smanjenje stupnja fiboze nakon izlječenja, odnosno kod 44% bolesnika nakon antivirusnog liječenja (Radmanić i sur., 2019). Međutim, molekularni mehanizmi povezani s patogenezom fiboze te učinkom eliminacije virusa primjenom DAA u kroničnom

hepatitisu C nedostatno su istraženi, posebice u području analize značajnosti modulatora biološkog odgovora.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

1. Usporediti transkriptomski profil 84 gena koji su značajni u patogenezi fibroze te koji kodiraju sintezu profibrotičnih i antifibrotičnih medijatora biološkog odgovora, komponenti vanstaničnog matriksa i adhezijskih molekula, remodelirajućih enzima, upalnih citokina i kemokina, čimbenika rasta koji pripadaju superporodici TGF-β, transkripcijskih čimbenika, kao i proteina značajnih za epitelno-mezenhimalnu tranziciju u osoba s kroničnim hepatitisom C i zdravih osoba.
2. Usporediti koncentracije citokina (IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-17F, IL-4 i IL-22) i čimbenika rasta (Angiopoietin-2, EGF, EPO, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α, VEGF) u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i zdravih osoba.
3. Analizirati učinak antivirusnog liječenja na koncentraciju citokina i čimbenika rasta u osoba s kroničnim hepatitisom C koje su postigle trajni virološki odgovor (engl. *sustained virological response, SVR*).

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Ekspresija 84 gena koji su važni u patogenezi fibroze jetre te koji kodiraju sintezu profibrotičnih i antifibrotičnih medijatora biološkog odgovora, komponenti vanstaničnog matriksa i adhezijskih molekula, remodelirajućih enzima, upalnih citokina i kemokina, čimbenika rasta superporodice TGF-β, transkripcijskih čimbenika i proteina značajnih za epitelno-mezenhimalnu tranziciju značajno je različita kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C u odnosu na zdrave osobe, a razina ekspresije pojedinih gena povezana je sa stupnjem fibroze.
2. Koncentracije citokina (IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-17F, IL-4 i IL-22) i čimbenika rasta (Angiopoietin-2, EGF, EPO, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α, VEGF) kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C značajno su veće u usporedbi sa zdravim kontrolama, a koncentracija pojedinih modulatora biološkog odgovora korelira sa stupnjem fibroze jetre.
3. Koncentracija citokina (IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-17F, IL-4 i IL-22) i čimbenika rasta (Angiopoietin-2, EGF, EPO, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α, VEGF) kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C nakon SVR-a značajno su snižene u odnosu na koncentracije prije i tijekom antivirusnog liječenja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Vrsta istraživanja

Ovo istraživanje provedeno je u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (KZIB) u Zagrebu kao dio projekta Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji“, KK.01.1.1.01.0006, sufinanciranog sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj u sklopu Elementa projekta 6: „Karakterizacija stečene imunosti na virus hepatitis C“, Etičko povjerenstvo KZIB odobrilo je navedeni projekt 2021. godine.

Istraživanje je podijeljeno u dva dijela: presječno istraživanje u kojem će biti uspoređeni odabrani parametri u ispitanika i zdravih kontrola te longitudinalno istraživanje pri kojem će odabrani parametri biti određeni prije, tijekom i nakon liječenja CHC-a.

U dijelu istraživanja koje se bavi transkriptomikom, odredit će ekspresiju 84 gena čiji su proteinski produkti značajni za biološke procese nastanka fibroze jetre, usporediti će rezultate ekspresije gena u zdravih osoba i kod bolesnika s CHC-om te utvrditi moguće razlike u ekspresiji odabralih gena obzirom na stupanj fibroze. Nakon toga, usporediti će koncentraciju odabralih citokina i čimbenika rasta kod bolesnika s CHC-om s dokazanom virusnom replikacijom (tj. prije liječenja) i zdravih osoba. U longitudinalnom dijelu istraživanja određivati će koncentraciju odabralih citokina i čimbenika rasta prije liječenja, nakon 4 i 8 tjedana primjene antivirusnih lijekova te nakon postizanja SVR-a (tj. 12 tjedana po završetku uspješnog liječenja).

3.2. Ispitanici

U istraživanje će biti uključeni ispitanici u dobi ≥ 18 godina oboljeli od kroničnog hepatitis C kod kojih je, primjenom antivirusnih lijekova, postignuta eliminacija virusa 12 tjedana po završetku liječenja tj. SVR. Dodatni uključni kriteriji bit će: dostupnost demografskih podataka, rezultata laboratorijske i molekularne dijagnostike, podataka o stupnju fibroze određenih metodom fibroelastografije prije liječenja i nakon postizanja SVR-a te dostupnost bioloških uzoraka za analize predviđene ovim istraživanjem. Isključni kriteriji bit će trudnoća, kao i druge kronične infektivne i ne-infektivne bolesti uključujući hepatocelularni karcinom.

U prvom djelu istraživanja, odredit će se transkriptomski profil 84 odabrana gena u 9 bolesnika s CHC-om (s različitim stupnjem fibroze) te u 3 zdrave osobe tj. kod osoba koje nisu zaražene HCV-om. U drugom djelu istraživanja, koncentracija citokina i čimbenika rasta bit će analizirana kod 56 nesrodna bolesnika s CHC-om kod kojih je primjenom antivirusnih lijekova postignuto izlječenje, tj. SVR. Kriterij za postizanje SVR-a je nemjerljiva viremija u serumu 12 tjedana nakon završetka

liječenja. U istraživanje koncentracija citokina i čimbenika rasta bit će uključeno i 15 zdravih osoba (kontrolni uzorci).

3.3. Biološki uzorci

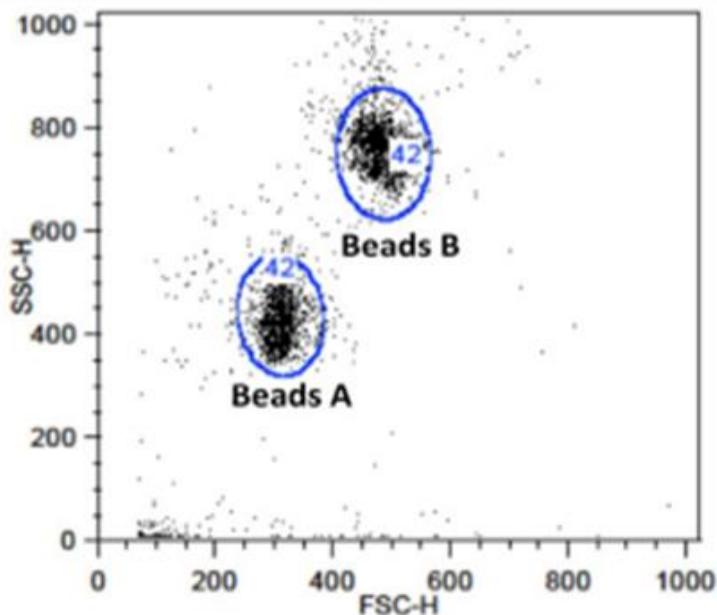
U istraživanju će biti korišten ostatni dio uzorka seruma i pune krvi ispitanika koji je prethodno obrađen u sklopu rutinske kliničke dijagnostike i koji se, u skladu sa standardnim operativnim postupcima u laboratoriju, odbacuje nakon završetka analitičkih postupaka. Uzorci seruma koji su korišteni za kvantifikaciju citokina i čimbenika rasta metodom protočne citometrije pomoću kuglica (engl. *bead-based flow cytometry*), prikupljeni su prije liječenja, nakon 4 i 8 tjedna od početka liječenja te 12 tjedana nakon završetka liječenja tj. u trenutku procjene postizanja SVR-a. U analizi ekspresije gena koji su značajni za patogenezu fibroze korištena je puna krv koja je pohranjena u epruvetama *PAXgene blood RNA tubes* (BD Bioscience, San Diego, SAD) koje omogućuju stabilizaciju unutarstanične RNA te osiguravaju reproducibilnu analizu genske ekspresije. Epruvete su pohranjene na sobnoj temperaturi dva sata, a zatim na -80°C do analize.

3.4. METODE

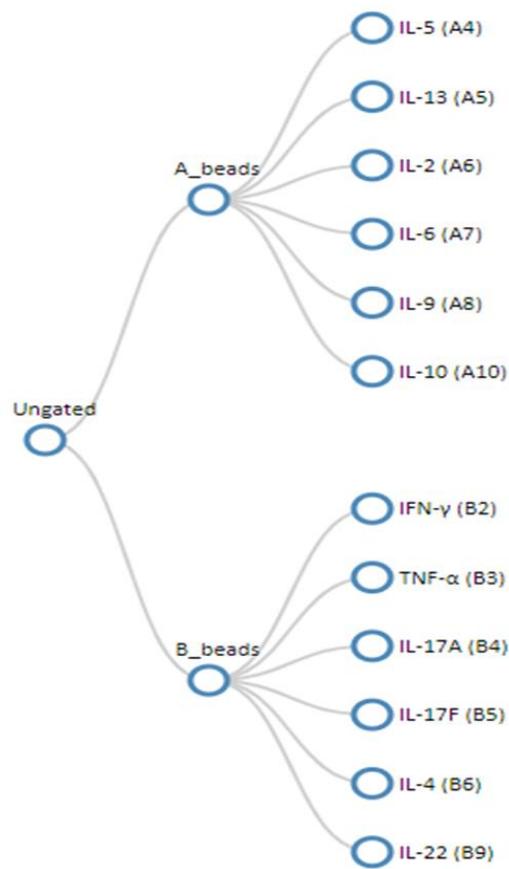
3.4.1. Određivanje koncentracija citokina i čimbenika rasta u serumu primjenom citometrije pomoću kuglica

Za određivanje koncentracije citokina u serumu metodom citometrije pomoću kuglica korišten je reagens *Human Th Cytokine Panel (12-plex) with Filter Plate* (Biolegend, San Diego, CA, SAD), dok je za određivanje koncentracije čimbenika rasta u serumu korišten *Human Growth Factor Panel (13-plex) with Filter Plate* (Biolegend, San Diego, CA, SAD). Metoda se zasniva na detekciji citokina tj. čimbenika rasta pomoću kuglica *Human Th Panel Premixed Beads* na koje su vezana protutijela koja su specifična za pojedini citokin. Protutijela koja su vezana na kuglice vežu se za specifičan antigen, tj. citokin ili čimbenik rasta (Slika 12, Slika 13, Slika 14, Slika 15). Potom se u reakcijsku smjesu dodaju specifična detekcijska protutijela obilježena s biotinom. U testu se koristi 12 različitih protutijela specifičnih za ljudske citokine (IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-17F, IL-4 i IL-22) te 13 različitih protutijela za čimbenike rasta (Angiopoetin-2, EGF, EPO, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α , VEGF). Za postupak detekcije koristi se *LEGENDplex™ SA-PE*, streptavidin sa vezanim fikoeritrinom koji omogućuje analizu analita prisutnih u uzorku vezanjem za biotin. Takav obilježeni streptavidin se veže na biotin, te zajedno čini cijeli sklop citokin/čimbenik rasta-primarno protutijelo-sekundarno protutijelo-streptavidin. Cijeli proces reakcija vezanja protutijela na citokine tj. čimbenike rasta odvija u jažicama mikrotitarske pločice, dok se za detekciju koristi protočni citometar. Prije početka izvođenja testa pripremljeni su svi potrebni reagensi iz *Human Th Cytokine Panel (12-*

plex) with Filter Plate (Biolegend, San Diego, CA, SAD) te iz *Human Growth Factor Panel (13-plex) with Filter Plate* (Biolegend, San Diego, CA, SAD) prema uputama proizvođača.

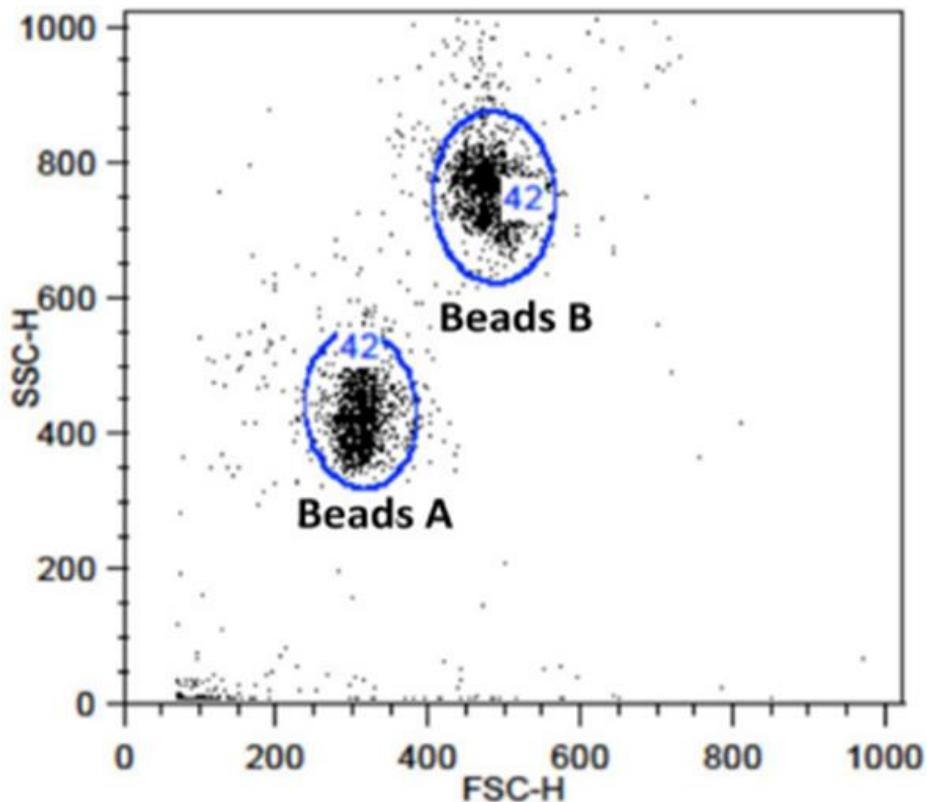


Slika 12. Dvije populacije fluorescentnih kuglica različitih veličina s vezanim specifičnim protutijelima za pojedini citokin. Na x-osi je prikazano usmjerenje (FSC), a na y-osi bočno raspršenje svjetlosti (SSC). Usmjereni raspršenje svjetlosti proporcionalno je veličini promatrane populacije, populacija A je veća od populacije B. Populaciju A čine fluorescentne kuglice kojima sam u serumu ispitanih detektirala prisutnost 6 citokina: IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, i IL-10. Populacija B su fluorescentne kuglice za detekciju 6 citokina: IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-17F, IL-4 i IL-22.

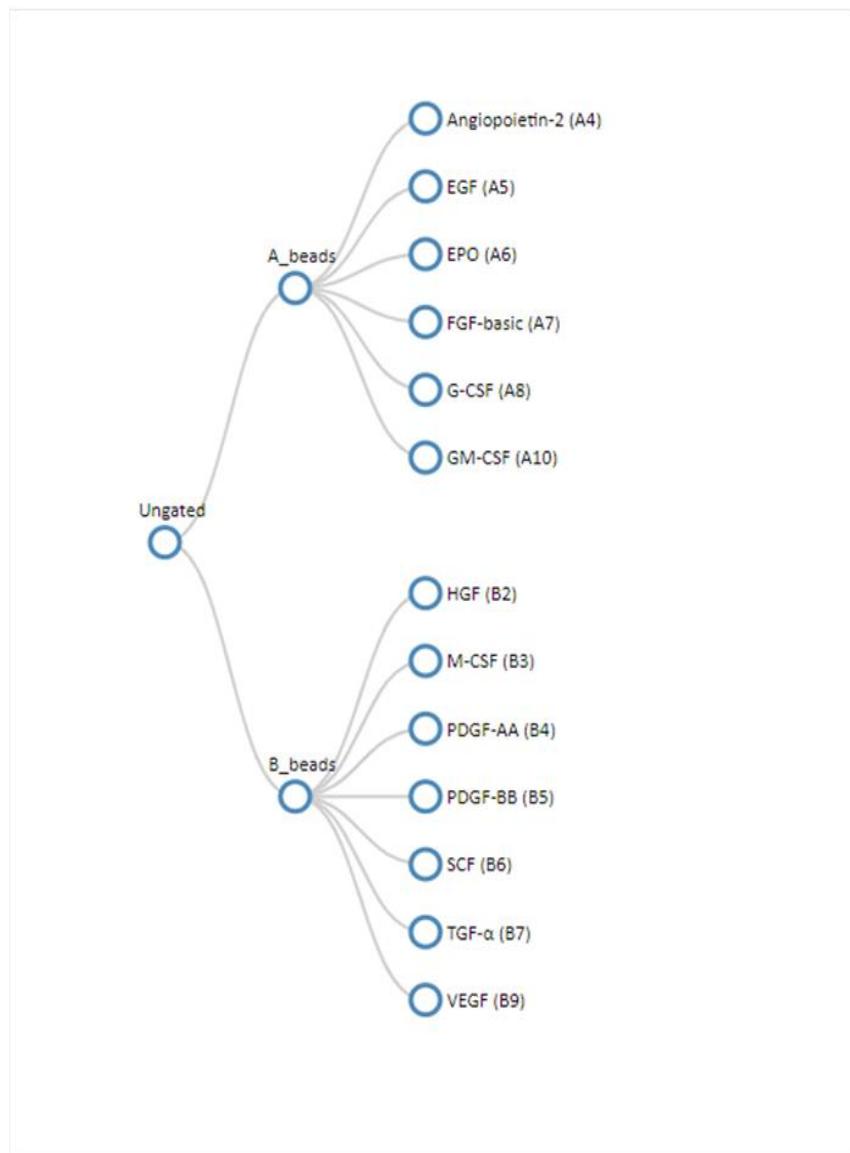


Slika 13. Prikaz raspodjele 12 citokina s obzirom na pozicije u većoj A (A4,A5,A6,A7,A8,A10) i manjoj B (B2,B3,B4,B5, B6, B9) kuglici.

(preuzeto:https://www.biologics.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/75475_Hu_Th_Cytokine_Panel_Replacement_V04.pdf)



Slika 14. Dvije populacije fluorescentnih kuglica različitih veličina s vezanim specifičnim protutijelima za pojedini čimbenik rasta. Na x-osi je prikazano usmjereni (FSC), a na y-osi bočno raspršenje svjetlosti (SSC). Usmjereni raspršenje svjetlosti proporcionalno je veličini promatrane populacije, populacija A je veća od populacije B. Populaciju A čine fluorescentne kuglice kojima sam u serumu ispitanika detektirala prisutnost 6 čimbenika rasta: Angiopoetin-2, EGF, EPO, FGF-basic, G-CSF i GM-CSF. Populacija B su fluorescentne kuglice za detekciju 7 čimbenika rasta: HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α i VEGF.



Slika 15. Prikaz raspodjele 13 čimbenika rasta s obzirom na broj pozicije u većoj A (A4,A5,A6,A7,A8,A10) i manjoj B (B2,B3,B4,B5, B6, B7, B9) kuglici.

(preuzeto:https://www.biolegend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/76319_Human_Growth_Factor_Panel-R5-2.pdf)

3.4.1.2. Priprema uzoraka seruma za protočnu citometriju pomoću kuglica

Uzorci seruma izdvojeni su iz pune krvi prikupljene bez antikoagulansa centrifugiranjem 20 minuta na 1000 x g, a ostatni dio seruma volumena 1 ml pohranjen na -20 ° C. Prije same upotrebe uzorci

su odmrznuti i ponovno centrifugirani (20 minuta na 1000 x g) kako bi se uklonile čestice prije upotrebe.

3.4.1.3. Priprema reagensa

3.4.1.3.1. Priprema pufera za ispiranje

Razrijeđeno je 25ml koncentriranog pufera za ispiranje s 475 ml deionizirane vode.

3.4.1.3.2. Priprema otopine *Matrix B* za uzorke seruma

Dodano je 5,0 mL pufera *LEGENDplex™ Assay* u bocu koja sadrži liofilizirani reagens *Matrix B*, potom se pričekalo 15 minuta za kompletну rekonstituciju i dobro vorteksiralo i promiješalo.

3.4.1.3.3. Priprema standarda

Prije same upotrebe, rekonstituiran je liofilizirani *Human Th Panel Standard Coctail* s 250 μ L pufera za ispiranje. Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi prenesen je sam standard u odgovarajuće označene polipropilenske tubice za mikrocentrifugu. Ovaj standard najviše koncentracije obilježen je kao standard C7. Zatim su označene polipropilenske epruvete za mikrocentrifugu kao C6, C5, C4, C3, C2 i C1 (Tablica 4). Dodano je 75 μ L pufera za ispiranje u svaku od 6 tubica. Pripremljeno je 1:4 razrjeđenje prenošenjem 25 μ L standarda C7 u C6 i dobro promiješano. Potom je dobiven standard C6. Na isti način pripremljena su i serijska razrjeđenja 1:4 da bi bili dobiveni standardi C5,C4, C3, C2 i C1. Pufer za ispiranje (*LEGENDplex™ Assay Buffer*) korišten je kao standard C0 (pg/mL).

Tablica 4. Prikaz razrjeđenja standarda

| Tube/ Standard ID | Serijska razrjeđenja | Pufer (μ L) | Standard | Konačna koncentracija (pg/mL) |
|-------------------|----------------------|------------------|------------------|-------------------------------|
| C7 | -- | -- | -- | 10000 |
| C6 | 1:4 | 75 | 25 μ L od C7 | 2500 |
| C5 | 1:16 | 75 | 25 μ L od C6 | 625 |
| C4 | 1:64 | 75 | 25 μ L od C5 | 156,3 |
| C3 | 1:256 | 75 | 25 μ L od C4 | 39,1 |
| C2 | 1:1024 | 75 | 25 μ L od C3 | 9,8 |
| C1 | 1:4096 | 75 | 25 μ L od C2 | 2,4 |
| C0 | -- | 75 | -- | 0 |

3.4.1.3.4. Razrjeđivanje uzorka seruma

Uzorci seruma razrijeđeni su dva puta s puferom za ispiranje (*LEGENDplex™ Assay Buffer*) prije testiranja.

3.4.1.4. Postupak testiranja

Test *LEGENDplex™* se izvodi na filterskoj pločici. Uzorci i standardi poredani su u vertikalnoj konfiguraciji prikladnoj za prikupljanje i analizu podataka, dok su standardi postavljeni u prva dva stupca kao što je prikazano u Tablici 5.

Tablica 5. Raspored standarda i uzoraka na mikrotitracijskoj pločici

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | C0 | C0 | Uz 1 | Uz 9 | Uz 17 | Uz 25 | Uz 33 | Uz 41 | Uz 49 | Uz 57 | Uz 65 | Uz 73 |
| B | C1 | C1 | Uz 2 | Uz 10 | Uz 18 | Uz 26 | Uz 34 | Uz 42 | Uz 50 | Uz 58 | Uz 66 | Uz 74 |
| C | C2 | C2 | Uz 3 | Uz 11 | Uz 19 | Uz 27 | Uz 35 | Uz 43 | Uz 51 | Uz 59 | Uz 67 | Uz 75 |
| D | C3 | C3 | Uz 4 | Uz 12 | Uz 20 | Uz 28 | Uz 36 | Uz 44 | Uz 52 | Uz 60 | Uz 68 | Uz 76 |
| E | C4 | C4 | Uz 5 | Uz 13 | Uz 21 | Uz 29 | Uz 37 | Uz 45 | Uz 53 | Uz 61 | Uz 69 | Uz 77 |
| F | C5 | C5 | Uz 6 | Uz 14 | Uz 22 | Uz 30 | Uz 38 | Uz 46 | Uz 54 | Uz 62 | Uz 70 | Uz 78 |
| G | C6 | C6 | Uz 7 | Uz 15 | Uz 23 | Uz 31 | Uz 39 | Uz 47 | Uz 55 | Uz 63 | Uz 71 | Uz 79 |
| H | C7 | C7 | Uz 8 | Uz 16 | Uz 24 | Uz 32 | Uz 40 | Uz 48 | Uz 56 | Uz 64 | Uz 72 | Uz 80 |

Filterska pločica je navlažena dodavanjem 100 µL 1X pufera za ispiranje *LEGENDplex™* u svaku jažicu te inkubirana 1 minutu na sobnoj temperaturi. Kod uklanjanja viška volumena, korištena je vakuum pumpa čija jačina nije bila veća od 10" Hg vakuma. Vakuumiralo se 5-10 sekundi dok se jažice nisu isušile.

Tablica 6. Priprema uzoraka seruma za mjerjenje koncentracija citokina i čimbenika rasta

| | Pufer za ispiranje | Matrix B | Standard | Uzorak |
|--------------------|--------------------|----------|----------|--------|
| Jažice za standard | --- | 25 µL | 25 µL | --- |
| Jažice za uzorak | 25 µL | --- | --- | 25 µL |

Vortexira se bočica s miješanim kuglicama 30 sekundi. Svakoj jažici dodano je 25 µL miješanih kuglica (Tablica 6.). Volumen je u svakoj jažici bio 75 µL nakon dodavanja kuglica. Filterska pločica je pokrivena adhezivnim filmom. Cijela pločica se omota aluminijskom folijom i stavi na tresilicu s

brzinom pomaka od 500 rpm na sobnoj temperaturi 2 sata. Nakon toga se stavi filter pločicu na vakuum pumpu. U svaku jažicu se doda 200 µL 1X pufera za ispiranje i potom ukloni taj pufer vakuum filtracijom. Nakon toga se okreće pločicu prema papirnatim ručnicima da se sav pufer ukloni i cijeli taj postupak se ponovi još jednom. Zatim se doda 25 µL detekcijskih protutijela u svaku jažicu. Potom se zatvori pločicu adhezivnim filmom, cijelu pločicu se omota aluminijskom folijom i stavi na tresilicu s brzinom pomaka od 500 rpm na sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon sat vremena, u svaku jažicu se doda 25 µL SA-PE tj. streptavidin- fikoeritrina koji omogućuje analizu analita prisutnih u uzorku vezanjem za biotin. Zatim se pločicu pokrije adhezivnim filmom, sve omota aluminijskom folijom i stavi na tresilicu s brzinom pomaka od 500 rpm na 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga filter pločicu se stavi na vakuum pumpu. U svaku jažicu se doda 200 µL 1X pufera za ispiranje i potom ukloni pufer vakuum filtracijom. Nakon toga se okreće pločicu prema papirnatim ručnicima da se sav pufer ukloni. U svaku jažicu se doda 150 µL pufera za ispiranje i resuspendira kuglice na tresilici 1 minutu. Na kraju se sadržaj iz jažica prebací u epruvete za protočni citometar te ih zaštiti od svjetlosti do analize na protočnom citometru.

Prilagodile su se postavke protočnog citometra BD FACSCanto II prema uputama proizvođača reagensa *Human Th Cytokine Panel (12-plex) with Filter Plate* i *Human Growth Factor Panel (13-plex) with Filter Plate* (Biolegend, San Diego, CA, SAD). Pokrenut je prethodno kreiran protokol u računalnom programu BD FACSDiva™ na protočnom citometru. Dobiveni rezultati unijeti su u računalni program LEGENDplex v8.0 koji na temelju poznatih koncentracija standarda određuje koncentraciju citokina i čimbenika rasta u uzorcima.

3.4.2. Izolacija RNA iz pune krvi

Ukupna RNA iz uzoraka pune krvi koji su pohranjeni u epruvetama *PAXgene RNA Tube* izolirana je pomoću reagensa *PAXgene RNA Kit* (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Švicarska). Epruvete *PAXgene Blood RNA Tube* su bile pohranjene najmanje 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se postigla potpuna liza eritrocita. Nakon toga, epruvete su se centrifugirale 10 minuta na 958 xg pomoću rotora s njišućim vjedrima, zatim se uklonio supernatant, na talog dodalo 4 mL vode bez prisustva RNaza i promiješao sadržaj vorteks miješalicom dok se talog nije vidljivo razgradio. Ponovio se sam postupak centrifugiranja, uklonio supernatant i na talog dodalo 350 µL pufera za resuspendiranje (BR1). Promiješao se sam sadržaj vorteks miješalicom dok se talog nije razgradio, prebacilo u epruvetu od 1,5 mL i dodalo 300 µL pufera za vezanje (BR2) i 40 µL proteinaze K, te inkubiralo 10 minuta na 55°C koristeći tresilicu-inkubator pri 800 g. Prebacio se dobiveni lizat u kolonu *PAXgene Shredder Spin* koja se stavila u epruvetu volumena 2 mL i centrifugiralo 3 minuta na 15 000 g. Frakciju koja je prošla kroz kolonu prebacilo se u novu epruvetu volumena 1,5 mL, dodalo 350 µL etanola, vorteksirao sadržaj i kratko centrifugiralo 2 sekunde na 1000 g kako bi se uklonile kapljice sa stijenke

tubice. Potom se u kolonu *PAXgene RNA Spin* u koju se stavilo epruvetu od 2 mL prebacilo 700 μ L uzorka, centrifugiralo 1 minutu na 15 000 g i premjestilo kolonu u novu epruvetu od 2 mL. Preostali uzorak se dodao u kolonu i ponovilo centrifugiranje (1 minuta, 15 000 g) zatim ponovno premjestilo kolonu u novu epruvetu volumena 2 mL. Potom se dodalo 350 μ L pufera za ispiranje 1 (BR3), centrifugiralo 1 minutu na 15 000 g i stavilo kolonu u novu epruvetu od 2 mL. U epruvetu volumena 1,5 mL dodalo se 10 μ L DNase I i 70 μ L pufera za digestiju (RDD), te lagano sve promiješalo. Ostavilo se na sobnoj temperaturi 15 minuta dobivenu otopinu koju se dodalo direktno u kolonu. Nakon 15 minuta u kolonu se dodalo 350 μ L pufera za ispiranje 1 (BR3), zatim centrifugiralo 1 minutu na 15 000 g, te premjestilo kolonu u novu epruvetu od 2 mL. Nakon što se dodalo 500 μ L pufera za ispiranje 2 (BR4), ponovljen je postupak centrifugiranja (1 minuta na 15 000 g) i premještena kolonu u novu epruvetu volumena 2 mL. Zatim se u kolonu prebacilo 500 μ L pufera za ispiranje 2 (BR4), centrifugiralo 3 minute na 15 000 g, te se premjestilo u novu epruvetu od 2 mL. Epruvetu s kolonom se centrifugiralo 1 minutu na 15 000 g kako bi se u potpunosti uklonilo pufer za ispiranje 2 (BR4) i kolonu premjestilo u novu epruvetu volumena 1,5 mL. Na kraju je dodano 40 μ L elucijskog pufera (BR5) i centrifugirano 1 minutu na 15 000 g. Ponovljen je taj korak još jednom, te se potom inkubirao eluat 5 minuta na 65°C. Nakon inkubacije uzorci su se odmah ohladili na ledu. Određena je koncentracija i čistoća izolirane RNA pomoću spektrofotometra BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) mjeranjem apsorbancije na valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm prije nego što su pohranjeni izolati na -20°C. Uzorak je zadovoljavao kriterije čistoće ukoliko je omjer A_{260/280} između 1.8 - 2.1 i omjer A_{260/230} veći od 1.7, stoga su izolati koji su zadovoljili navedene kriterije čistoće i kvalitete pohranjeni na -20 °C.

3.4.3. Sinteza prvog lanca cDNA

U sintezi prvog lanca cDNA prvi korak je uklanjanje zaostale genomske DNA iz izolirane ukupne RNA. U reakcijsku smjesu stavljeno je 1 μ g ukupne RNA, 2 μ L reakcijskog pufera GE te dodano RNazu čiste vode do ukupnog volumena od 10 μ L. Reakcijska smjesa se inkubiralo na 42°C tijekom 5 minuta. Nakon 5 minuta, reakcijska smjesa se odmah ohladila na ledu. Potom je pripremljena reakcijska smjesa za reakciju reverzne transkripcije koja se sastojala od 4 μ L pufera BC3, 1 μ L otopine početnica, 2 μ L otopine enzima za reverznu transkripciju i 3 μ L vode bez RNaza. Zatim se dobivena otopina pomiješala s 10 μ L ukupne RNA koja je pročišćena od ostataka genomske DNA te inkubirala 15 minuta na 42°C. Potom je zaustavljena reakcija povišenjem temperature na 95°C tijekom 5 minuta. Za kraj je u reakcijsku smjesu dodano 91 μ L RNaza čiste vode i pohranjeno na -20°C.

3.4.4. Analiza ekspresije gena jetrene fibroze metodom određivanja broja kopija lančanom reakcijom polimeraze

Za analizu ekspresije gena jetrene fibroze korišten je reagens *RT² Profiler PCR Array Human Fibrosis* (QIAGEN, Hilden, Njemačka) koji omogućuje istovremenu detekciju ekspresije 84 gena koji uključuje: (1) profibrotične medijatore biološkog odgovora (*ACTA-2* (α-SMA)), *AGT*, *CCL-11* (Eotaxin), *CCL-2* (MCP-1), *CCL-3* (MIP-1A), *CCN-2* (*CTGF*), *GREM-1*, *IL-13*, *IL-13RA-2*, *IL-4*, *IL-5*, *SNAI-1* (SNAIL), (2) antifibrotične medijatore biološkog odgovora (*BMP-7*, *HGF*, *IFNG*, *IL-10*, *IL-13RA-2*), (3) komponente ekstracelularnog matriksa i adhezijskih molekula (*COL-1A2*, *COL-3A1*), (4) remodelirajućih enzima (*LOX*, *MMP-1*, *MMP-13*, *MMP-14*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-8*, *MMP-9*, *PLAT* (TPA), *PLAU* (UPA), *PLG*, *SERPINA-1*, *SERPINE-1* (PAI-1), *SERPINH-1* (HSP47), *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3*, *TIMP-4*), (5) adhezijskih molekula (*ITGA-1*, *ITGA-2*, *ITGA-3*, *ITGAV*, *ITGB-1*, *ITGB-3*, *ITGB-5*, *ITGB-6*, *ITGB-8*), (6) upalnih citokina i kemokina (*CCL-11* (Eotaxin), *CCL-2* (MCP-1), *CCL-3* (MIP-1A), *CCR-2*, *CXCR-4*, *IFNG*, *IL-10*, *IL-13*, *IL13-RA-2*, *IL-1A*, *IL-1B*, *IL-4*, *IL-5*, *ILK*, *TNF*), (7) čimbenike rasta (*AGT*, *CCN-2*, *EDN-1*, *EGF*, *HGF*, *PDGFA*, *PDGFB*, *VEGFA*), (8) čimbenike rasta superporodice TGF-β (*BMP-7*, *CAV-1*, *DCN*, *ENG* (EVI-1), *GREM-1*, *INHBE*, *LTBP-1*, *SMAD-2* (MADH2), *SMAD-3* (MADH3), *SMAD-4* (MADH4), *SMAD-6*, *SMAD-7*, *TGFB-1*, *TGFB-2*, *TGFB-3*, *TGFBR-1* (ALK5), *TGFBR-2*, *TGIF-1*, *THBS-1* (TSP-1), *THBS-2*), (9) transkripcijskih faktora (*CEPB*, *JUN*, *MYC*, *NFKB-1*, *SP-1*, *STAT-1*, *STAT-6*); (10) proteina značajnih za epitelno-mezenhimalnu tranziciju: (*AKT-1*, *BMP-7*, *COL-1A2*, *COL-3A1*, *ILK*, *ITGAV*, *ITGB-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *SERPINE-1* (PAI-2), *SMAD-2* (MADH2), *SNAI* (SNAIL), *TGFB-1*, *TGFB-2*, *TGFB-3*, *TIMP-1*), (11) ostalih proteina značajnih u patogenezi fibroze (*BCL-2*, *FASLG* (TNFSF6)).

U svakoj jažici mikrotitarske pločice (ukupno 96 jažica) nalaze se početnice za umnažanje odabrane regije gena za modulatore biološkog odgovora odnosno za kontrolne gene. Reagens *RT² Profiler PCR Array Human Fibrosis* uključuje 12 kontrola: 5 održavateljskih gena za normalizaciju dobivenih rezultata, kontrolu za detekciju moguće kontaminacije genomskom DNA, 3 kontrole reverzne transkripcije za provjeru učinkovitosti reverzne transkripcije prilikom sinteze cDNA i 3 pozitivne kontrole za provjeru učinkovitosti PCR reakcije. Kao predložak korištena je cDNA sintetizirana reverznom transkripcijom ukupne RNA. Pomiješalo se 102 µL cDNA s 1350 µL 2x reakcijske smjese *RT² SYBR Green*, zatim dodalo 1248 µL vode bez RNaza te pipetiralo po 25 µL dobivene otopine u svaku jažicu mikrotitarske pločice.

Reakcija PCR-a odvijala se u termocikličkom amplifikatoru ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) u zadanim uvjetima: 10 minuta na 95°C i 40 ciklusa 15 sekundi na 95°C i 1 minuta na 60°C. Nakon završetka svih ciklusa PCR reakcije, analizirane su krivulje disocijacije za svaku PCR reakciju kako bi se provjerila njihova specifičnost i isključilo postojanje

međusobno sparenih početnica. Na kraju su pomoću programa *7500 System SDS Software*, ver. 1.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) termocikličkog amplifikatora analizirane C_t vrijednosti i disocijacijske krivulje svih PCR reakcija. Rezultati analize genske ekspresije metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu analizirani su pomoću računalnog programa *RT2 Profiler PCR Array Data Analysis* (QIAGEN, GeneGlobe, MD, SAD).

3.4.5. Demografski, laboratorijski i klinički podaci o bolesnicima

Demografski podaci, rezultati određivanja stupnja fibroze metodom fibroelastografije prije započinjanja terapije i nakon izlječenja, rezultati molekularne dijagnostike (kvantifikacija RNA HCV-a), genotipizacije virusa te klinički podatci o primjeni antivirusnih lijekova dobiveni su analizom rezultata baze podataka Referentnog centra za virusni hepatitis KZIB. Za procjenu stupnja fibroze, u ovom je istraživanju korištena neinvazivna metoda tranzijentne elastografije (TE) primjenom uređaja FibroScan (Echosens, Francuska), a rezultat je izražen u mjernej jedinici kPa. Stupanj fibroze je klasificiran kao: F0/F1<7,0 kPa, F2 7,0-9,5 kPa, F3>9,5 kPa i F4>12,5 kPa. (Preporuke za liječenje hepatitisa C, 2021).

3.4.6. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja genske ekspresije obrađeni su statistički primjenom programa *RT2 Profiler PCR Array Data Analysis* (QIAGEN, GeneGlobe, MD, SAD). Korištene su uobičajene metode deskriptivne statistike. Studentov t- test koristio se za određivanje značajnih promjena u ekspresiji između uzorka HCV-a i kontrola. Analiza kvantifikacije citokina i čimbenika rasta obrađena je statistički primjenom programa R (verzija 4.1.0, Vienna, Austria). Za usporedbu koncentracija citokina i čimbenika rasta u četiri točke infekcije korišten je Friedman-ov test. Uz to, za usporedbu prije početka liječenja i nakon postizanja SVR-a korišten je Wilcoxonov test. Pomoću Mann-Whitney testa analizirana je razlika između koncentracija citokina i čimbenika rasta prije početka liječenja i kontrolnim uzorcima te nakon SVR-a i kontrolnim uzorcima. Uz to, analizirane su razlike u koncentracijama citokina i čimbenika rasta kod bolesnika s obzirom na genotip, odnosno podtip virusa hepatitis C. Pomoću Kruskal-Wallisova testa uspoređene su koncentracije citokina i čimbenika rasta prije početka liječenja s obzirom na početni stupanj fibroze u HCV ispitanika. Važnost varijabli u razdvajanju pacijenata prije početka liječenja i nakon SVR-a i u kontrolnim uzorcima prikazana je modelom slučajnih šuma (engl. *Random forest*). Logističkom regresijom koja je potpomognuta krivuljom osjetljivosti dijagnostičkog testa (engl. *Reciever Operating Characteristic, ROC*) ispitana je mogućnost predviđanja stupnja fibroze s obzirom na čimbenike rasta, citokine, genotip virusa, spol i dob. Uz to, prikazano je hijerarhijsko grupiranje i toplinska mapa s prikazom

koncentracija razina čimbenika rasta i citokina prije početka liječenja i nakon postizanja SVR-a. Razina statističke značajnosti definirana je s vrijednosti $P < 0,050$.

4. REZULTATI

4.1. Transkriptomski profil ekspresije 84 gena koji su značajni u patogenezi fibroze i imunološkom odgovoru u kroničnom hepatitisu C

Transkriptomski profili analizirani su u devet bolesnika s kroničnim hepatitisom C (5 muškaraca, 4 žene, srednja vrijednost dobi 47 godina, raspon 21-53 godina, medijan viremije 1 862 000 IU RNA HCV-a/mL, raspon 51,3- 11 883 725 IU/mL, stupanj fibroze F1 n=2, F2 n=3, F3 n=1, F4 n=3) i u 3 zdrave kontrole (raspon dobi 28-41 godina, 3 žene). Ekspresija gena *SMAD-6* koji je član TGF-β signalnog puta bila je statistički značajno veća ($p=0,040$) (Tablica 7, Slika 16, Slika 17), dok je gena *CAV-1* koji je također član TGF-β signalnog puta bila statistički značajno smanjena u kroničnom hepatitisu C u usporedbi sa zdravim osobama ($p=0,001$) (Tablica 8, Slika 16, Slika 17). U istraživanju je dokazana i povećana ekspresija gena *IL-13* koji je upalni citokin i *MMP-8* koji je remodelirajući enzim izvanstaničnog matriksa kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C, no nije bila statistički značajna. Ekspresija gena *CTGF* ($p=0,029$) koji je čimbenik rasta i remodelirajućih enzima izvanstaničnog matriksa (*ITGA-2* ($p=0,001$), *LOX* ($p=0,007$), *MMP-1* ($p=0,027$) i *PLG* ($p=0,016$)) bila je statistički značajno smanjena u kroničnom hepatitisu C u usporedbi sa zdravim osobama (Tablica 8, Slika 16, Slika 17).

Tablica 7. Povišena ekspresija gena značajnih za patogenezu fibroze jetre u kroničnom hepatitisu C

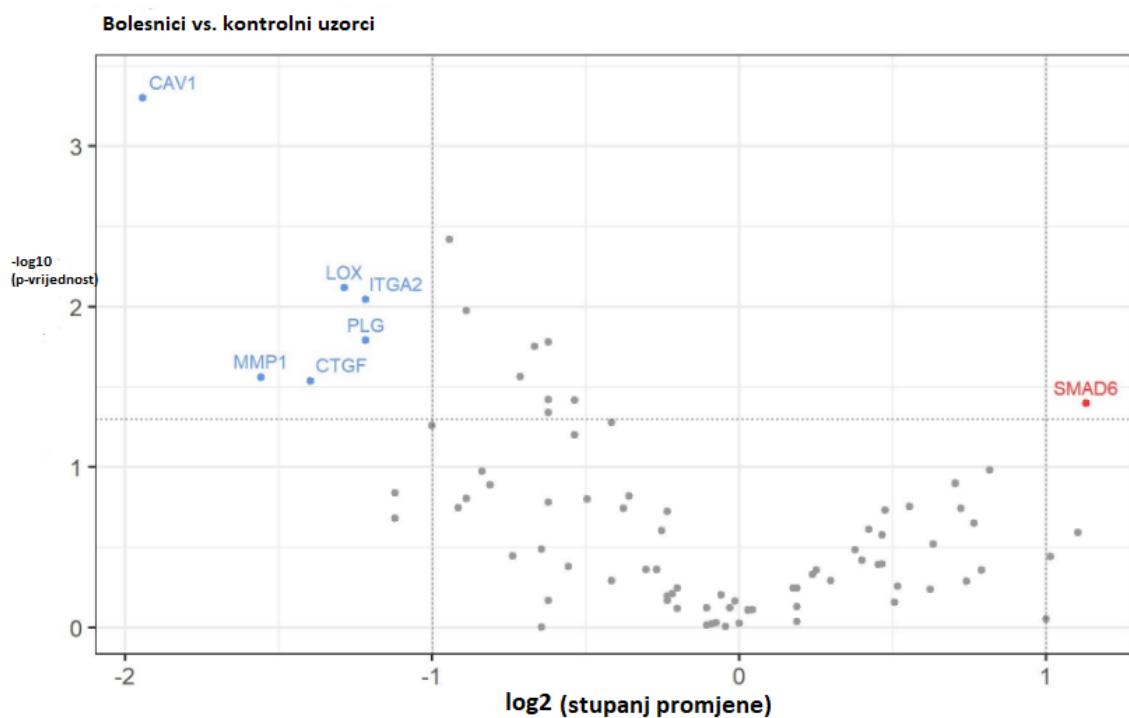
| Oznaka gena | Stupanj promjene | <i>p</i> -vrijednost |
|---------------|------------------|----------------------|
| <i>IL-13</i> | 2,02 | 0,362 |
| <i>MMP-8</i> | 2,15 | 0,255 |
| <i>SMAD-6</i> | 2,19 | 0,040 |

Kazalo: crvenom bojom naznačena je statistički značajna razlika u ekspresiji gena *IL-13* (gen za protein IL-13), *MMP-8* (gen za protein MMP-8), *SMAD-6* (gen za prijenosnik signala SMAD-6)

Tablica 8. Snižena ekspresija gena značajnih za patogenezu fibroze jetre u kroničnom hepatitisu C

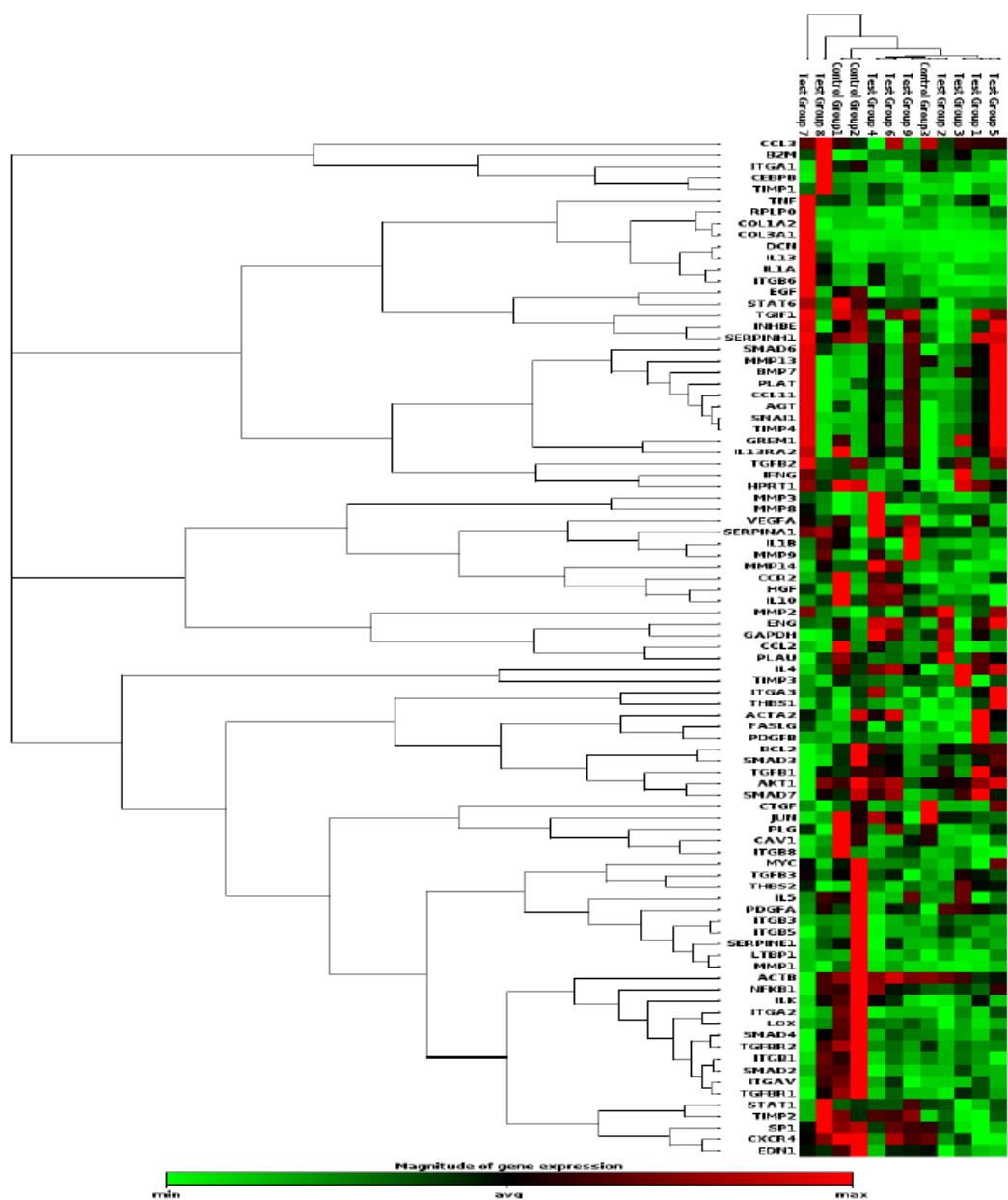
| Oznaka gena | Stupanj promjene | p-vrijednost |
|---------------|------------------|--------------|
| <i>CAV-1</i> | -3,81 | 0,001 |
| <i>CTGF</i> | -2,65 | 0,029 |
| <i>IL-5</i> | -2,18 | 0,207 |
| <i>ITGA-2</i> | -2,34 | 0,009 |
| <i>ITGB-8</i> | -2,16 | 0,145 |
| <i>LOX</i> | -2,44 | 0,007 |
| <i>MMP-1</i> | -2,92 | 0,027 |
| <i>PLG</i> | -2,34 | 0,016 |

Kazalo: plavom bojom označena je statistički značajna razlika u ekspresiji gena *CAV-1* (engl. Caveolin-1), *CTGF* (gen za CTGF), *IL-5* (gen za IL-5), *ITGA-2* (engl. Integrin alpha-2), *ITGB-8* (engl. Integrin beta-8), *LOX* (engl. lysyl oxidase), *MMP-1* (gen za MMP-1), *PLG* (engl. Plasminogen)



Slika 16. Prikaz ekspresije 84 značajnih za patogenezu fibroze primjenom prikaza Volcano plot

Na X-osi prikazana je \log_2 vrijednost stupnja promjene u ekspresiji gena za bolesnike s kroničnim hepatitisom C u usporedbi sa zdravim kontrolama, dok je $-\log_{10}$ p-vrijednost prikazana na Y-osi. Crvene točke simboliziraju pojačanu ekspresiju gena, plave točke označuju smanjenu ekspresiju gena, horizontalna linija pokazuje granicu statističke značajnosti $p=0,050$.



Slika 17. Grafički prikaz grupiranja ekspresije 84 gena značajnih za patogenezu fibroze jetre kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C.

Uzorci bolesnika s kroničnim hepatitisom C označeni su kao Test Group 1- Test Group 9. Oznaka Test Group 6,9 predstavlja stupanj fibroze F1, Test Group 3,4,5 stupanj fibroze F2, Test Group 7 stupanj fibroze F3, dok Test Group 1,2 i 8 predstavljaju stupanj fibroze F4. Kontrolne skupine označene su kao Control Group 1- Control Group 3. Boje simboliziraju jačinu genske ekspresije, zelenoma boja označava minimalnu, a crvena maksimalnu gensku ekspresiju.

4.2. Transkriptomski profil ekspresije 84 odabrana gena kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F1/F2

Napravljena je analiza transkriptomskog profila u pet bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F1/F2 te u tri zdrave osobe. Iako je ekspresija gena *GREM-1*, *SMAD-6* i *TIMP-4* kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C bila veća u usporedbi sa zdravim kontrolama, nije bila statistički značajna ($p=0,141$; $p=0,070$ i $p=0,070$) (Tablica 9, Slika 18 i 19.). Kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C ekspresija gena *CAV-1* ($p=0,012$), *CEBPB* ($p=0,015$), *ITGA-2* ($p=0,006$) bila je statistički značajno snižena u usporedbi sa zdravim osobama (Tablica 10, Slika 18 i 19.). Snižena ekspresija još četiri gena značajnih za patogenezu fibroze bila je snižena kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C, no razlika nije bila statistički značajna (Tablica 10).

Tablica 9. Povišena ekspresija gena značajnih za patogenezu fibroze jetre u kroničnom hepatitisu C i stupnjem fibroze F1/ F2

| Oznaka gena | Stupanj promjene | <i>p</i> -vrijednost |
|---------------|------------------|----------------------|
| <i>GREM-1</i> | 2,01 | 0,141 |
| <i>SMAD-6</i> | 2,20 | 0,070 |
| <i>TIMP-4</i> | 2,20 | 0,070 |

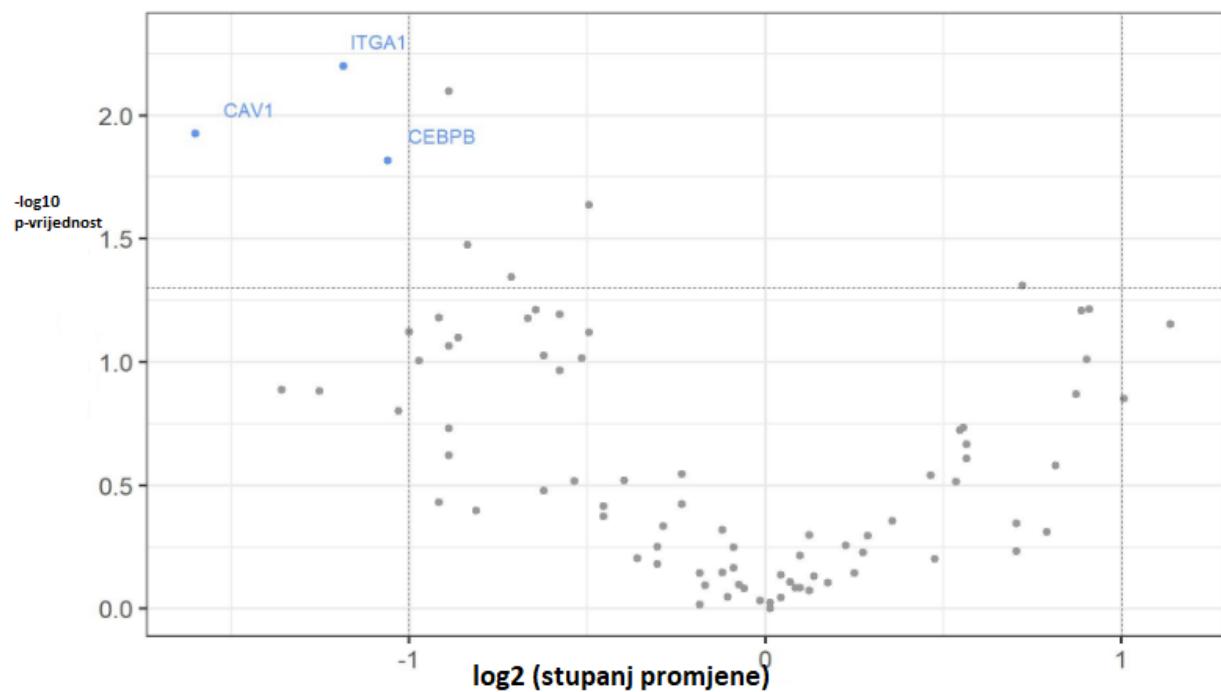
Kazalo: ekspresija gena *GREM-1* (gen za protein GREM-1), gen *SMAD-6* (gen za prijenosnik signala SMAD-6), gen *TIMP-4* (gen za protein TIMP-4)

Tablica 10. Snižena ekspresija gena u bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F1/ F2

| Oznaka gena | Stupanj promjene | <i>p</i> -vrijednost |
|------------------|------------------|----------------------|
| <i>CAV-1</i> | -3,06 | 0,012 |
| <i>CEBPB</i> | -2,08 | 0,015 |
| <i>CTGF</i> | -2,05 | 0,157 |
| <i>ITGA-1</i> | -2,27 | 0,006 |
| <i>ITGA-2</i> | -2,01 | 0,076 |
| <i>MMP-1</i> | -2,58 | 0,129 |
| <i>SERPINE-1</i> | -2,35 | 0,130 |

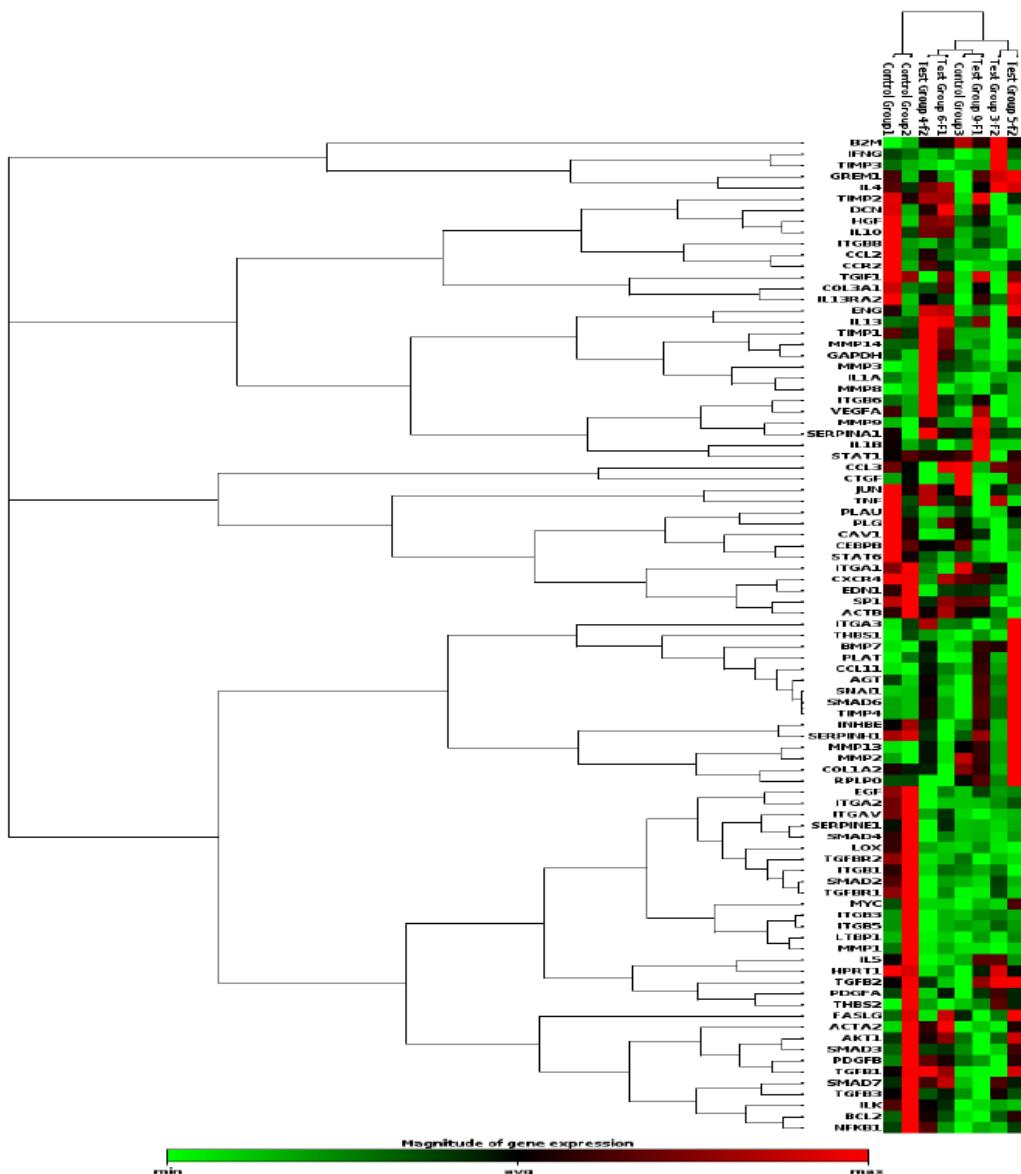
Kazalo: plavom bojom označeni su geni kod kojih je razlika u ekspresiji bila statistički značajna, gen *CAV-1* (engl. Caveolin-1), gen *CEBPB* (engl. CCAAT/enhancer-binding protein beta), gen *ITGA-1* (engl. Integrin alpha-1), dok kod ostalih prikazanih gena nije bilo statistički značajne razlike: gen *CTGF* (gen za CTGF), gen *ITGA-2* (engl. Integrin alpha-2), *MMP-1* (gen za MMP-1), gen *SERPINE-1* (engl. Serpin family E Member 1).

F1+F2 vs. kontrolna skupina



Slika 18. Prikaz ekspresije 84 značajnih za patogenezu fibroze primjenom prikaza *Volcano plot*

Na X-osi prikazana je \log_2 vrijednost stupnja promjene u ekspresiji gena za bolesnike s kroničnim hepatitisom C u usporedbi sa zdravim kontrolama, dok je $-\log_{10}$ p-vrijednost prikazana na Y-osi. Crvene točke simboliziraju pojačanu ekspresiju gena, plave točke označuju smanjenu ekspresiju gena, horizontalna linija pokazuje granicu statističke značajnosti $p=0,050$.



Slika 19. Grafički prikaz grupiranja ekspresije 84 gena značajnih za patogenezu fibroze jetre kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F1/F2.

Uzorci bolesnika s kroničnim hepatitisom C označeni su kao Test Group 1- Test Group 9. Oznaka Test Group 6,9 predstavlja stupanj fibroze F1, Test Group 3,4,5 stupanj fibroze F2, Kontrolne skupine označene su kao Control Group 1- Control Group 3. Boje simboliziraju jačinu genske ekspresije, zelena boja označava minimalnu, a crvena maksimalnu gensku ekspresiju.

4.3. Transkriptomski profil ekspresije 84 odabrana gena kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F3/F4

Kod četiri bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F3/F4 te u tri zdrava ispitanika su analizirani transkriptomski profili. Ekspresija gena *MMP-8* ($p=0,024$) bila je statistički značajno povišena kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C u usporedbi sa zdravim kontrolama (Tablica 11, Slika 20 i 21). Iako je i ekspresija gena *COL-3A1*, *IL-13*, *DCN* i *SMAD-6* bila povišena, nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na zdrave osobe (Tablica 11). Ekspresija gena *CAV-1*, *CTGF*, *LOX*, *PLG* i *TIMP-3* bila je statistički značajno snižena kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C u odnosu na zdrave osobe ($p=0,004$; $p=0,043$; $p=0,044$; $p=0,019$; $p=0,019$), dok je ekspresija još šest gena bila snižena, no bez statističke značajnosti (Tablica 12, Slika 20 i 21).

Tablica 11. Povišena ekspresija gena kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stupnjem fibroze F3/F4.

| Oznaka gena | Stupanj promjene | p-vrijednost |
|----------------|------------------|--------------|
| <i>COL-3A1</i> | 2,34 | 0,426 |
| <i>DCN</i> | 2,86 | 0,346 |
| <i>IL-13</i> | 3,03 | 0,267 |
| <i>MMP-8</i> | 3,05 | 0,024 |
| <i>SMAD-6</i> | 2,18 | 0,081 |

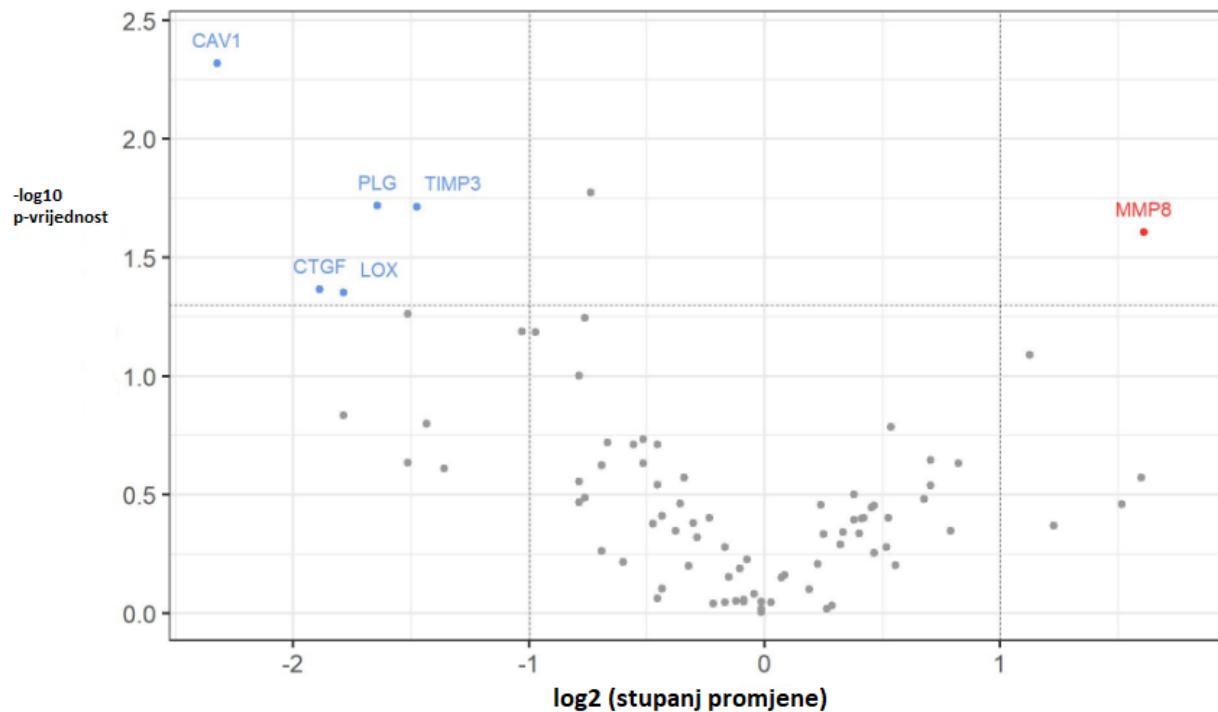
Kazalo: Crvenom bojom naznačena je statistički značajna razlika u ekspresiji *MMP-8* (gen za protein MMP-8), dok su ostali prikazani geni su bili povišeni, no bez statističke značajnosti: gen *COL-3A1* (engl. Collagen Type III Alpha 1 Chain), gen *DCN* (engl. Decorin), gen *IL-13* (gen za protein IL-13), Interleukin-13), gen *MMP-8* (gen za protein MMP-8), gen *SMAD-6* (gen za prijenosnik signala SMAD-6)

Tablica 12. Snižena ekspresija gena kod bolesnika s kroničnim hepatitom C i stupnjem fibroze F3/F4.

| Oznaka gena | Stupanj promjene | p-vrijednost |
|----------------|------------------|--------------|
| <i>CAV-1</i> | -5,01 | 0,004 |
| <i>CTGF</i> | -3,64 | 0,043 |
| <i>IL-5</i> | -2,85 | 0,232 |
| <i>ITGA-2</i> | -2,82 | 0,054 |
| <i>ITGB-8</i> | -2,57 | 0,244 |
| <i>LOX</i> | -3,40 | 0,044 |
| <i>MMP-1</i> | -3,41 | 0,146 |
| <i>PLG</i> | -3,12 | 0,019 |
| <i>SMAD-3</i> | -2,67 | 0,159 |
| <i>TGFBR-2</i> | -2,03 | 0,065 |
| <i>TIMP-3</i> | -2,78 | 0,019 |

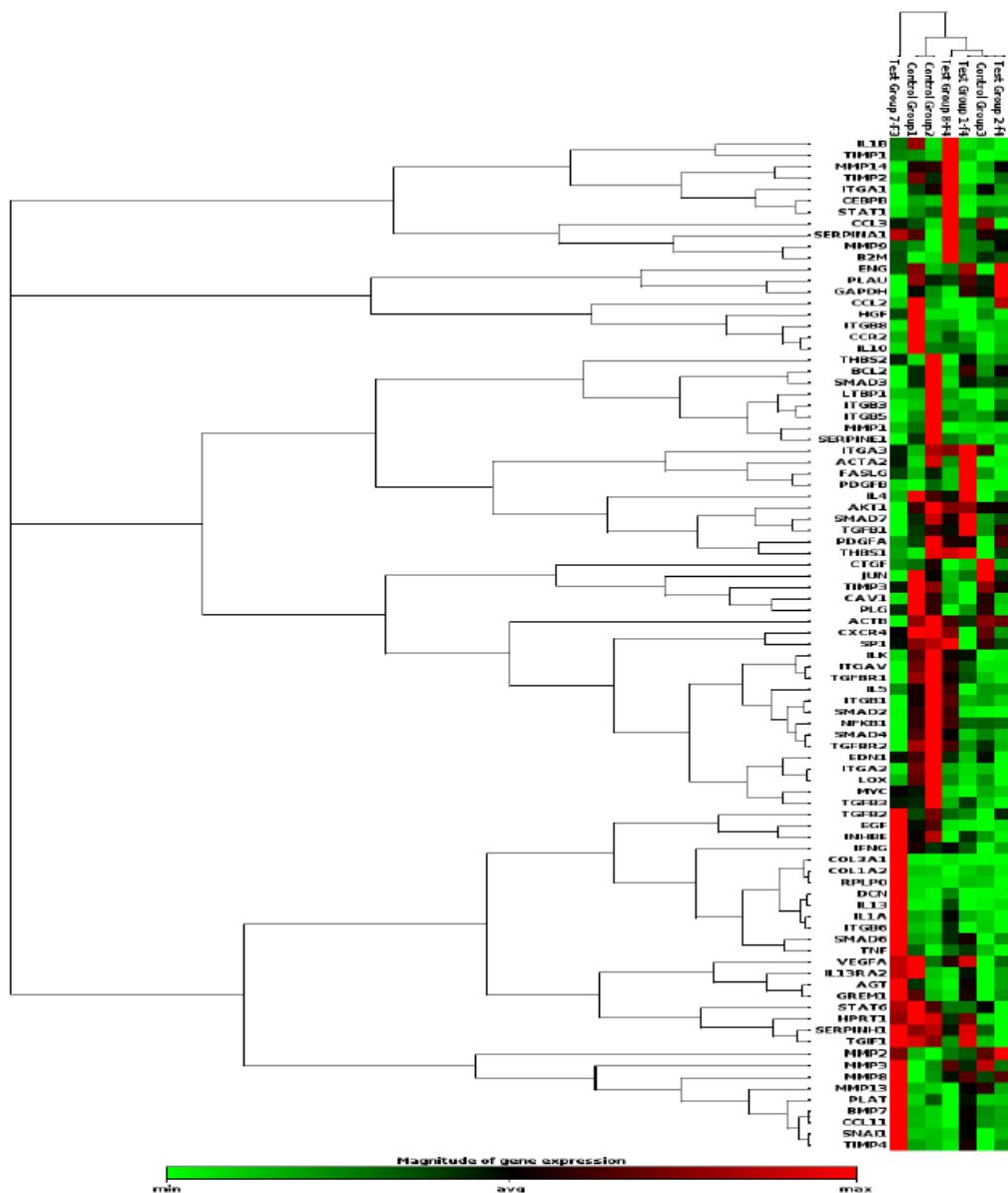
Kazalo: Plavom bojom naznačena je statistički značajna razlika u ekspresiji gena, a to su: gen *CAV-1* (engl. Caveolin-1), gen *CTGF* (engl. connective tissue growth factor), gen *LOX* (engl. lysyl oxidase), gen *PLG* (engl. Plasminogen), gen *TIMP-3* (engl. TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3), dok su ostali geni su bili sniženi no bez statističke značajnosti: gen *IL-5* (gen za protein IL-5), gen *ITGA-2* (engl. Integrin alpha-2), gen *ITGB-8* (engl. Integrin beta-8), gen *MMP-1* (engl. Matrix metalloproteinase-1), gen *SMAD-3* (engl. SMAD Family Member 3), gen *TGFBR-2* (engl. Transforming growth factor, beta receptor II).

F3+F4 vs. kontrolna skupina



Slika 20. Prikaz ekspresije 84 značajnih za patogenezu fibroze primjenom prikaza *Volcano plot*.

Na X-osi prikazana je \log_2 vrijednost stupnja promjene u ekspresiji gena za bolesnike s kroničnim hepatitisom C u usporedbi sa zdravim kontrolama, dok je $-\log_{10}$ p-vrijednost prikazana na Y-osi. Crvene točke simboliziraju pojačanu ekspresiju gena, plave točke označuju smanjenu ekspresiju gena, horizontalna linija pokazuje granicu statističke značajnosti $p=0,050$.



Slika 21. Grafički prikaz grupiranja ekspresije 84 gena značajnih za patogenezu fibroze jetre kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C sa stupnjem fibroze F3/F4.

Uzorci bolesnika s kroničnim hepatitisom C označeni su kao Test Group. Oznaka Test Group 7 predstavlja stupanj fibroze F3, Test Group 1,2 i 8 stupanj fibroze F4. Kontrolne skupine označene su kao Control Group 1 - Control Group 3. Boje simboliziraju jačinu genske ekspresije, zelena boja označava minimalnu, a crvena maksimalnu gensku ekspresiju.

4.4. Analiza koncentracija citokina i čimbenika rasta u kroničnom hepatitisu C

U uzorcima seruma 56 bolesnika (27 muškaraca, 48,2%) s kroničnim hepatitisom C određene su koncentracije 12 citokina (IL-6, TNF- α , IL-2, IFN-, IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-10) i 13 čimbenika rasta (Angiopoetin-2, EGF, EPO, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α , VEGF) u četiri vremenske točke (prije započinjanja antivirusnog liječenja, nakon 4 i 8 tjedana liječenja te nakon postizanja SVR-a) (Tablica 13). Žene s kroničnim hepatitisom C bile su starije životne dobi (medijan 63 godina, raspon 32-77 godina) u usporedbi s muškarcima (medijan 57 godina, raspon 43-78 godina). Koncentracije 12 citokina i 13 čimbenika rasta odredene su i u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika (N=15). Medijan viremije prije započinjanja liječenja iznosio je 923 808 kopija RNA HCV-a/mL seruma (Tablici 13).

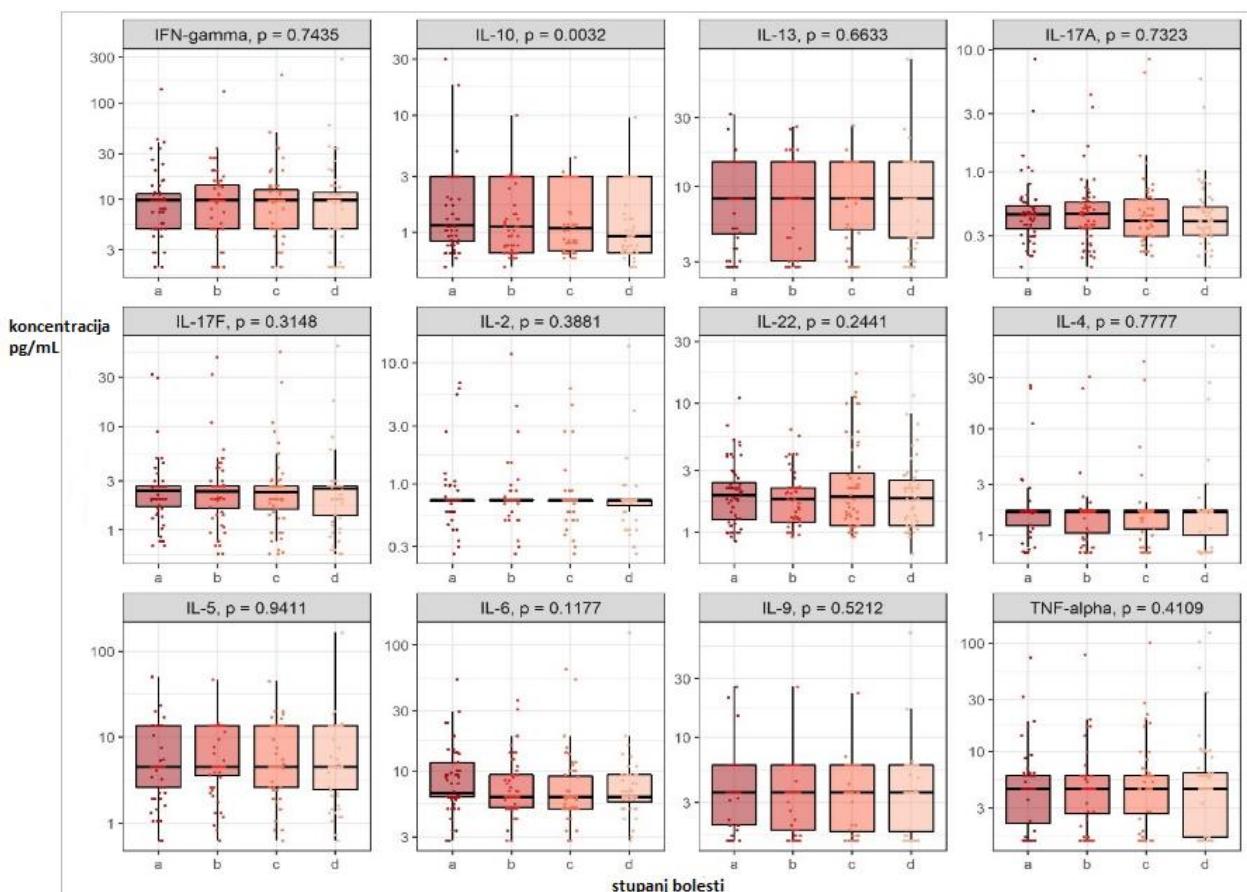
Tablica 13. Odabrani demografski podatci i rezultati molekularnih analiza kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C i zdravih osoba

| | Bolesnici s kroničnim hepatitisom C (N=56) | Zdravi ispitanici (N=15) | |
|--|---|---------------------------------|------------------|
| Medijan dobi (raspon godina) | 61 (32-78) | 39 (25-59) | |
| Spol (raspon godina) | 27 M (43-78) 29 Ž (32-77) | 13 Ž (28-54) 2 M (25-59) | |
| Viremija (broj kopija RNA HCV-a po ml seruma) | 923 808 (2 463-9 550 925) | Nije primjenjivo | |
| Genotip/podtip HCV-a (N) | 1a 1b 2 2b 3a 4 | 4 27 2 1 11 1 | Nije primjenjivo |

Kazalo: M-muški spol; Ž-ženski spol

Usporedba koncentracije odabranih citokina u bolesnika s kroničnim hepatitisom C u četiri vremenske točke primjenom Friedmanovog testa pokazala je statistički značajnu razliku u

koncentraciji IL-10 (medijan 1,18 pg/mL prije liječenja, raspon 0,51-18,0; medijan 1,12 pg/mL nakon 4 tjedna, raspon 0,51-10,0; medijan 1,09 pg/mL nakon 8 tjedana, raspon 0,61-4,37; medijan 0,93 pg/mL nakon postizanja SVR-a, raspon 0,51-9,53), dok razlike u koncentracijama ostalih citokina (IFN- γ , IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-2, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, TNF- α) nisu bile statistički značajne (Slika 22). Koncentracije svih mjerjenih citokina bile su izuzetno niske.

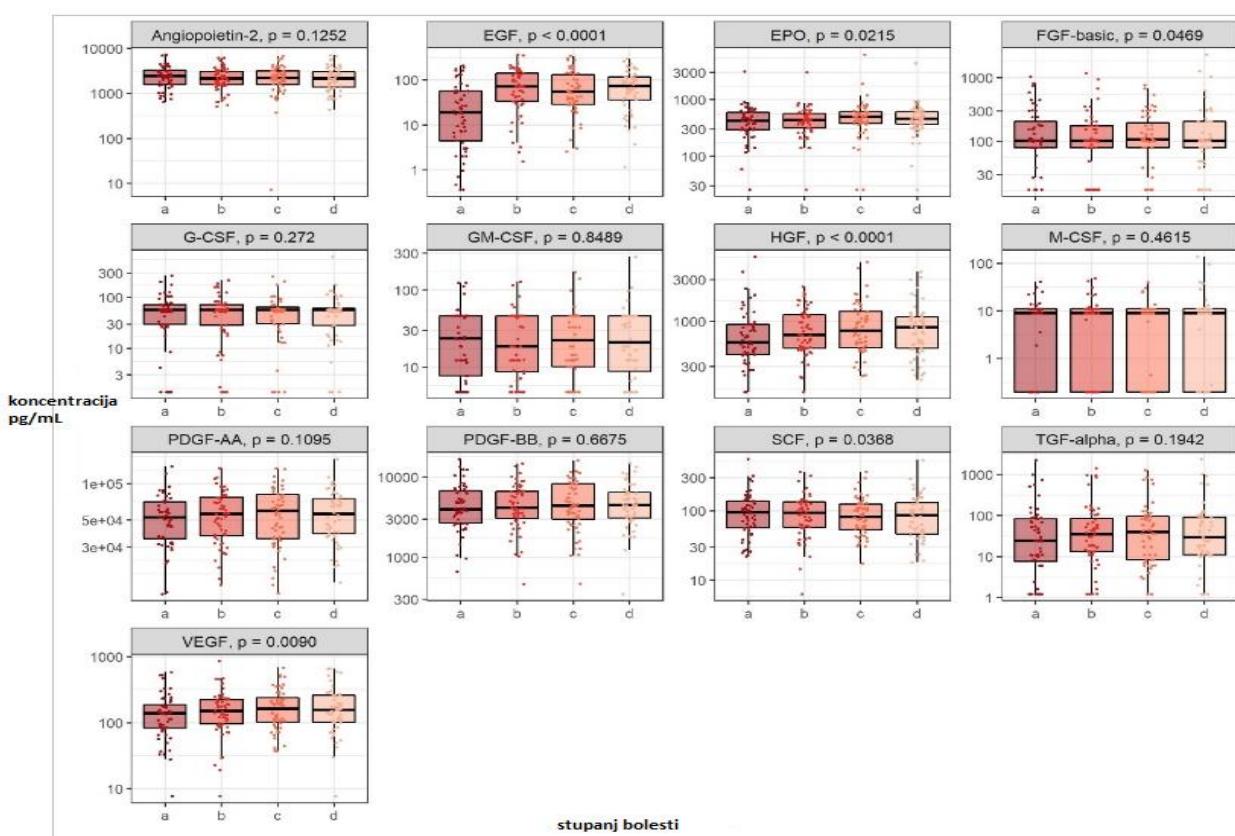


Slika 22. Koncentracija citokina kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije antivirusnog liječenja, tijekom liječenja te nakon izlječenja

Kazalo: a (prije liječenja), b (nakon 4 tjedna liječenja), c (nakon 8 tjedana liječenja), d (nakon postizanja trajnog virološkog odgovora). Crna horizontalna linija predstavlja median rasподјеле, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila rasподјеле. Y-os je u logaritamskoj skali. Prikazane su p-vrijednosti Friedmanova testa.

Usporedba koncentracije odabranih čimbenika rasta kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C u četiri vremenske točke primjenom Friedmanovog testa pokazala je statistički značajnu razliku u koncentracijama profibrotičkih čimbenika rasta: EGF (medijan 18,92 pg/mL prije liječenja, raspon 0,36-211,15; medijan 71,3 pg/mL nakon 4 tjedna, raspon 1,53-351,05, medijan 54,71 pg/mL nakon 8 tjedana, raspon 2,57-343,47; medijan 73,39 pg/mL nakon postizanja SVR-a, raspon 1,16-300,3), EPO

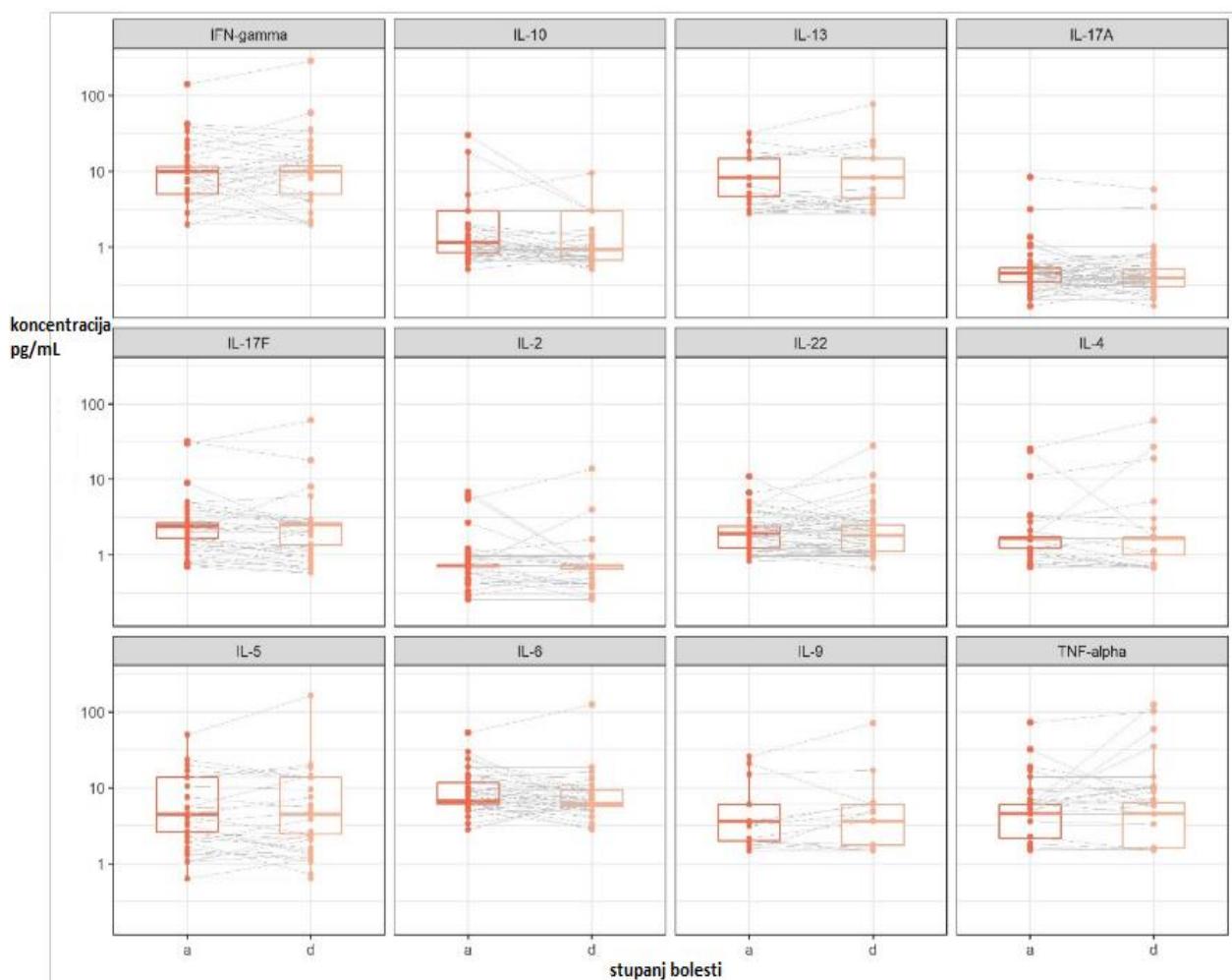
(medijan 417,83 pg/mL prije liječenja, raspon 25,48-3127,96; medijan 434,32 pg/mL nakon 4 tjedna, raspon 25,48-3046,19; medijan 491,01 pg/mL nakon 8 tjedana, raspon 25,48-6234,97; medijan 456,21 pg/mL nakon postizanja SVR-a, raspon 25,48-4395,38), HGF (medijan 568,3 pg/mL prije liječenja, raspon 153,44-2006,89; medijan 698,52 pg/mL nakon 4 tjedna, raspon 153,44-2515,33; medijan 775,35 pg/mL nakon 8 tjedana, raspon 233,33-4808,05; medijan 848,70 pg/mL nakon postizanja SVR-a, raspon 212,54-3711,63) i VEGF (medijan 139,63 pg/mL prije liječenja, raspon 7,72-591,36; medijan 151,05 pg/mL nakon 4 tjedna, raspon 7,72-864,32; medijan 163,1 pg/mL nakon 8 tjedana, raspon 37,18-691,44; medijan 156,32 pg/mL nakon postizanja SVR-a, raspon 7,72-668,21). Uz to, u četiri vremenske točke pokazana je statistički značajna razlika u koncentracijama antifibrotičkog čimbenika rasta SCF-a (medijan 96,44 pg/mL prije liječenja, raspon 21,92-562,94; medijan 93,84 pg/mL nakon 4 tjedna, raspon 6,32-367,24; medijan 82,93 pg/mL nakon 8 tjedana, raspon 17,41-365,93; medijan 86,45 pg/mL nakon postizanja SVR-a, raspon 18,23-539,65). Razlike u koncentracijama ostalih čimbenika rasta (Ang-2, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, TGF- α) u četiri ispitivane točke nisu bile statistički značajne (Slika 23).



Slika 23. Koncentracija čimbenika rasta kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije antivirusnog liječenja, tijekom liječenja te nakon izlječenja

Kazalo: a (prije liječenja), b (nakon 4 tjedna liječenja), c (nakon 8 tjedana liječenja), d (nakon postizanja trajnog virološkog odgovora). Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je u logaritamskoj skali. Prikazane su p-vrijednosti Friedmanova testa.

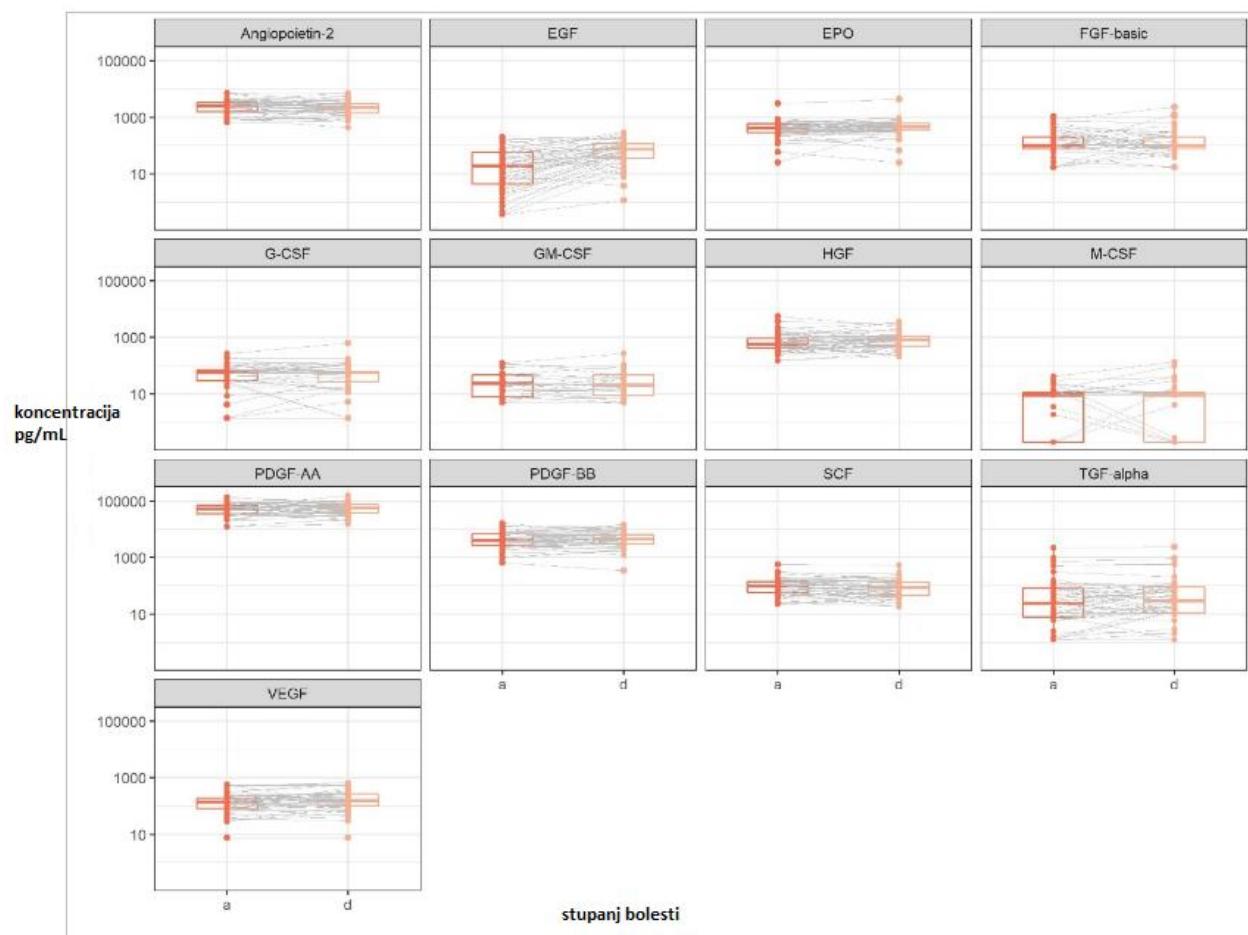
Usporedba koncentracija citokina prije započinjanja liječenja i nakon izlječenja tj. postizanja SVR-a. Promjene u koncentracijama citokina u pojedinih bolesnika prikazane su linijama pomoću kutijastog dijagrama (engl. *boxplot*, Slika 24). Rezultati ove analize pokazali su statistički značajno smanjenje koncentracije IL-10 u dvije analizirane točke (medijani 1,15 i 0,93 pg/mL, $p=0,010$). Primjenom Wilcoxonovog testa dokazana je i statistički značajno smanjenje koncentracije prouplavnog citokina IL-6 u dvije analizirane točke (medijani 6,65 i 6,20 pg/mL, $p=0,031$). Razlike u koncentracijama ostalih citokina u promatranim vremenskim točkama nisu bile statistički značajne.



Slika 24. Koncentracija citokina kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije antivirusnog liječenja i nakon izlječenja

Kazalo: a (prije liječenja), d (nakon postizanja trajnog virološkog odgovora), rezultati su prikazani u obliku linija pomoću kutijastog dijagrama (engl. *paired boxplot*), Wilcoxonov test

Prikaz promjena čimbenika rasta nakon postizanja SVR-a i prije početka liječenja prikazana je linijama promjena za svakog pojedinog bolesnika pomoću kutijastog dijagrama (engl. *paired boxplot*) što je prikazano na Slici 25. Rezultati ove analize pokazali su statistički značajno povećanje koncentracije čimbenika rasta kod EGF (medijani 18,92 i 73,39 pg/mL, $p<0,001$), HGF (medijani 568,3 i 848,7 pg/mL, $p= 0,01$) i VEGF (medijani 139,7 i 156,3 pg/mL, $p<0,001$). Razlike u koncentracijama ostalih čimbenika rasta u promatranim vremenskim točkama nisu bile statistički značajne.

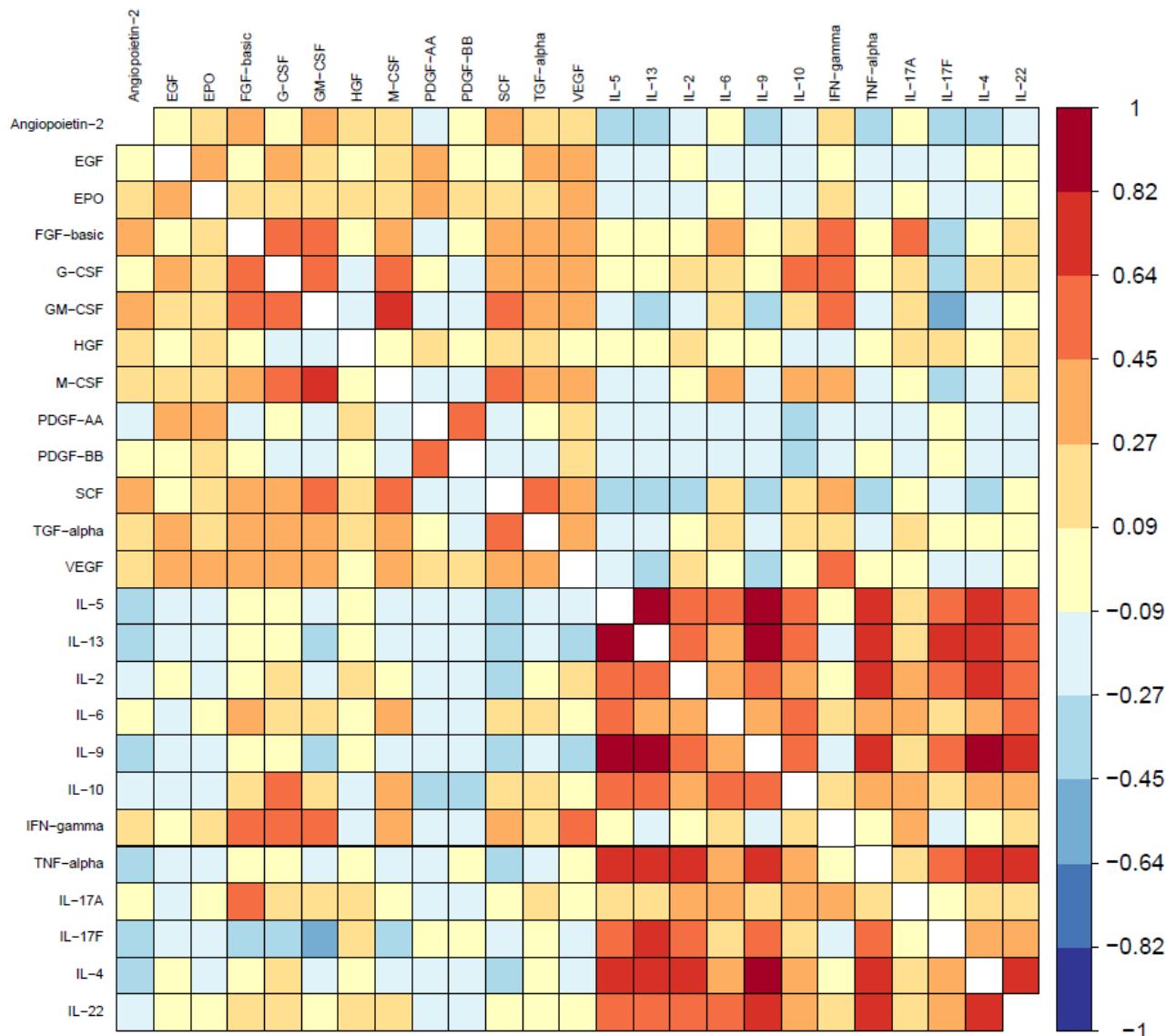


Slika 25. Koncentracija čimbenika rasta kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije antivirusnog liječenja i nakon izlječenja

Kazalo: a (prije liječenja), d (nakon postizanja trajnog virološkog odgovora), rezultati su prikazani u obliku linija pomoću kutijastog dijagrama (engl. *paired boxplot*)

Na Slici 26. prikazana je korelacijska matrica citokina i faktora rasta prije započinjanja liječenja.

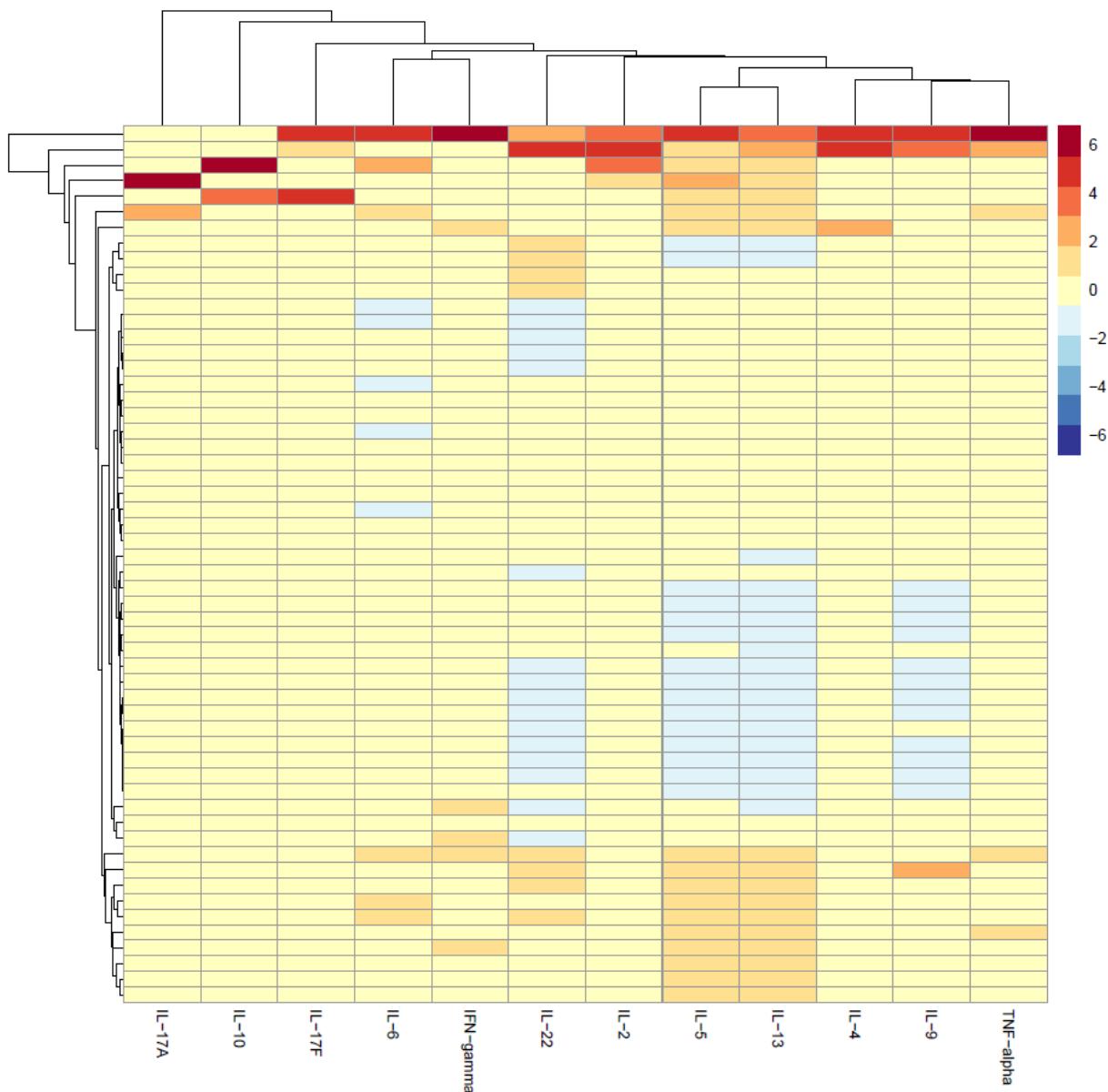
Jaku međusobnu povezanost pokazuje citokin IFN- γ s čimbenicima rasta FGF-basic ($r=0,57$, $p<0,001$), G-CSF ($r=0,46$, $p<0,001$), GM-CSF ($r=0,50$, $p<0,001$) te citokin IL-17A s čimbenikom rasta FGF-basic ($r=0,47$, $p<0,001$).



Slika 26. Korelacijska matrica analiziranih citokina i čimbenika rasta prije započinjanja liječenja.

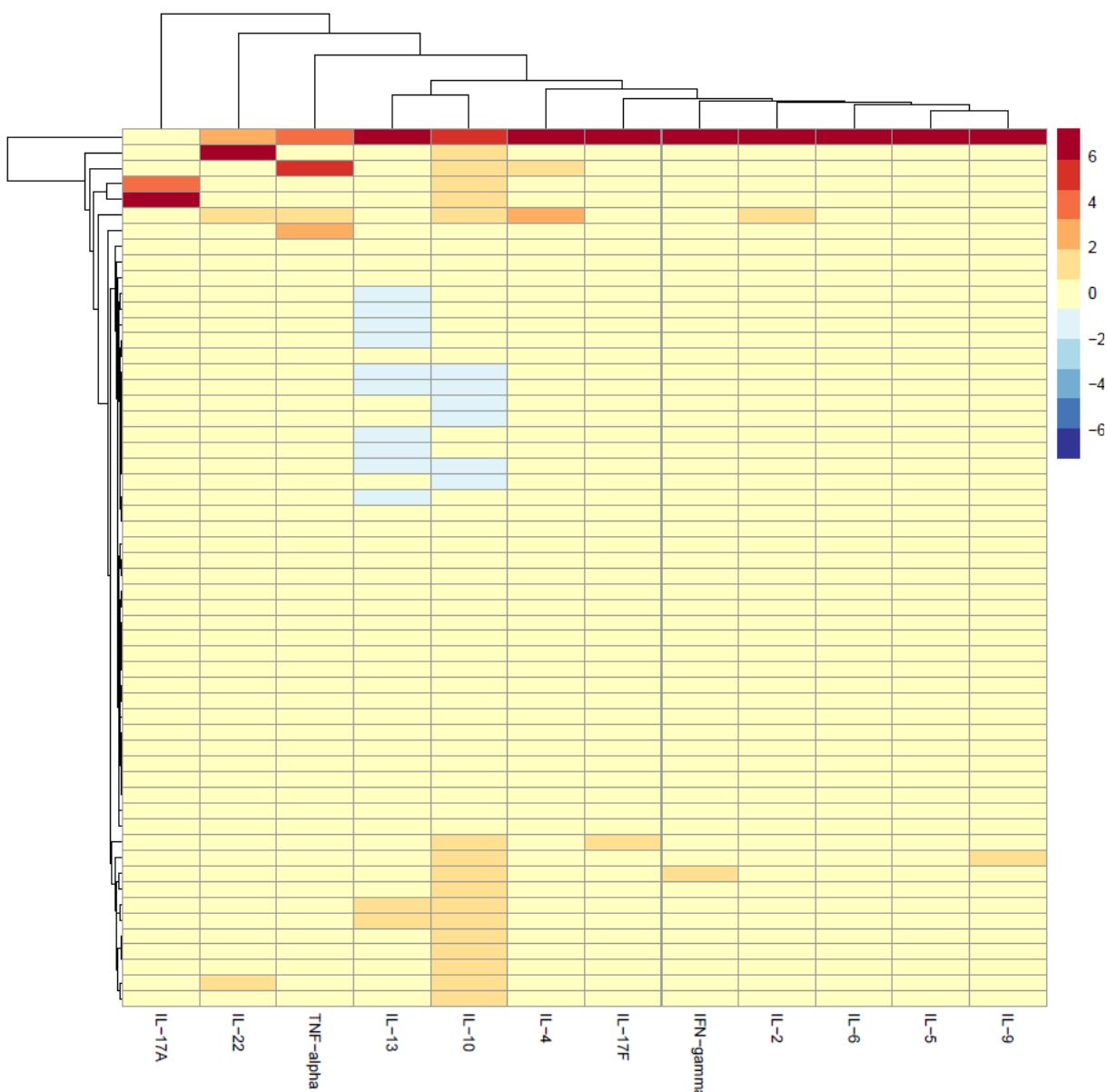
Svako polje odgovara Spearmanovu korelacijskom koeficijentu između dva pojedina parametra. Crvena boja pokazuje jaču međusobnu povezanost, dok plava boja prikazuje slabu međusobnu povezanost između citokina i čimbenika rasta prije početka liječenja infekcije HCV-a.

Na Slici 27. prikazana je toplinska mapa citokina prije započinjanja liječenja kronične infekcije hepatitisom C. Izuzev dva ispitanika koji odskaču s vrijednostima koncentracija, što je označeno crvenom bojom, za ostale ispitanike je vidljivo da su u srednjem rasponu vrijednosti koncentracije većine citokina.



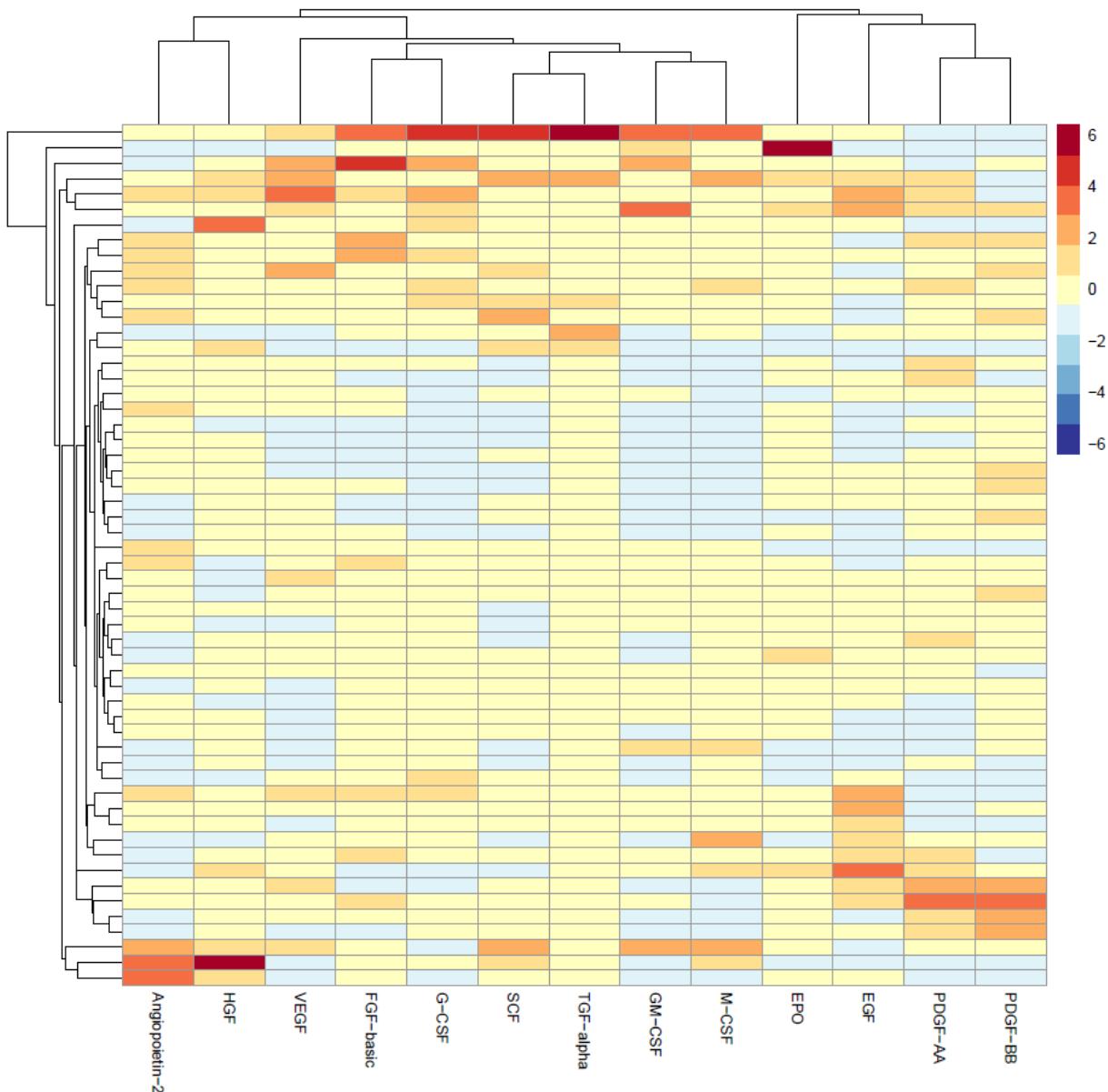
Slika 27. Toplinska mapa analiziranih citokina prije započinjanja liječenja kliničnog hepatitis C. Bolesnici su klasterirani metodom hijerarhijskog klasteriranja (average linkage). Skala odgovara broju standardnih devijacija za koji se određeno polje razlikuje od aritmetičke sredine pripadajućeg stupca (vrijednost z).

Na Slici 28. prikazana je toplinska mapa citokina nakon postizanja trajnog virološkog odgovora. Izuzev jednog ispitanika koji odskače s vrijednostima koncentracija što je označeno crvenom bojom, za ostale ispitanike je vidljivo da su u srednjem rasponu vrijednosti koncentracije većine citokina.



Slika 28. Toplinska mapa analiziranih citokina nakon postizanja trajnog virološkog odgovora. Bolesnici su klasterirani metodom hijerarhijskog klasteriranja (average linkage). Skala odgovara broju standardnih devijacija za koji se određeno polje razlikuje od aritmetičke sredine pripadajućeg stupca (vrijednost z).

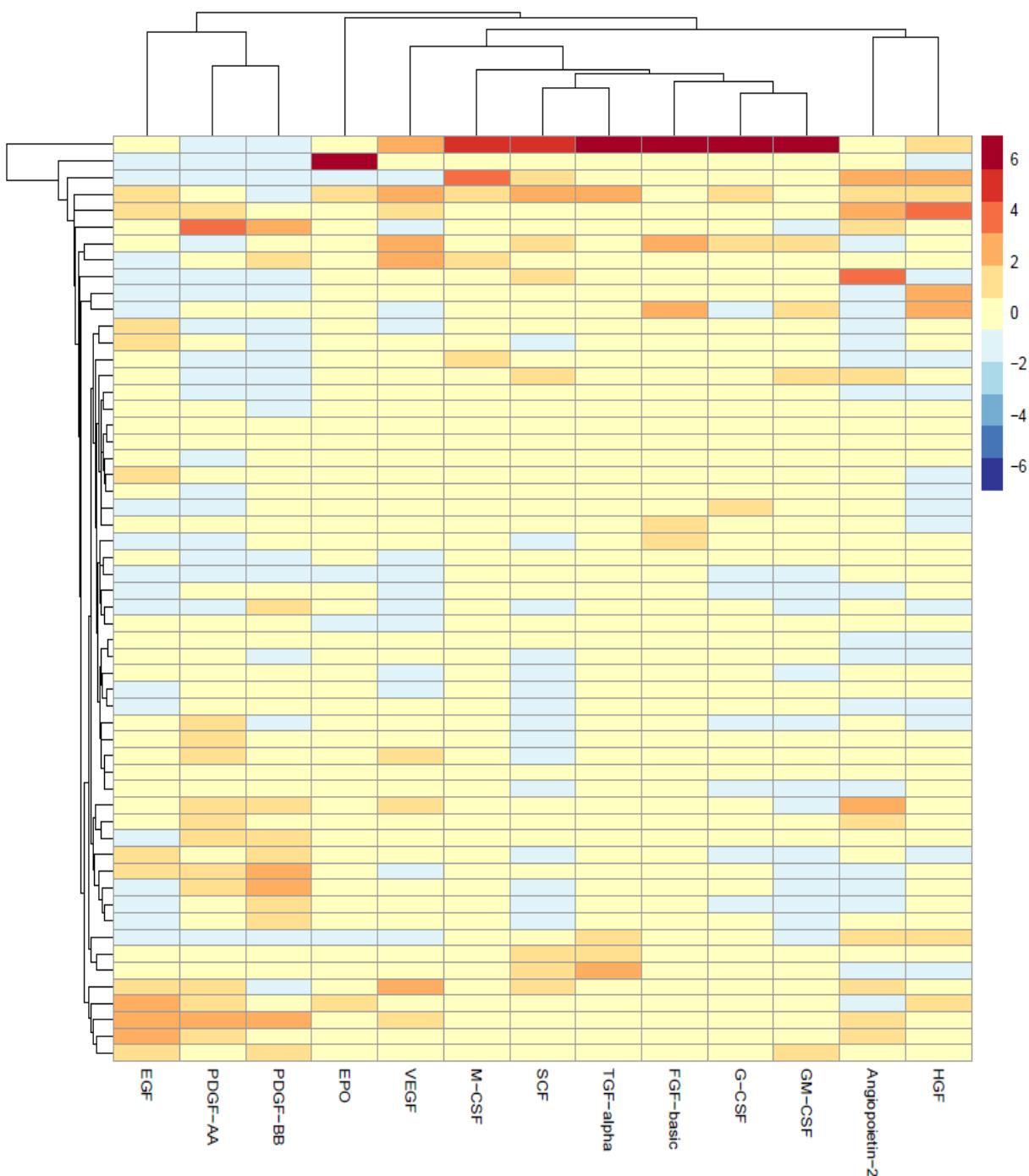
Na Slici 29. prikazana je toplinska mapa čimbenika rasta prije započinjanja liječenja kroničnog hepatitisa C. Vidljivo je da se koncentracije čimbenika rasta kod ispitanika razlikuju za svakog pojedinog ispitanika.



Slika 29. Toplinska mapa analiziranih čimbenika rasta prije započinjanja liječenja kroničnog hepatitisa C.

Bolesnici su klasterirani metodom hijerarhijskog klasteriranja (average linkage). Skala odgovara broju standardnih devijacija za koji se određeno polje razlikuje od aritmetičke sredine pripadajućeg stupca (vrijednost z).

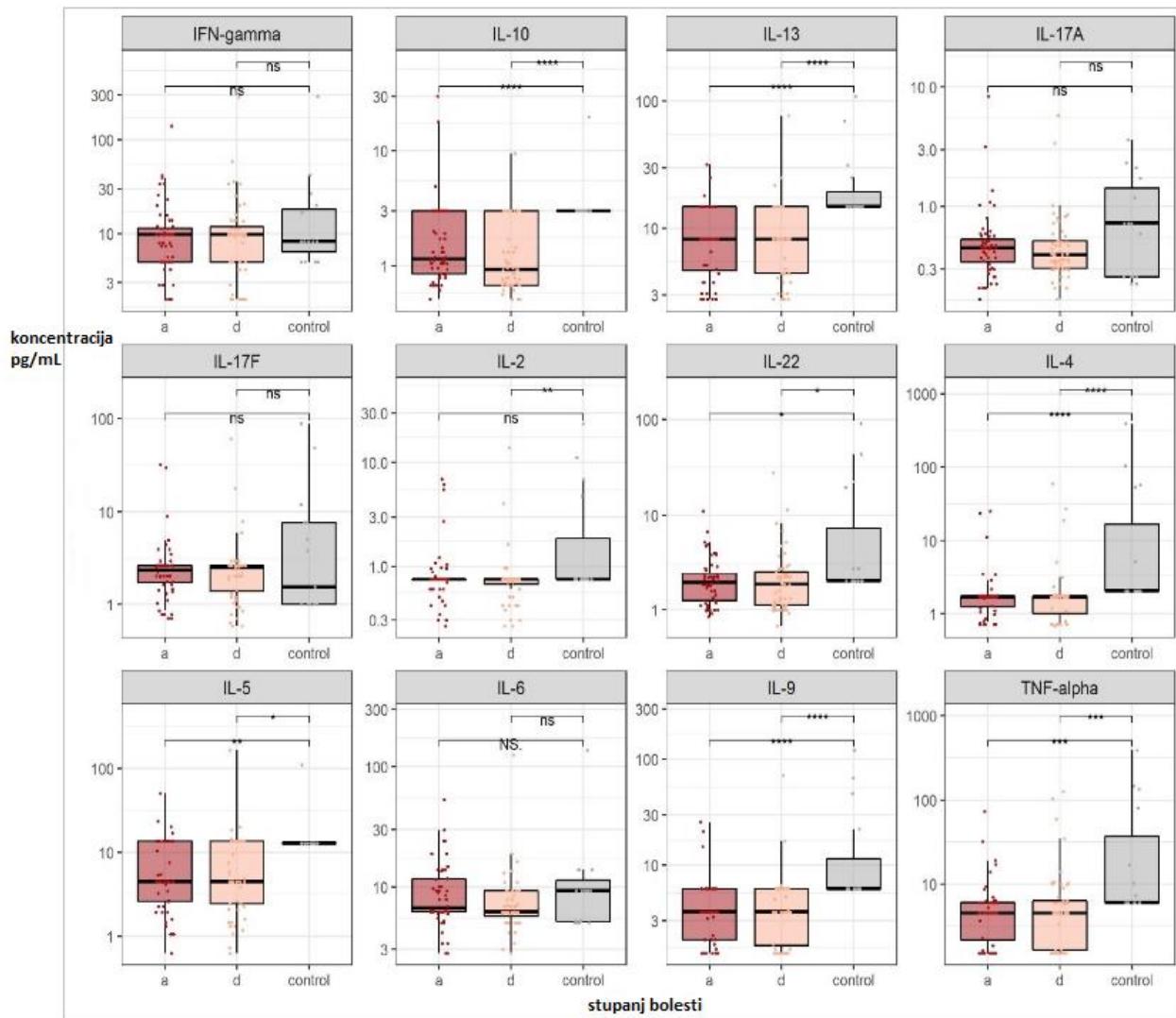
Na Slici 30. prikazana je toplinska mapa čimbenika rasta nakon postizanja trajnog virološkog odgovora. Vidljivo je da se koncentracije čimbenika rasta kod ispitanika razlikuju za svakog pojedinog ispitanika.



Slika 30. Toplinska mapa analiziranih čimbenika rasta nakon postizanja trajnog virološkog odgovora. Bolesnici su klasterirani metodom hijerarhijskog klasteriranja (average linkage). Skala odgovara broju standardnih devijacija za koji se određeno polje razlikuje od aritmetičke sredine pripadajućeg stupca (vrijednost z).

Na Slici 31. je pomoću Mann-Whitney U testa prikazana usporedba koncentracija citokina prije započinjanja liječenja kroničnog hepatitisa C i nakon postizanja SVR-a s kontrolnom skupinom. Statistički značajna razlika između kontrolne skupine i prije započinjanja liječenja dokazana je kod protuupalnog citokina IL-10 (medijani 3,0 i 1,15 pg/mL, $p<0,001$), Th2 citokina (IL-13 (14,87 i 8,23 pg/mL, $p<0,001$), IL-4 (medijani 2,0 i 1,67 pg/mL, $p<0,001$) i IL-5 (medijani 12,8 i 4,5 pg/mL, $p=0,010$)), Th17 citokina IL-22 (medijani 2,0 i 1,9 pg/mL, $p=0,040$), Th9 citokina IL-9 (medijani 6,0 i 3,6 pg/mL, $p<0,001$) i proupalnog citokina TNF- α (medijani 6,0 i 4,5 pg/mL, $p<0,001$).

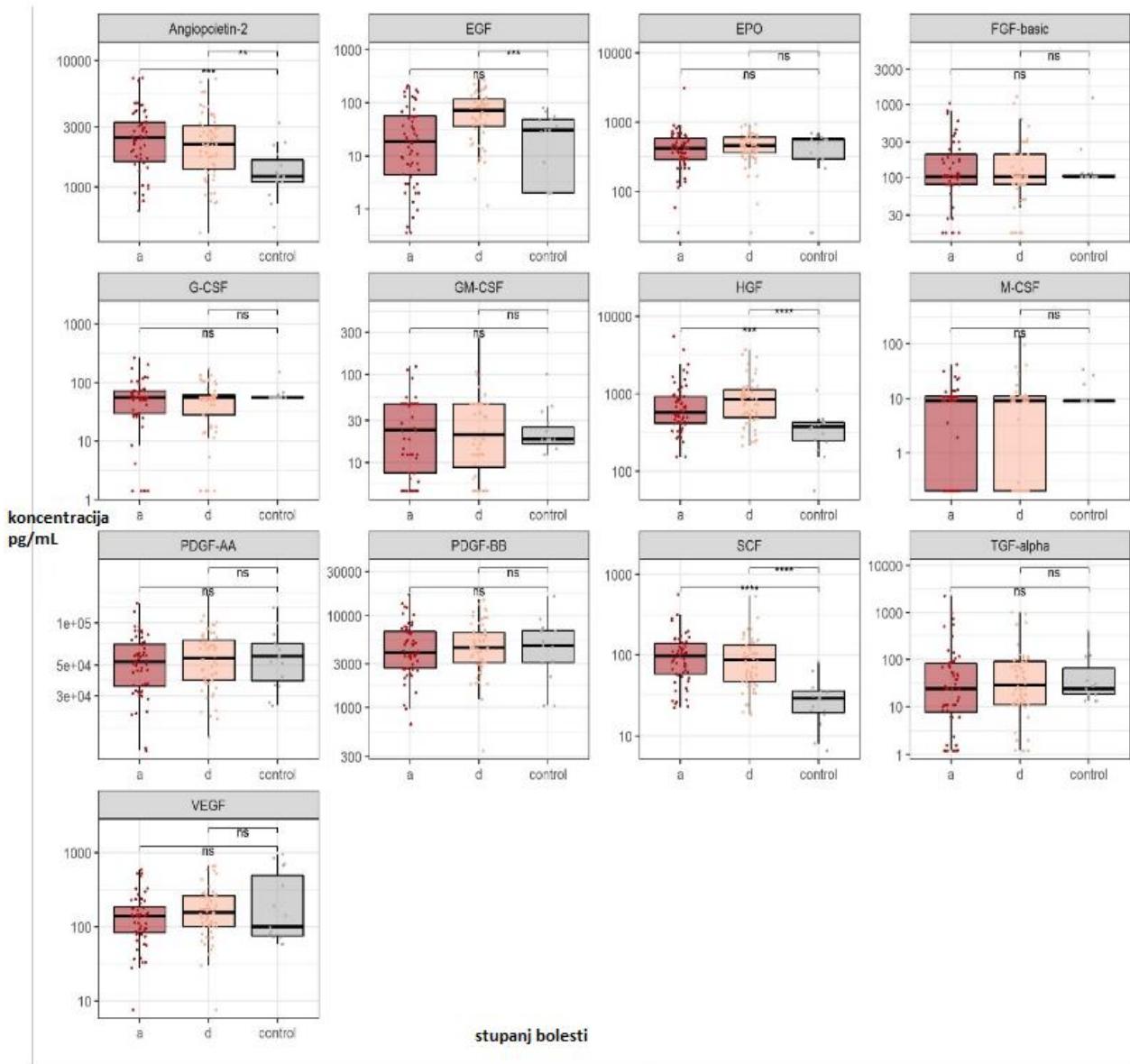
Statistički značajna razlika između kontrolne skupine i nakon postizanja SVR-a dokazana je kod protuupalnog citokina IL-10 (medijani 3,0 i 0,93 pg/mL, $p<0,001$), Th2 citokina (IL-13 (medijani 14,87 i 8,23 pg/mL, $p<0,001$), IL-4 (medijani 2,0 i 1,67 pg/mL, $p<0,001$) i IL-5 (medijani 12,84 i 4,5 pg/mL, $p=0,020$)), Th17 citokina IL-22 (medijani 2,0 i 1,84 pg/mL, $p=0,030$), Th1 citokina IL-2 (medijani 0,73 i 0,73 pg/mL, $p=0,010$), Th9 citokina IL-9 (medijani 6,0 i 3,6 pg/mL, $p<0,001$) i proupalnog citokina TNF- α (medijan 6,0 i 4,5 pg/mL, $p<0,001$).



Slika 31. Usporedba koncentracija analiziranih citokina prije početka liječenja i nakon izlječenja s kontrolnom skupinom.

Kazalo: Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je logaritamski skalirana. Mann-Whitney U test, ns: nije značajno, *: $p<0,0500$, **: $p<0,0100$, ***: $p<0,0010$, ****: $p<0,0001$.

Na Slici 32. je pomoću Mann-Whitney U testa prikazana usporedba koncentracija čimbenika rasta prije početka liječenja i nakon izlječenja s kontrolnom skupinom. Statistički značajna razlika između kontrolne skupine i prije početka liječenja dokazana je kod Ang-2 (medijani 374,69 i 2454,88 pg/mL, $p<0,001$), HGF-a (medijani 374,69 i 568,3 pg/mL, $p<0,001$) i SCF-a (medijani 28,55 i 96,44 pg/mL, $p<0,001$), dok je statistički značajna razlika između kontrolne skupine i nakon postizanja SVR-a uočena kod Ang-2 (medijani 374,69 i 848,7 pg/mL, $p<0,001$), EGF-a (medijani 30,81 i 73,49, $p<0,001$), HGF-a (medijani 374,69 i 848,70 pg/mL, $p<0,001$) i SCF-a (medijani 28,55 i 86,45 pg/mL, $p<0,001$).



Slika 32. Usporedba koncentracija analiziranih čimbenika rasta prije početka liječenja i nakon izlječenja s kontrolnom skupinom.

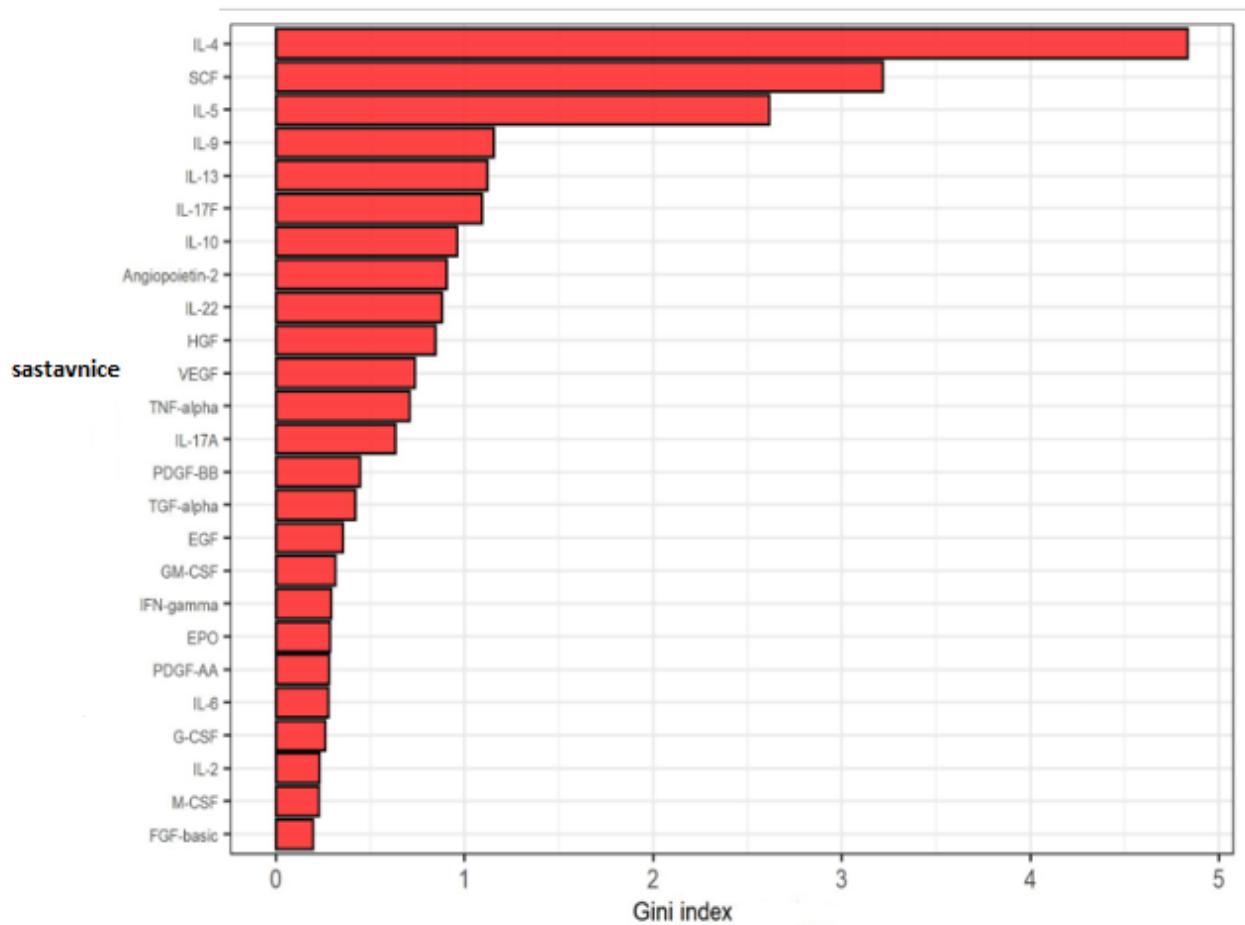
Kazalo: Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je logaritamski skalirana. Mann-Whitney U test, ns: nije značajno, **: $p<0,0100$, ***: $p<0,0010$, ****: $p<0,0001$.

U Tablici 14. prikazana je podjela ispitanika prije početka liječenja i kontrolne skupine pomoću modela slučajnih šuma (engl. *random forest model*). Pomoću modela slučajnih šuma dobiveno je da je 55 ispitanika točno razvrstano kao bolesnici s CHC-om te 13 kontrolnih uzoraka kao kontrole, dok je pogrešno razvrstan jedan bolesnik s CHC-om kao kontrola te dvije kontrole kao bolesnici s CHC-om.

Tablica 14. Podjela bolesnika prije početka liječenja i kontrolne skupine pomoću modela slučajnih šuma (engl. *random forest model*). Dana je matrica točnosti (engl. *confusion matrix*) temeljena na out of bag (OOB) bolesnicima. Broj drveća = 10 000, broj komponenti korištenih za svako razdvajanje = 5, OOB error = 4,23%, pogreška za bolesnike = 1,79%, pogreška za kontrolu = 13,33%. Interpretacija: 55 bolesnika točno je razvrstano kao bolesnici i 13 kontrola su točno razvrstane kao kontrole. Jedan bolesnik je pogrešno razvrstan kao kontrola i dvije kontrole su pogrešno razvrstane kao bolesnici.

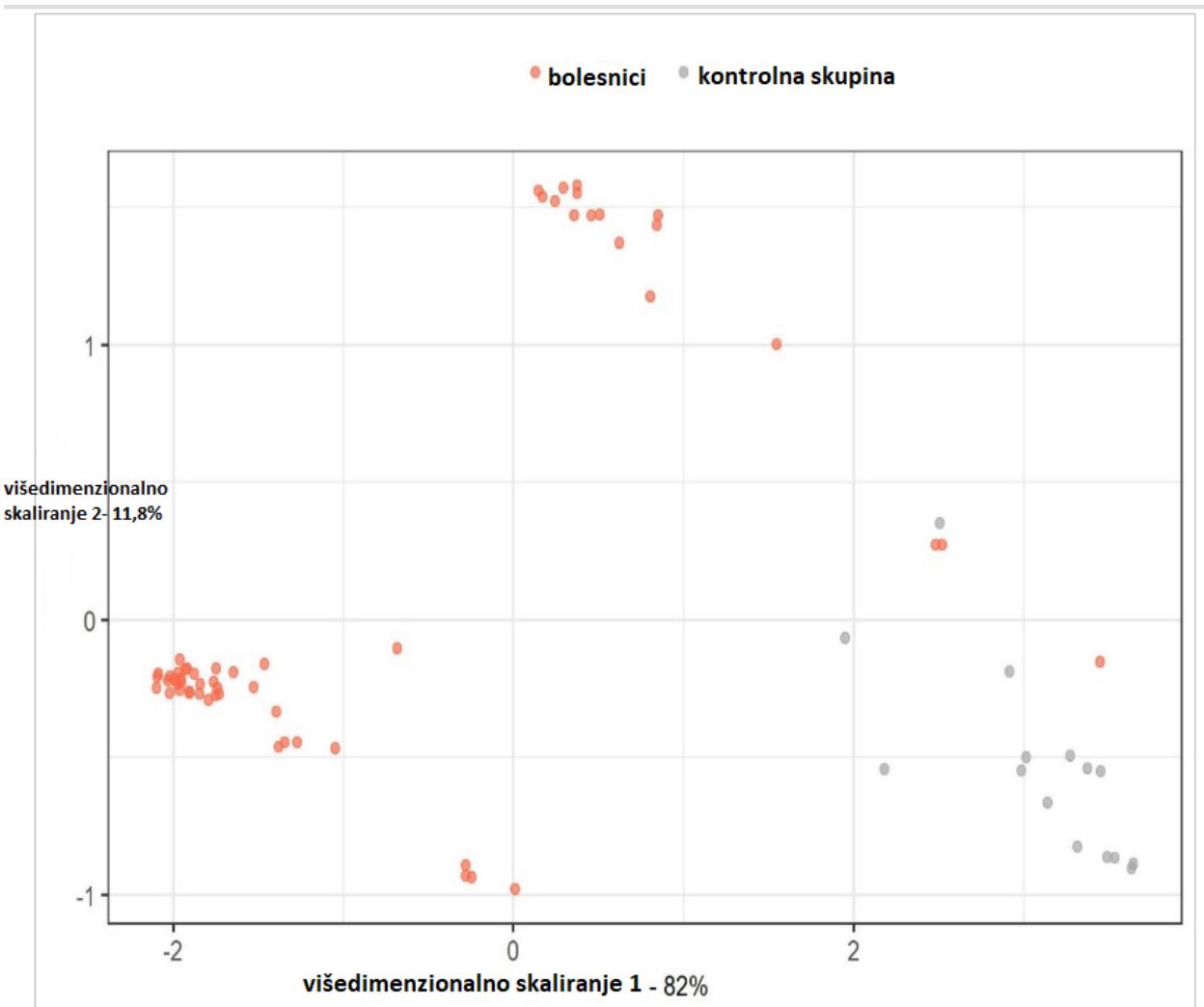
| | Točno razvrstano | Netočno razvrstano |
|--------------------------|------------------|--------------------|
| Bolesnici (%) | 98% | 2% |
| Kontrolni ispitanici (%) | 87% | 13% |

Na Slici 33. prikazana je važnost sastavnici u razvrstavanju bolesnika prije početka liječenja te kod kontrolne skupine. Pokazana je značajno povećana koncentracija IL-4, SCF i IL-5 kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C u usporedbi s kontrolnom skupinom.



Slika 33. Važnost sastavnici u klasifikaciji bolesnika prije početka liječenja te kontrolne skupine. Važnost sastavnici procijenjena je prosječnim smanjenjem gini index-a (mjera za točno razvrstavanje, što je niže to je razvrstavanje točnije) pri razdvajanju bolesnika i kontrola pomoću svake sastavnice.

Na Slici 34. prikazano je višedimenzionalno skaliranje pomoću modela slučajnih šuma kao razvrstavanja bolesnika prije početka liječenja i kontrolne skupine.



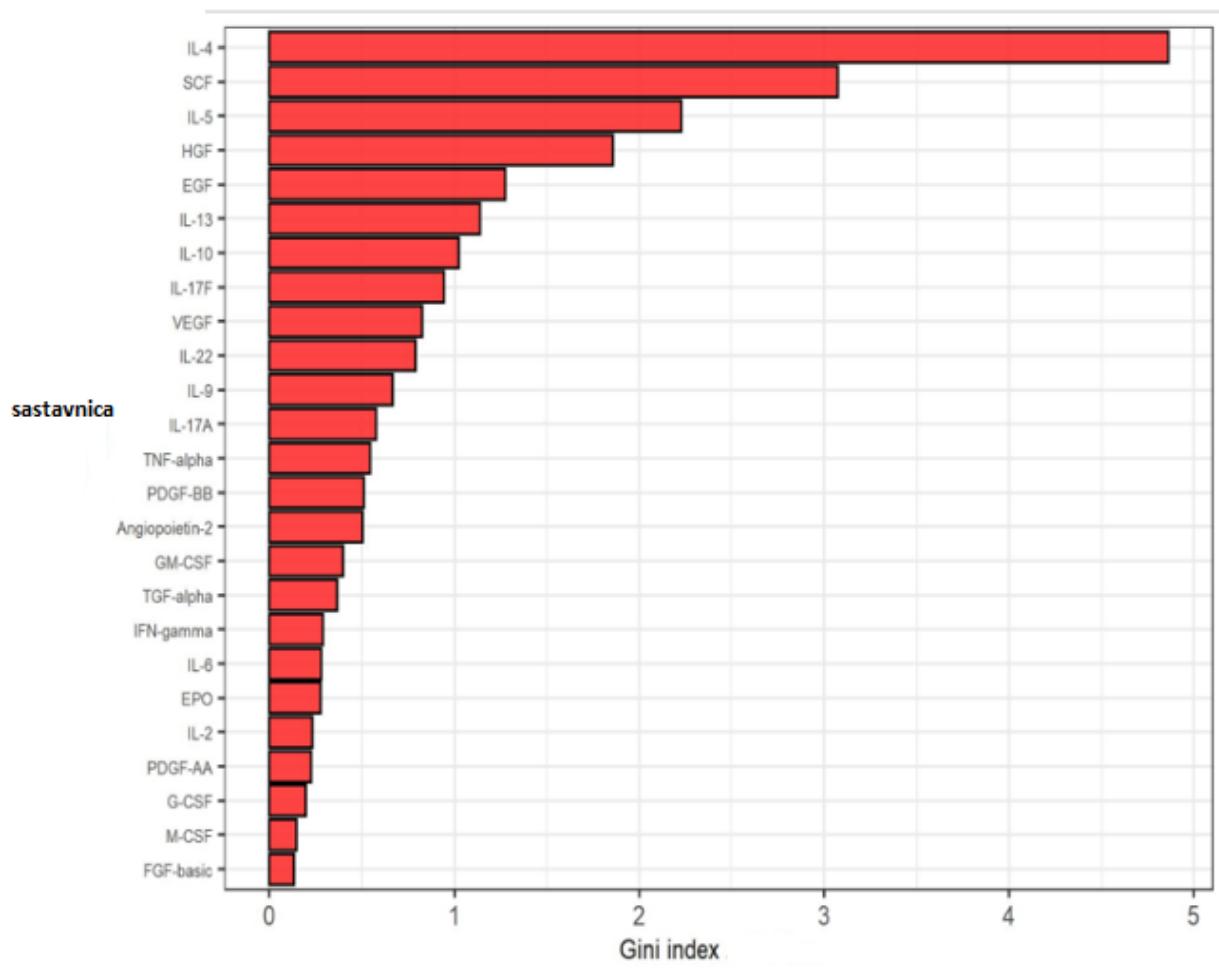
Slika 34. Višedimenzionalno skaliranje modela slučajnih šuma razvrstavanja bolesnika prije početka liječenja (narančasta boja) i kontrolne skupine (siva boja). Udaljenost pojedinih bolesnika i kontrola temelji se na matrici udaljenosti dobivenoj u modelu slučajnih šuma.

U Tablici 15. prikazano je razvrstavanje bolesnika nakon izlječenja i kontrolne skupine pomoću modela slučajnih šuma (engl. *random forest model*). Pomoću modela slučajnih šuma dobiveno je da je 54 ispitanika točno razvrstano kao bolesnici s CHC-om te 13 kontrolnih uzoraka kao kontrole, dok su pogrešno razvrstana dva bolesnika s CHC-om kao kontrole te dvije kontrole kao bolesnici s CHC-om.

Tablica 15. Razvrstavanje ispitanika nakon izlječenja i kontrolne skupine pomoću modela slučajnih šuma. Dana je matrica točnosti (engl. *confusion matrix*) temeljena na out of bag (OOB) pacijentima. Broj drveća = 10 000, broj komponenti korištenih za svako razdvajanje = 5, OOB error = 5,63%, pogreška za bolesnike = 3,57%, pogreška za kontrolu = 13,33%. Interpretacija: 54 bolesnika s CHC-om točno su razvrstani kao bolesnici i 13 kontrola su točno razvrstane kao kontrole. Dva bolesnika s CHC-om su pogrešno razvrstana kao kontrole i dvije kontrole su pogrešno razvrstane kao bolesnici.

| | Točno razvrstano | Netočno razvrstano |
|--------------------------|------------------|--------------------|
| Bolesnici (%) | 96% | 4% |
| Kontrolni ispitanici (%) | 87% | 13% |

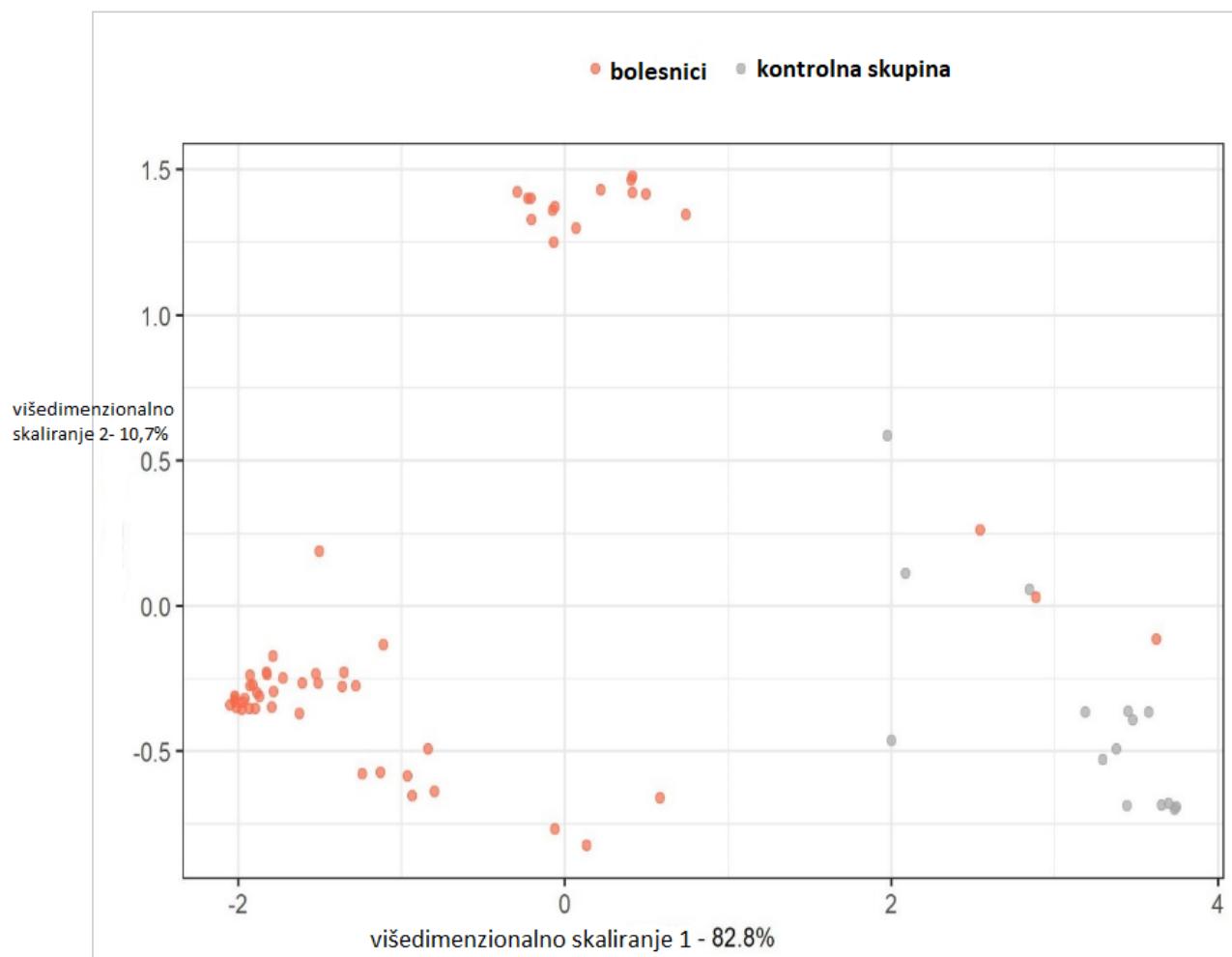
Na Slici 35. je prikazana važnost sastavnici u razvrstavanju bolesnika nakon izlječenja te kod kontrolne skupine. Dokazana je značajna razlika u IL-4, SCF i IL-5 između te dvije skupine ispitanika.



Slika 35. Važnost sastavnici u razvrstavanju bolesnika nakon izlječenja te kontrolne skupine.

Važnost sastavnici procijenjena je prosječnim smanjenjem gini index-a (mjera za točno razvrstavanje, što je niže to je razvrstavanje točnije) pri razdvajanju bolesnika s HCV-om i kontrola pomoću svake sastavnice.

Na Slici 36. prikazano je višedimenzionalno skaliranje pomoću modela slučajnih šuma kao razvrstavanja bolesnika nakon izlječenja i kontrolne skupine.



Slika 36. Višedimenzionalno skaliranje pomoću modela slučajnih šuma razvrstavanja bolesnika nakon izlječenja (narančasta boja) i kontrolne skupine (siva boja). Udaljenost pojedinih bolesnika s CHC-om i kontrola temelji se na matrici udaljenosti dobivenoj u modelu slučajnih šuma.

4.5. Analiza stupnja fibroze kod bolesnika s kroničnim HCV-om

U drugom dijelu analize, koncentracija citokina i čimbenika rasta te statistička obrada podataka provedena je s obzirom na stupanj fibroze kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C. U Tablici 16. prikazan je broj bolesnika s CHC-om s obzirom na stupanj fibroze prije početka liječenja i nakon postizanja trajnog virološkog odgovora. U Tablici 17.a) i 17.b) prikazan je broj bolesnika s obzirom na smanjenje stupnja fibroze nakon postizanja trajnog virološkog odgovora u odnosu na stupanj fibroze prije početka liječenja.

Tablica 16. Broj bolesnika s kroničnim hepatitisom C s obzirom na stupanj fibroze prije početka liječenja i nakon postizanja trajnog virološkog odgovora.

| Stupanj fibroze prije početka liječenja | Broj bolesnika | Stupanj fibroze nakon izlječenja | Broj bolesnika |
|--|-----------------------|---|-----------------------|
| F1 | 10 (17,86%) | F1 | 23 (41,07%) |
| F2 | 14 (25,64%) | F2 | 9 (16,07%) |
| F3 | 5 (8,29%) | F3 | 7 (12,50%) |
| F4 | 27 (48,21%) | F4 | 17 (30,36%) |

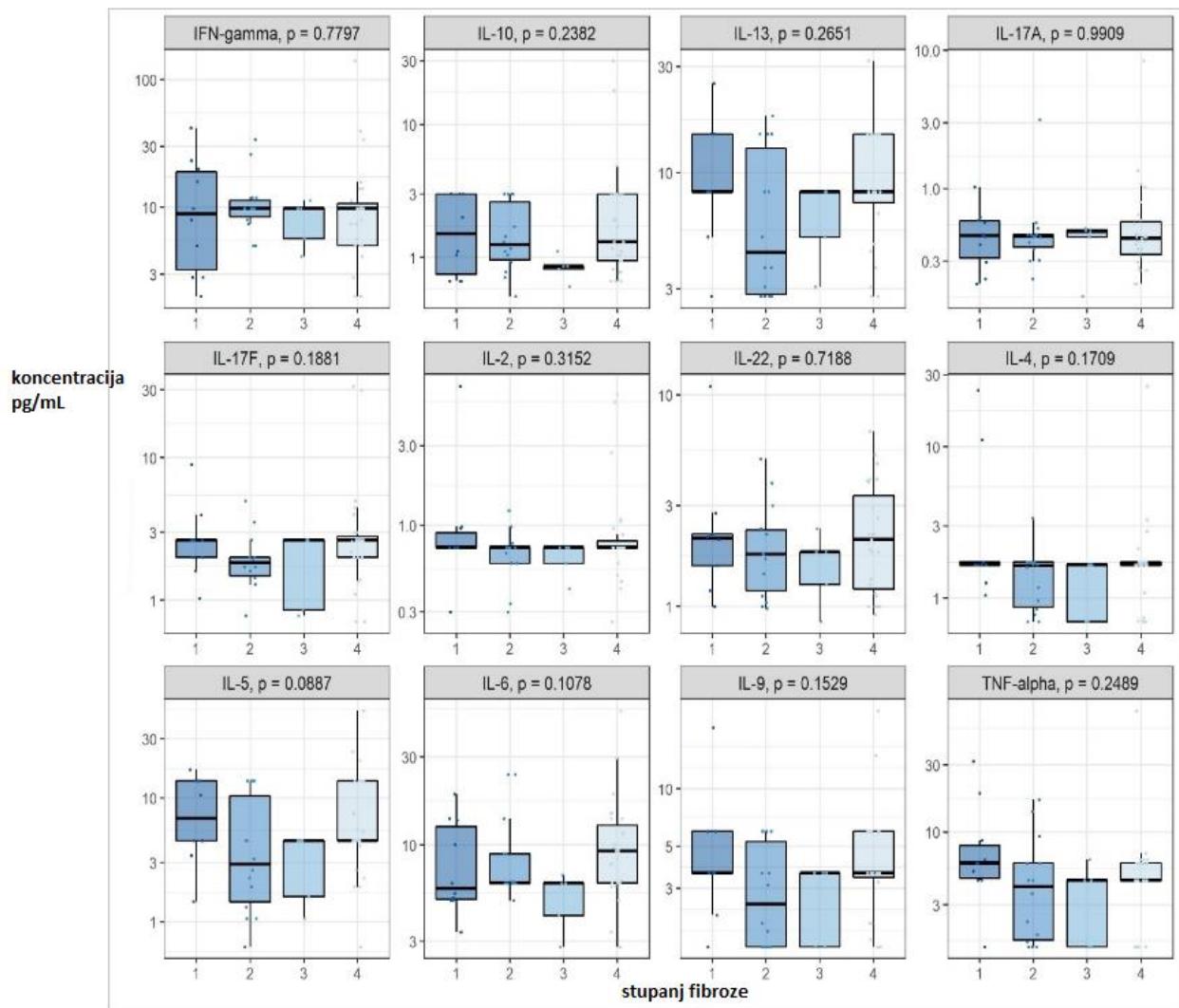
Tablica 17.a) Broj bolesnika s obzirom na smanjenje stupnja fibroze nakon izlječenja u odnosu na stupanj fibroze prije početka liječenja.

| Razlika u stupnju fibroze | Broj bolesnika |
|----------------------------------|-----------------------|
| 0 | 34 (60,72%) |
| -1 | 15 (26,79%) |
| -2 | 5 (8,93%) |
| -3 | 2 (3,57%) |

Tablica 17. b) Broj bolesnika s obzirom na smanjenje stupnja fibroze nakon izlječenja u odnosu na stupanj fibroze prije početka liječenja.

| Razlika u stupnju fibroze | Broj bolesnika (%) |
|----------------------------------|---------------------------|
| F1→F1 | 9 (16,07%) |
| F2→F2 | 7 (12,50%) |
| F2→F1 | 8 (14,28%) |
| F3→F3 | 0 (0%) |
| F3→F2 | 1 (1,79%) |
| F3→F1 | 4 (7,15%) |
| F4→F4 | 17 (30,35%) |
| F4→F3 | 7 (12,50%) |
| F4→F2 | 1 (1,79%) |
| F4→F1 | 2 (3,57%) |

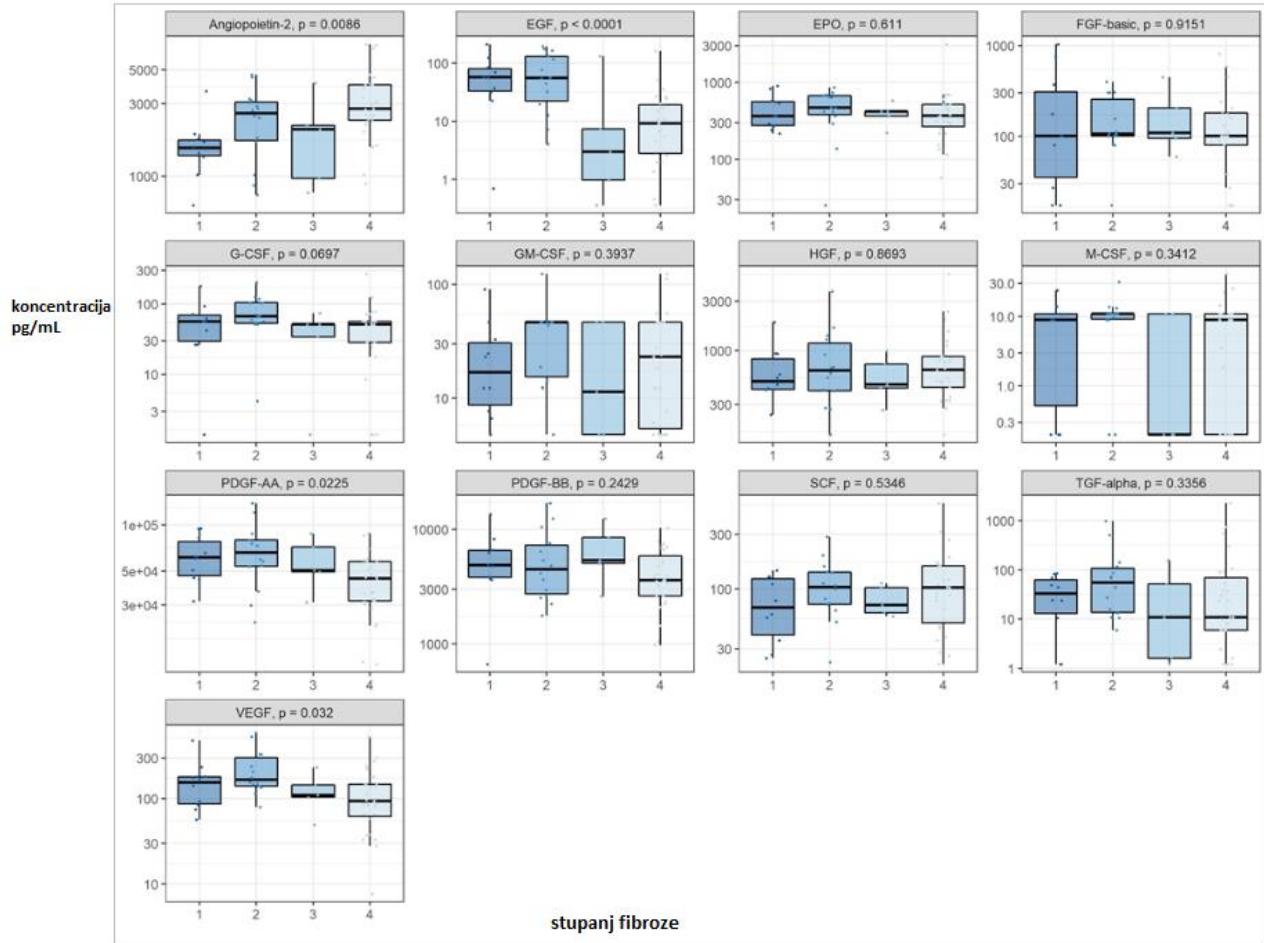
Na Slici 37. prikazane su p-vrijednosti pomoću Kruskal-Wallisova testa gdje su uspoređene koncentracije citokina prije početka liječenja s obzirom na početni stupanj fibroze kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Nije dokazana statistički značajna razlika ni u jednog citokina.



Slika 37. Usporedba koncentracija analiziranih citokina prije početka liječenja s obzirom na početni stupanj fibroze bolesnika.

Kazalo: Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je logaritamski skalirana. Prikazane su p-vrijednosti Kruskal-Wallisova testa.

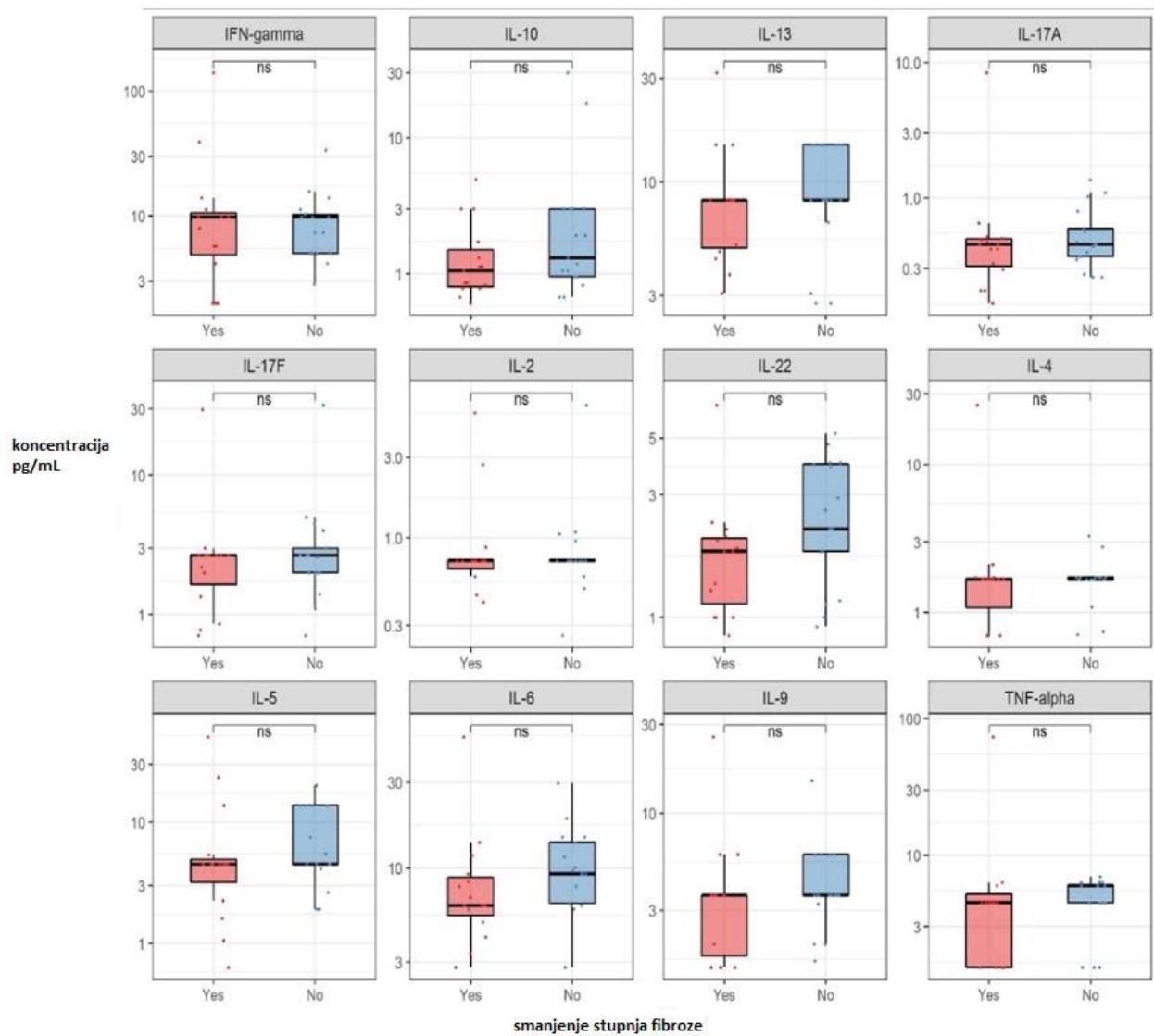
Na Slici 38. prikazane su p-vrijednosti pomoću Kruskal-Wallisova testa gdje su uspoređene koncentracije čimbenika rasta prije početka liječenja s obzirom na početni stupanj fibroze kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Statistički značajna razlika dokazana je kod Ang-2, EGF, PDGF-AA i VEGF.



Slika 38. Usporedba koncentracija analiziranih čimbenika rasta prije početka liječenja s obzirom na početni stupanj fibroze bolesnika.

Kazalo: Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je logaritamski skalirana. Prikazane su p-vrijednosti Kruskal-Wallisova testa.

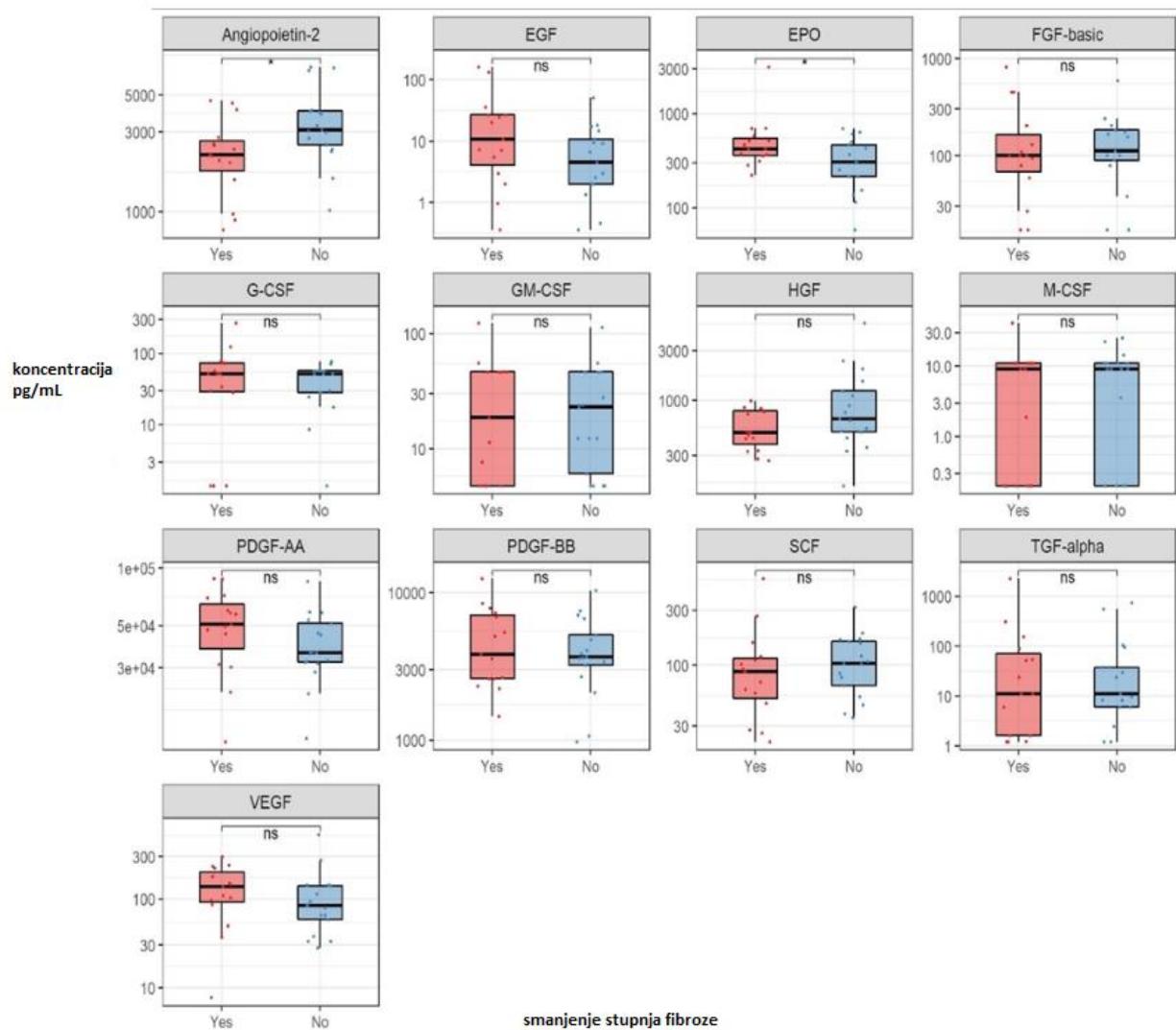
Na Slici 39. pomoću Mann-Whitney U testa analizirane su ovisnosti smanjenja fibroze nakon izlječenja infekcije HCV-om i koncentracija citokina prije početka liječenja. U obzir su uzeti isključivo bolesnici s početnim stupnjem fibroze 3 ili 4. Niti jedan citokin nije se pokazao statistički značajnim u toj analizi.



Slika 39. Ovisnost smanjenja fibroze nakon izlječenja infekcije HCV-a i koncentracija analiziranih citokina prije početka liječenja. U obzir su uzeti isključivo bolesnici s početnom fazom fibroze 3 ili 4.

Kazalo: Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je logaritamski skalirana. Mann-Whitney U test, ns: nije značajno.

Na Slici 40. pomoću Mann-Whitney U testa analizirane su ovisnosti smanjenja fibroze nakon izlječenja infekcije HCV-om i koncentracija analiziranih čimbenika rasta prije početka liječenja. U obzir su uzeti isključivo bolesnici s početnim stupnjem fibroze 3 ili 4. Bolesnici sa smanjenim stupnjem fibroze nakon izlječenja infekcije pokazali su statistički značajnu razliku u koncentracijama Ang-2 (medijani 2182,47 i 3095,84 pg/mL, $p=0,030$) i EPO (medijani 418,29 i 307,92 pg/mL, $p=0,041$) prije početka liječenja.



Slika 40. Ovisnost smanjenja nakon izlječenja infekcije HCV-a i koncentracija analiziranih čimbenika rasta prije početka liječenja. U obzir su uzeti isključivo bolesnici s početnom fazom fibroze 3 ili 4. Kazalo: Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je logaritamski skalirana. Mann-Whitney U test, ns: nije značajno, *: $p<0,050$.

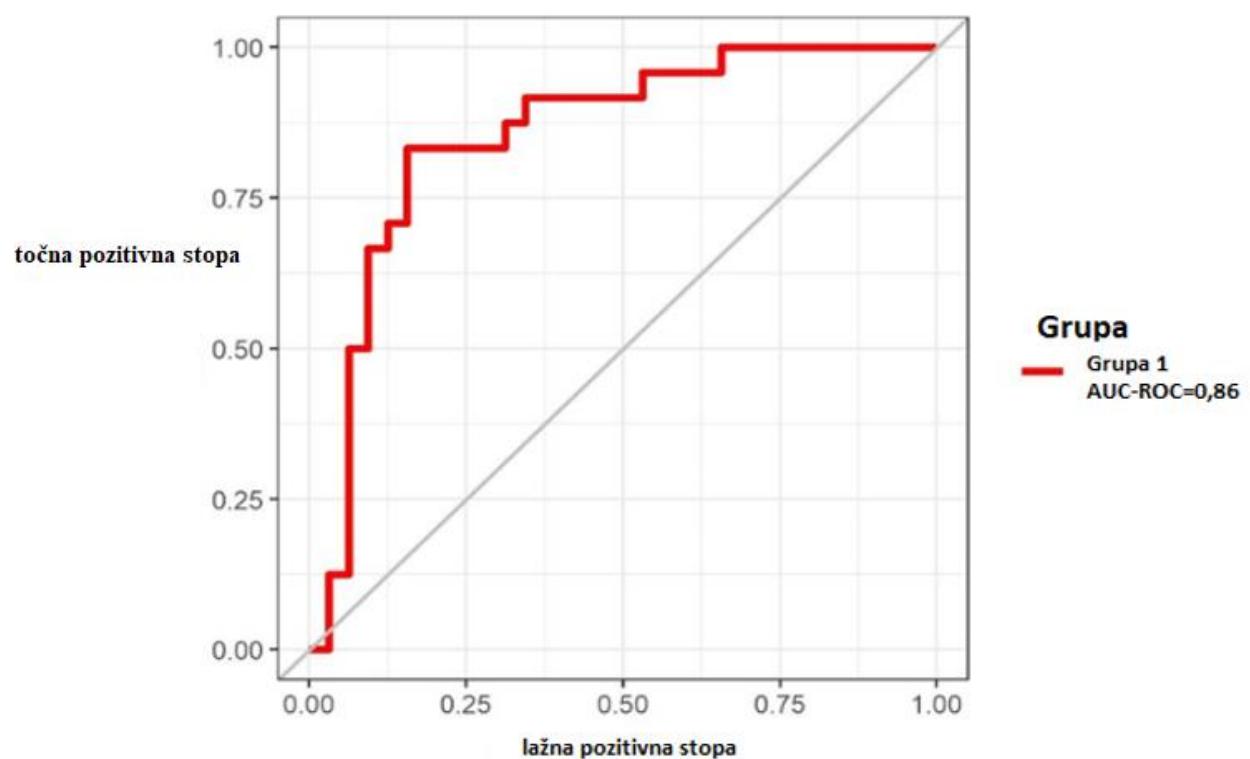
U Tablici 18. pomoću modela logističke regresije prikazana je sistematizacija stupnja fibroze. Analizirane su dvije grupe bolesnika s kroničnim hepatitom C (bolesnici sa stupnjem fibroze 1 ili 2 – grupa 1 i bolesnici sa stupnjem fibroze 3 ili 4– grupa 2). Korišteni su indikatori za koje je u bivarijatnoj analizi utvrđena povezanost sa stupnjem fibroze (Slika 41). Dobiveno je da se u slučaju dvostrukog povećanja koncentracije EGF-a, pri čemu su ostali indikatori konstantni, vjerojatnost za teži stupanj fibroze (F3 ili F4) smanji 2 puta. Slično, u slučaju dvostrukog povećanja koncentracije Ang-2, vjerojatnost za teži stupanj fibroze poveća se 4 puta. U slučaju da se radi o muškarцу, a ne ženi, pri čemu su koncentracije ostalih indikatora konstantne, vjerojatnost za teži stupanj fibroze poveća se 8 puta.

Tablica 18. Sistematizacija stupnja fibroze modelom logističke regresije. Numerički indikatori su logaritamski skalirani (baza 2).

| Čimbenik rizika | Promjena izgleda | 95%-interval pouzdanosti za promjenu izgleda | p-vrijednost |
|-----------------|------------------|--|--------------|
| EGF | 0,50 | 0,32 – 0,7 | 0,0004 |
| Angiopoietin- 2 | 4,19 | 1,55 – 14,3 | 0,0200 |
| Spol (Ž > M) | 8,24 | 1,76 – 54,28 | 0,0100 |

Točnost modela provedena je metodom 5-fold cross validation. Senzitivnost = **84,3 %**, specifičnost = **75,0 %**.

Kazalo: EGF- epidermalni čimbenik rasta, Ž- ženski spol, M-muški spol

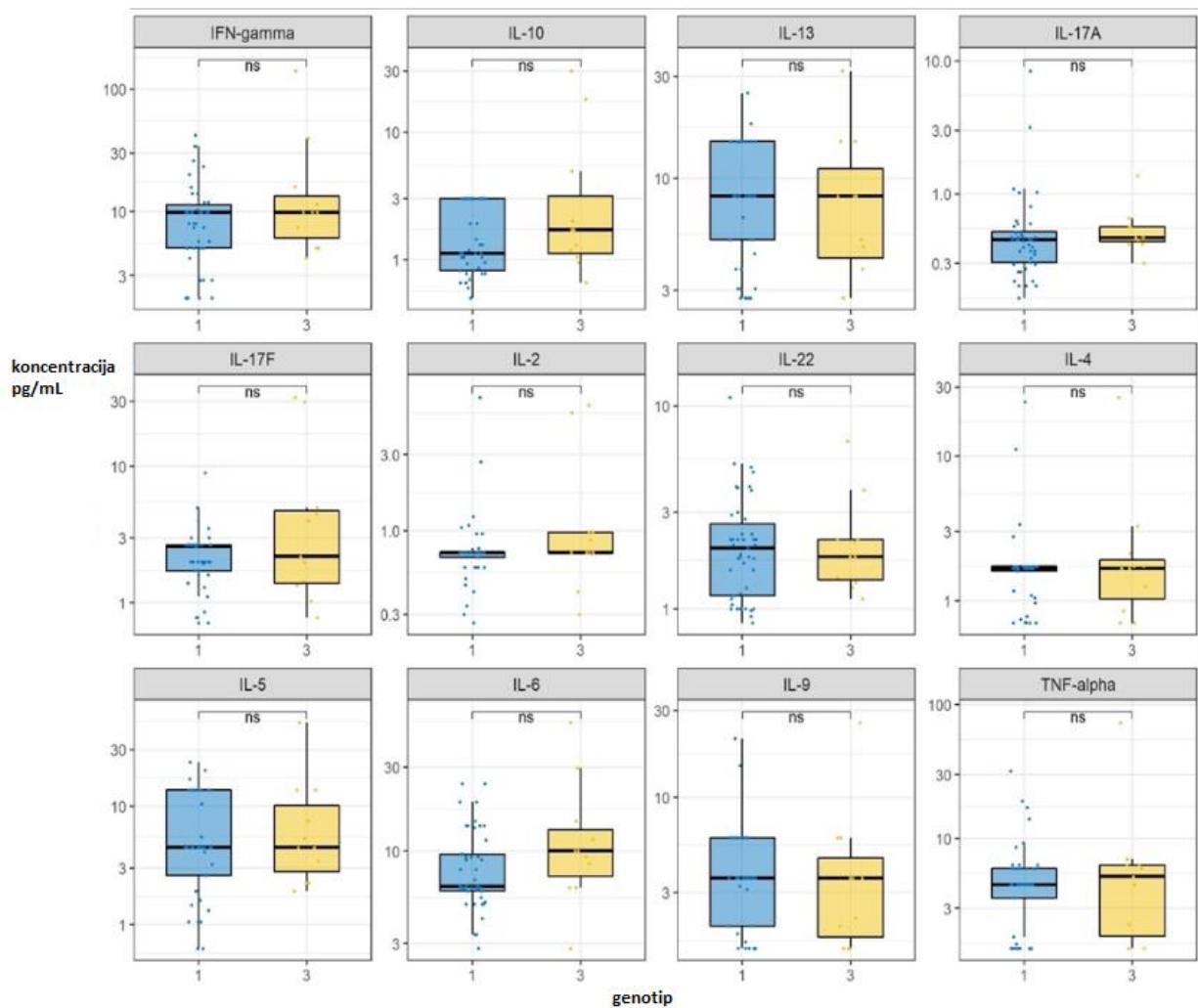


Slika 41. Krivulja ROC modela logističke regresije za klasifikaciju bolesnika s obzirom na stupanj fibroze. AUC (površina ispod krivulje) = **0,86**.

4.6. Analiza genotipa virusa

U trećem dijelu analize koncentracije citokina i čimbenika rasta, statistička obrada podataka provedena je s obzirom na genotip virusa. U ovom istraživanju najzastupljeniji su bili genotip 1 i 3 kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C.

Na Slici 42. prikazana je usporedba koncentracija citokina prije početka liječenja s obzirom na genotip virusa (1 ili 3) pomoću Mann-Whitney U testa. Nije bilo statistički značajne razlike ni u jednom citokinu.



Slika 42. Usporedba koncentracija analiziranih citokina prije početka liječenja i genotipa virusa. U obzir su uzeti genotipovi 1 (1a i 1b) te 3.

Kazalo: Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je logaritamski skalirana. Mann-Whitney U test, ns: nije značajno.

Na Slici 43. prikazana je usporedba koncentracija čimbenika rasta prije početka liječenja s obzirom na genotip virusa (1 ili 3) pomoću Mann-Whitney U testa. Statistički značajna razlika između ta dva genotipa uočena je kod antifibrotičkog čimbenika rasta SCF (medijani 82,19 i 141,09 pg/mL, $p=0,010$), profibrotičkog čimbenika rasta TGF- α (medijani 10,98 i 105,67, $p=0,010$) te kod PDGF-AA (medijani 53 593,81 i 32 508,38 pg/mL, $p=0,010$), čimbenika koji ima profibrotička i antifibrotička svojstva.



Slika 43. Usporedba koncentracija analiziranih čimbenika rasta prije početka liječenja i genotipa virusa. U obzir su uzeti genotipovi 1 (1a i 1b) te 3.

Kazalo: Crna horizontalna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Y-os je logaritamski skalirana. Mann-Whitney U test, ns: nije značajno, *: $p<0,050$, **: $p<0,010$.

5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajne razlike u ekspresiji gena koji kodiraju sintezu modulatora biološkog odgovora značajnih za nastanak imunoreakcije na infekciju HCV-om, kao i za imunopatogenezu fibroze kod bolesnika s CHC-om u usporedbi sa zdravim osobama. U istraživanju su analizirani pro- i antifibrotički geni, geni koji kodiraju sintezu komponenata EMC-a i enzima koji omogućuju preoblikovanje EMC-a, adhezijske molekule, upalne citokine, kemokine i čimbenike rasta, članove kaskade prijenosa signala čimbenika rasta iz porodice TGF-β, transkripcijske čimbenike i gene koji kodiraju sintezu proteina važnih za proces epitelno- mezenhimske tranzicije stanica tijekom patogeneze fibroze.

Kod bolesnika s CHC-om dokazana je povećana ekspresija gena *SMAD-6*. Proteini SMAD su porodica prijenosnika signala i aktivatora transkripcije koji posreduju u signalnim putovima čimbenika rasta TGF-β. Članovi porodice TGF-β vežu se na receptore povezane sa serin/treonin kinazama koje aktiviraju proteine SMAD odgovorne za unutarstanične signalne puteve. Protein SMAD-6 pripada specifičnoj klasi I-SMAD-a koji djeluju kao antagonisti puta prijenosa signala čimbenika rasta TGF-β puta i iskazuju se autoinhibicijskim signalnim mehanizmom (Miyazono i sur., 2000).

Važnost gena *SMAD-6* u infekciji HCV-om, posebice u ranoj fazi infekcije, tj. tijekom vezanja virusa za ciljne stanice, dokazali su Zhang i suradnici u eksperimentima u staničnim kulturama in vitro u kojima infekcija staničnih linija hepatoma i primarne kulture ljudskih hepatocita povećava ekspresiju *SMAD-6* putem aktivacije NF- kappaB (Zhang i sur., 2017). Povećana ekspresija *SMAD-6* povezana je s povećanjem ekspresijom proteoglikana heparan sulfata (engl. *heparan sulfate proteoglycans*, HSPG) na površini stanice koji imaju važnu ulogu u vezanju virusa na stanične receptore, kao i s unosom kolesterola i lipoproteina u ciljne stanice (Colpitts i sur., 2017; Zhang i sur., 2017). Zhang i suradnici također su pokazali povećanu ekspresiju gena *SMAD-6* u bioptatima jetre kod 69 bolesnika s kroničnim hepatitisom C u usporedbi s uzorcima osoba koje nisu bile zaražene HCV-om (Zhang i sur., 2017).

Obzirom na složenost moguće biološke značajnosti učinka povećane ekspresije I-SMAD-a u infekciji HCV-om te posljedične inhibicije signalnog puta čimbenika TGF-β, modulacija ekspresije ove molekule vjerojatno utječe na razvoj upale u CHC-u, imunosnu regulaciju, razvoj fibroze i onkogenezu. Povezanost I-SMAD-a i TGF-β signalnog puta u CHC-u vjerojatno ukazuje na vezu između homeostaze željeza i metabolizma lipida u stanicama zaraženim HCV-om (Colpitts i sur., 2017).

Rezultati ovog istraživanja također su pokazali sniženu ekspresiju gena *CAV-1* kod bolesnika s CHC-om s različitim stupnjevima fibroze u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Kaveolin-1 glavna je

sastavnica kaveole, promjera 70-100 nm, koji je obogaćen kolesterolom i sfingolipidima prisutnim u fibroblastima, adipocitima, endotelnim stanicama i miocitima te ima važnu ulogu u transportu lipida i metabolizmu (Matthaeus i sur., 2021; Panic i sur., 2021). Gen *CAV-1* je važan regulator nekoliko staničnih signalnih putova i ima važnu ulogu u transformaciji malignih stanica, rastu tumora, angiogenezi i metastatskim procesima (Panic i sur., 2021).

Cheng i suradnici istraživali su ekspresiju mRNA *CAV-1* u 40 osoba s HCC-om koji je uzrokovan HBV-om. Imunohistokemijskom analizom tkiva jetre pokazali su da je ekspresija *CAV-1* značajno povišena u osoba s HCC-om koji je uzrokovan HBV-om u usporedbi s uzorcima jetre zdravih osoba. Rezultati su također pokazali da *CAV-1* ima važnu ulogu u procesu onkogeneze HCC-a uzrokovanog infekcijom HBV-om (Cheng i sur., 2017). Istraživanja o biološkoj funkciji *CAV-1* i učinku promjene regulacije gena *CAV-1* i patogeneze HCC-a uzrokovanog HCV-om za sada nisu dostupna.

Nekoliko godina prije, grupa autora iz Japana, pokazala je važnost gena *CAV-1* u patogenezi CHC-a u eksperimentima na kulturi stanica pri čemu su dokazali povećanu ekspresiju molekule *CAV-1* na strukturama sličnim kaveolama unutar LSEC tijekom procesa prokrvljavanja koji najčešće prethodi razvoju fibroze jetre u usporedbi s kontrolama (Yamazaki i sur., 2013).

Različiti obrasci ekspresije *CAV-1* u HCC-u ukazuju na važnu ulogu ove molekule u onkogenezi (Cokakli i sur., 2009). Primjenom imunohistokemijskih metoda, Baiocchini i suradnici dokazali su različit obrazac ekspresije gena *CAV-1* na LSEC-u i hepatocitima u jetri 24 bolesnika s CHC-om u odnosu na šest zdravih kao i značajnu povezanost između ekspresije *CAV-1* u hepatocitima i stupnja fibroze (Baiocchini i sur., 2019).

Rezultati opisani u ovom istraživanju, tj. snižena ekspresija gena *CAV-1* kod bolesnika s CHC-om i stupnjevima fibroze F1- F4 u usporedbi sa zdravim kontrolama, ukazuju na to da inhibicija sinteze proteina *CAV-1* može biti povezana s molekularnim mehanizmima koji potiču progresiju fibroze jetre. Metaloproteinaze matriksa su enzimi koji pripadaju porodici endopeptidaza ovisnih o cinku čija je glavna funkcija remodeliranje ECM-a te tkivni inhibitori MMP tj. TIMP imaju važnu ulogu u raznim fiziološkim procesima, uključujući razvoj fibroze (Cabral-Pacheco i sur., 2020; Latronico i sur., 2016). Transkriptomskom analizom, u ovom je istraživanju dokazana povišena ekspresija gena *MMP-8* kod bolesnika s CHC-om i stupnjevima fibroze F3/F4 u usporedbi sa zdravim kontrolama.

U istraživanju provedenom 2012. godine je Capone sa suradnicima pokazao slične rezultate na razini ekspresije proteina, pri čemu je prikazano povećanje koncentracije enzima MMP-8 u serumu 33 bolesnika s CHC-om u usporedbi s 20 zdravih ispitanika primjenom multiplex protočne citometrije na kuglicama (Capone i sur., 2012).

Gen *MMP-1* kodira sintezu enzima odgovornog za razgradnju kolagena tipa I. Attallah i suradnici su pokazali značajno niže koncentracije MMP-1 u serumu 38 bolesnika s CHC-om i stupnjevima fibroze F2-F4 u usporedbi s bolesnicima s blagim stupnjem fibroze F1. Rezultati istraživanja Attallah i

suradnika ukazuju na povezanost između smanjenih serumskih koncentracija MMP-1 i stupnja fibroze jetre. Istraživanje Attallah i suradnika na razini ekspresije proteina je u skladu s rezultatima ovog istraživanja koji pokazuju značajno smanjenje ekspresije gena *MMP-1* u svim fazama fibroze u usporedbi sa zdravim kontrolama (Attallah i sur., 2017).

U istraživanju koje su 2020. godine proveli Cabral-Pacheco i suradnici uočena je smanjena ekspresija gena *TIMP-3*, čiji produkt inhibira proteolitičku aktivnost MMP-a kod bolesnika s CHC-om s visokim stupnjevima fibroze tj. F3/F4 (Cabral-Pacheco i sur., 2020). Smanjena aktivnost *TIMP-3* povezana je s otežanim održavanjem strukture ECM-a kod bolesnika s visokim stupnjem fibroze, a navedeno opažanje u skladu je s rezultatima ove disertacije koje je također dokazalo smanjenu ekspresiju gena *TIMP-3* kod bolesnika s CHC-om u stupnjevima fibroze F3/F4.

Čimbenik rasta CTGF/CCN2 je protein koji ima važnu ulogu u regulaciji stanične diferencijacije, proliferacije, angiogeneze, migracije i apoptoze, kao i sinteze ECM-a, razvoja tumora i fibroze (Huang i sur., 2012; Tam i sur., 2021). Mehanizmi profibrotične aktivnosti CTGF-a uključuju promicanje taloženja i remodeliranja EMC-a, indukciju diferencijacije epitelnih stanica i fibročita u aktivirane fibroblaste ili miofibroblastе, kao i diferencijaciju fibroblasta u tkivu i ulogu u prijenosu signala posredovanog čimbenikom rasta TGF-β. Povišena ekspresija *CTGF* u HSC smatra se jednim od ključnih parametara u patogenezi jetrene fibroze. Koncentracija *CTGF* u zdravoj jetri je niska, no u jetri bolesnika s fibrozom dokazane su povećane koncentracije ovog čimbenika rasta (Huang i sur., 2012).

Rezultati dobiveni ovim radom u suprotnosti su s objavljenim podacima grupe autora iz Amerike jer pokazuju smanjenje ekspresije gena *CTGF* kod bolesnika s CHC-om u usporedbi sa zdravim kontrolama (Huang i sur., 2012). Obzirom na to da je čimbenik rasta *CTGF* povezan s prijenosom signala čimbenika rasta TGF-β, pretpostavlja se da je smanjenje ekspresije gena *CTGF* povezano s povećanom ekspresijom gena koji kodira sintezu autoinhibicijskog čimbenika SMAD-6 u signalnom putu TGF-β.

U ovoj disertaciji je otkrivena značajno snižena ekspresija nekoliko gena (*ITGA-1*, *ITGA-2*, *LOX*, *CEBPB* i *PLG*) koji kodiraju sintezu komponenti ECM-a i adhezijskih molekula kod bolesnika s CHC u usporedbi sa zdravim osobama.

Gen *PLG* kodira sintezu plazminogena, prekursorsa plazmina koji uzrokuje degradaciju čimbenika koagulacije fibrina. U radu iz 2019. godine, autori su iznijeli podatke o većoj koncentraciji PGL-a u serumu 24 bolesnika s CHC-om u usporedbi s 11 bolesnika s kroničnim hepatitisom B (Batyrova i sur., 2019). Smanjena ekspresija gena *PLG* u ovom istraživanju vjerojatno je povezana s narušenom homeostazom ECM-a kroz fibrinolizu.

Gen *ITGA-1* kodira alfa 1 podjedinicu integrinskih receptora. Ovaj protein heterodimerizira s beta 1 podjedinicom kako bi formirao receptor na površini stanice za kolagen i laminin. Heterodimerni

receptor je uključen u adheziju stanica-stanica i može imati značajnu ulogu u upali i fibrozi. Gen *ITGA-2* kodira sintezu integrina α2 tj. podjedinicu transmembranskog receptora za kolagen i kolagenu slične proteine. Odgovoran je za interakcije stanica-stanica i stanica-ECM te ima ključnu ulogu u različitim razvojnim procesima, uključujući diferencijaciju, proliferaciju i migraciju stanica (Bièche i sur., 2005). Smanjena ekspresija gena *ITGA-1* i *ITGA-2* dokazana u ovom istraživanju može biti povezana s molekularnim mehanizmima koji utječu na progresiju fibroze jetre.

Gen *LOX* kodira enzim lizil oksidazu koja omogućuje umrežavanje kolagenih i elastinskih vlakana unutar ECM-a (Piasecki i sur., 2020). U dva eksperimentalna modela fibrogeneze jetre na štakorima (uz oralni dodatak ugljičnog tetraklorida ili streptozotocina), selektivni LOXL2/3 inhibitor PXS-5153A smanjuje sadržaj kolagena, čime se smanjuje težina bolesti i poboljšava funkcija jetre (Schilter i sur., 2019.). Na eksperimentalnom mišjem modelu, primjena preventivnog liječenja s anti-LOXL2 protutijelom spriječila je nastanak fibroze jetre (Ikenaga i sur., 2017). Rezultati ove disertacije pokazali su smanjenu ekspresiju gena *LOX* što je vjerojatno povezano s narušenom strukturom vlakana unutar ECM-a u CHC-u.

Li i suradnici pokazali su u kulturi Huh7 stanica zaraženih HCV-om da je *CEBPB* jedan od transkripcijskih čimbenika koji je bio smanjeno eksprimiran nakon duže infekcije HCV-om i da ima važnu ulogu u lipogenezi. Smanjena ekspresija gena uključenih u metabolizam lipida dovodi do nakupljanja lipida u hepatocitima inficiranih HCV-om što ukazuje na važnu ulogu u upalnim procesima (Li i sur., 2018). U ovom istraživanju pokazana je snižena ekspresiju gena *CEPB* što je u skladu s rezultatima Li i suradnika na razini transkripcije (Li i sur., 2018).

Obzirom na oskudnost literaturnih podataka, biološku značajnost modulacije ekspresije gena *ITGA-1*, *ITGA-2*, *CEPB*, *PLG* i *LOX* u CHC-u potrebno je dodatno istražiti.

Kroničnu infekciju HCV-om karakterizira povećana ekspresija gena *SMAD-6* i smanjena ekspresija gena *CAV-1*, *CTGF*, *LOX*, *MMP-1*, *PLG*, *CEPB*, *ITGA-1* i -2. Ekspresija različitog skupa gena koji pripadaju različitim biološkim putevima ukazuje na složenost molekularnih mehanizama uključenih u upalnu patogenezu i fibrozu kod CHC-a.

U djelu istraživanja koje se bavi ekspresijom proupatnih citokina (IL-6 i TNF-α), Th1 citokina (IL-2 i IFN-γ), Th2 citokina (IL-4, IL-5 i IL-13), Th 9 citokina (IL-9), Th17 citokina (IL-17A, IL-17F, i IL-22), kao i protupatnog citokina IL-10 kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C pokazano je da iskorjenjivanje virusa primjenom DAA ne mijenja ekspresiju ovih modulatora biološkog odgovora, uz iznimku IL-10.

Citokin IL-10 regulira imunosni odgovor u virusnom i autoimunom hepatitisu, kao i kod bolesnika s alkoholnom bolesti jetre (Zhang i sur., 2006). Barrat i suradnici pokazali su da kod bolesnika s Th1 citokinskim odgovorom tijekom akutne infekcije HCV-om postoji značajno manja vjerojatnost od nastanka kronične infekcije u usporedbi s bolesnicima koji su imali Th2 tip citokinski odgovor te

veće koncentracije IL-10 (Barrat i sur., 2002). U istraživanju provedenom 2020. godine, Amoras i suradnici analizirali su ekspresiju IL-10 u bioptatima jetre primjenom qPCR-a i u plazmi metodom multipleks enzimskog imunotesta u 45 bolesnika s kroničnim hepatitism C u usporedbi sa zdravim osobama. Ekspresija IL-10 u tkivu jetre i plazmi zdravih osoba bile su statistički značajno veće u usporedbi s oboljelima od CHC-a. Ekspresija IL-10 bila je značajno veća kod bolesnika s CHC-om i stupnjem fibroze F0-F1 u usporedbi s bolesnicima s višim stupnjevima fibroze F2, F3-F4. Zaključak istraživanja je bio da protuupalni učinak IL-10 koji se sintetizira lokalno tj. u jetri može ograničiti i oslabiti imunosni odgovor, potaknuti mehanizme koji omogućuju perzistenciju virusne infekcije te ograničiti fibrogenični odgovor. Međutim, smanjenje ekspresije IL-10 u jetri povezano je s većim opsegom upalnog odgovora te infiltracije aktiviranih stanica urodenog i specifičnog imunosnog sustava u jetru što u konačnici dovodi do progresije fibroze i nastanka ciroze (Amoras i sur., 2020). U istraživanju koje su Owusu i suradnici proveli 2020. godine dokazali su značajno povećanu koncentraciju IL-10 u serumu 41 ispitanika koji su eliminirale infekciju HCV-om tijekom akutne faze infekcije u usporedbi s osobama koje su bile zaražene HCV-om (n=121). Dobiveni rezultati ove disertacije ukazuju na moguću značajnost koncentracije IL-10 kao pokazatelja iskorjenjivanja HCV-a tijekom akutne infekcije (Owusu i sur., 2020).

Barooah i suradnici su u svojem radu analizirali koncentraciju IL-10 primjenom protočne citometrije na kuglicama u 110 s CHC-om, 96 bolesnika s cirozom jetre i 60 bolesnika s HCC-om te pokazali da je koncentracija IL-10 najviša kod bolesnika s HCC-om. Pri tome je koncentracija IL-10 bila značajno viša kod bolesnika s cirozom i kod bolesnika s HCC-om u usporedbi s bolesnicima koji su imali CHC te u zdravih osoba (Barooah i sur., 2020). Rezultati Amoras i suradnika iz 2020. godine su u skladu s rezultatima ove disertacije u kojem je ekspresija IL-10 u kroničnoj infekciji HCV-om bila značajno snižena u odnosu na zdrave osobe ukazujući na biološku značajnost snižene ekspresije protuupalnog citokina IL-10 u CHC-u (Amoras i sur., 2020).

Usporedbom između 50 bolesnika s CHC-om i 10 zdravih kontrola, Choobin i suradnici su također pokazali povezanost unutarstanične koncentracije IL-10 u mononuklearnim stanicama periferne krvi i stupnjem progresije bolesti jetre u CHC-u te je utvrđeno da je značajno povećana koncentracija IL-10 kod bolesnika koji imaju cirozu jetre i HCC (Choobin i sur., 2020).

U istraživanju provedenom u Egiptu, El-Emshaty i suradnici su analizirali mogućnost primjene koncentracije IL-10 kao biomarkera koji ukazuje na opseg upalne reakcije kod bolesnika s CHC-om kod kojih se razvio HCC. U istraživanje su uključili nekoliko kliničkih kategorija 41 ispitanika: 15 bolesnika s HCC-om, 16 bolesnika s kroničnom jetrenom bolesti i 10 s histologijom jetre kompatibilnom s precirotičnim hepatitism. Kontrolnu skupinu činili su bolesnici (n=10) koji nisu bili zaraženi HCV-om, no imali su kolenistitis. Rezultati tog istraživanja pokazali su povišenu ekspresiju IL-10 u usporedbi s kontrolnom skupinom, a koncentracija IL-10 u serumu bila je

značajno povišena kod bolesnika s višim stupnjevima fibroze (El-Emshaty i sur., 2015). Koncentracija IL-10 u ovom istraživanju bila je najviša prije početka liječenja što se može povezati s rezultatima drugih istraživanja koji govore kako je značajno povećana koncentracija IL-10 kod bolesnika koji imaju cirozu jetre i HCC, budući da je 48% bolesnika imalo početni stupanj fibroze F4, odnosno cirozu jetre (El-Emshaty i sur., 2015).

U ovoj disertaciji pokazano je smanjenje koncentracije proupatnog citokina IL-6 kod bolesnika s CHC-om nakon iskorjenjivanja virusa primjenom DAA-a što ukazuje na smanjenje opsega upale nakon izlječenja. Rezultati istraživanja Sousa i suradnika pokazali su višu koncentraciju IL-6 kod 60 bolesnika s kroničnim hepatitisom C i upalom jetre s nekrozom u odnosu na bolesnike s upalom jetre bez nekroze ili kod bolesnika bez upale jetre (Sousa i sur., 2012).

Batsaikhan i suradnici su u svojem istraživanju provedenom 2019. godine pokazali da nema značajnih razlika u koncentraciji IL-6 kod bolesnika s CHC-om obzirom na stupanj fibroze, a njihovi rezultati potvrđeni su i u ovom istraživanju (Batsaikhan i sur., 2019).

Dokazane su snižene koncentracije proupatnog citokina TNF- α i IL-10, Th2 citokina (IL-4, IL-5 i IL-13), Th22 citokina (IL-22) i Th9 citokina (IL-9) kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C u odnosu na zdrave osobe u ovom istraživanju. Nakon primjene DAA-a i iskorjenjivanja virusa koncentracije proupatnog citokina TNF- α , Th1 citokina IL-2, Th2 citokina IL-4, IL5 i IL-13, Th 22 citokina IL-22 i Th9 citokina IL-9 bile su značajno niže u usporedbi sa zdravim osobama. Ribeiro i suradnici su u istraživanju koje je obuhvatilo 50 bolesnika s kroničnim hepatitisom C dokazali povišene koncentracije IL-9, IL-13 i TNF- α u usporedbi s 15 zdravih kontrola. Uz to, dokazali su i značajno snižene koncentracije IL-5, IL-9, IL-10 i TNF- α kod bolesnika kroničnim hepatitisom C u usporedbi s zdravim kontrolama (Ribeiro i sur., 2021).

U ovome radu, analiza čimbenika rasta kod bolesnika s CHC-om pokazala je da je najznačajnija razlika u koncentracijama u analiziranim vremenskim točkama tijekom liječenja dokazana za EGF, HGF i VEGF. Uočeno je da tijekom liječenja koncentracija EGF-a, HGF-a i VEGF-a značajno raste, odnosno da je prije početka liječenja bila najniža, dok je nakon izlječenja koncentracija bila najviša. Također, uočene su iznimno visoke koncentracije PDGF-AA i PDGF-BB tijekom liječenja, iako bez statistički značajne razlike, što ukazuje na važnu ulogu PDGF-a u procesima popravka i regeneracije tkiva. Porodica liganada i receptora PDGF ima središnju ulogu u regeneraciji tkiva i ključni su regulatori stvaranja vezivnog tkiva. PDGF je važan čimbenik rasta stanica mezenhimskog podrijetla i stimulira kemotaksiju, proliferaciju i ekspresiju novih gena u monocitima, makrofagima i fibroblastima. Prekomjerna ekspresija PDGF-AA povezana je s nekoliko bolesti kao što su ateroskleroza, fibroza jetre i zloćudni tumori, dok je PDGF-BB ligand najvišeg afiniteta za PDGFR- β te je PDGFR- β ključni čimbenik kod aktivacije HSC-a u procesu fibrogeneze (Alvarez i sur., 2006).

Yang i suradnici su pokazali da je u uzorcima seruma metodom ELISA kod 110 bolesnika s CHC-om, EGF potencijalni pokazatelj preživljavanja bolesnika s HCC-om te može biti biomarker i terapeutska ciljna struktura u HCC-u. Povezanosti između koncentracija EGF-a u serumu te vaskularne invazije i ekstrahepatičnih metastaza bile su statistički značajne (Yang i sur., 2018). Budući da je koncentracija EGF-a bila najviša nakon izlječenja infekcije CHC-om, a glavna uloga EGF-a je u karcinogenezi i tumorskoj progresiji te zacjeljivanju rana i tkiva, to ukazuje na mogućnosti regresije fibroze nakon izlječenja DAA-om.

Istraživanjem provedenim 2013. godine, Shehata i suradnici su ustanovili da su značajno više koncentracije EGF-a u serumu kod bolesnika s HCC ($n=30$, medijan 1476 ± 970 pg/mL) u usporedbi s bolesnicima s CHC ($n=20$, 747 ± 296 pg/mL) i kontrolnim ispitanicima ($n=20$, 625 ± 175 pg/mL). Dobiveni rezultati pokazuju da je povišena koncentracija EGF-a karakteristična za cirozu (Shehata i sur., 2013). Čimbenik rasta EGF ima važnu ulogu u tumorigenezi, uključujući HCC, a raznolikost gena za EGF je povezana s osjetljivošću na nekoliko vrsta karcinoma (Li i sur., 2010).

Čimbenik rasta HGF je pleiotropni citokin kojeg proizvode HSC te sudjeluje u regeneraciji jetre tijekom akutnog i kroničnog oštećenja te kod fibroze. Koncentracije HGF-a u serumu ovise o stupnju oštećenja jetre te ukazuju na stupanj hepatocellularne disfunkcije. Kod 45 bolesnika s CHC-om određivana je koncentracija HGF-a u serumu metodom ELISA. Koncentracije HGF u serumu bolesnika s CHC-om bile su značajno više od onih u zdravih kontrola ($p<0,05$). Multivarijatnom analizom utvrđeno je da je koncentracija HGF-a neovisan čimbenik povezan sa stupnjem fibroze u CHC-u (Mari'n-Serrano i sur., 2010). S obzirom da je ovim istraživanjem pokazana regresija stupnja fibroze u djelu bolesnika s CHC-om nakon izlječenja, a koncentracija HGF-a je najveća nakon postizanja SVR-a, to ukazuje na mogućnost da povećanje koncentracije HGF nakon izlječenja utječe na regeneraciju tkiva jetre.

Čimbenik rasta VEGF je značajan u fiziološkoj i patološkoj angiogenezi, a prekomjerno je izražen u HCC-u. Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz već postojećih. Angiogeneza u odrasloj dobi može imati suprotne učinke, pa je s jedne strane odgovorna za neovaskularizaciju u reumatskom artritisu i malignom tumoru, dok s druge strane ima i korisne učinke jer sudjeluje u obnovi srčanog mišića i cijeljenju rana. U istraživanju Mukozu i suradnika, pokazano je da se koncentracije VEGF-a u serumu mogu koristiti kao prognostički biljeg HCC-a i kao tumorski biljeg u infekciji CHC-om povezanoj s jetrenom cirozom te da ekspresija VEGF-a u serumu može predvidjeti vaskularnu invaziju. S obzirom na rezultate ovog istraživanja u kojem je koncentracija VEGF najveća nakon izlječenja, može se smatrati da je i VEGF jedan od značajnih čimbenika u cijeljenju tkiva jetre odnosno u regeneraciji. Uz to, u istraživanju Mukozu i suradnika, pokazano je da su koncentracije VEGF-a u serumu značajno veće od one u kontrolnoj skupini (Mukozu i sur., 2013). Ovo istraživanje

također je pokazalo veće koncentracije VEGF-a kod bolesnika s CHC-om u odnosu na kontrolnu skupinu, no bez statističke značajnosti.

U brazilskom istraživanju provedenom 2021. godine, Ribeiro i suradnici su analizirali 50 bolesnika s CHC-om liječenih DAA-om te pokazali povećane koncentracije FGF-basic, G-CSF i GM-CSF prije liječenja što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Analizom koreacijske matrice ekspresije citokina i čimbenika rasta prije započinjanja liječenja, dokazana je značajna korelacija u ekspresiji citokina IFN- γ i čimbenika rasta FGF-basic, G-CSF, GM-CSF kao i između citokina IL-17A i čimbenika rasta FGF-basic.

Dokazana je statistički značajna razlika u koncentracijama čimbenika rasta Ang-2, HGF-a i SCF-a između kontrolne skupine i bolesnika s CHC-om u ovoj disertaciji. Značajna razlika u koncentracijama čimbenika Ang-2, EGF-a, HGF-a i SCF-a dokazana je između bolesnika s CHC-om koji su postigli SVR i kontrolne skupine. Usporedba koncentracija čimbenika rasta prije i nakon liječenja DAA-om pokazala je da su koncentracije Ang-2, HGF, SCF u serumu bile više u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je nakon SVR-a bila povećana i koncentracija EGF-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Za razliku od ovog istraživanja, Riberio i suradnici su pokazali povišene koncentracije čimbenika rasta FGF, PDGF, GM-CSF u serumu kod 50 bolesnika s CHC-om u odnosu na 15 zdravih kontrola. Uz to, nakon liječenja DAA-om, isto istraživanje je pokazalo snižene koncentracije čimbenika rasta FGF, PDGF, G-CSF i VEGF u serumu 24 bolesnika s CHC-om u odnosu na 15 kontrola. U ovome radu nije pokazalo statistički značajne razlike u čimbenicima rasta koji su se pokazali značajnim u prethodno navedenom istraživanju (Ribeiro i sur., 2021). Mogući razlog nepodudarnosti brazilskog rezultata i ovog istraživanja su stupnjevi fibroze u bolesnika s CHC-om koji su uključeni u ova istraživanja. U istraživanju Ribeiro i suradnika, stupanj fibroze F3/F4 bio je prisutan u čak 80% bolesnika, dok je u ovom istraživanju udio bolesnika u različitim stupnjevima fibroze (F1/F2=24, F3/F4=32) bio podjednak.

Značajna razlika u koncentracijama IL-4, SCF i IL-5 prije početka liječenja i nakon izlječenja u odnosu na kontrolnu skupinu dokazana je u ovom istraživanju. Povezanost SCF i IL-4 kod bolesnika s infekcijom CHC-om u odnosu na zdrave kontrole ukazuje na važnu ulogu mastocita u CHC-u. Riberio i suradnici su prepostavili da bi IL-5 i CCL-11 (eng. C-C motif chemokine 11) mogli biti univerzalni biomarkeri liječenja DAA-om te da su važni u slučaju ponovne infekcije HCV-om ili kod HCC-a u liječenih bolesnika (Ribeiro i sur., 2021). Skupina znanstvenika iz Japana, Koreje i Kine je 2012. godine prepostavila da je SCF jedan od važnih čimbenika u remodeliranju tkiva jetre uz EPO, G-CSF i GM-CSF. Ovi citokini djeluju na matične stanice što dovodi do diferencijacije stanica. Čimbenici rasta SCF i GM-CSF važni su regulatori remodeliranja tkiva jetre te imaju sinergističku ulogu u jetrenoj regeneraciji. Sinergistički učinci su važni jer hematopoetske matične stanice i rane progenitorske stanice zahtijevaju zajedničko djelovanje SCF i GM-CSF za samoobnavljanje i

diferencijaciju. Sinergija SCF-a i GM-CSF-a ovisi o signalnom putu TGF- β koji pridonose regeneraciji jetre (Meng i sur., 2012). Obzirom na to da je u ovom istraživanju regresija fibroze dokazana u 40% bolesnika nakon izlječenja, pretpostavlja se da je povećana koncentracija SCF-a kod bolesnika sa CHC-om važna upravo u kontekstu oporavka jetre. Povećana ekspresija SCF-a kod bolesnika s CHC-om povezana je i s povećanom ekspresijom Th2 citokina IL-4 koji utječe na fenotip aktiviranih fibroblasta inducirajući pojavu miofibroblasta (Meng i sur., 2012).

Modelom slučajnih šuma u ovom sam istraživanju dokazala da se temeljem koncentracije modulatora biološkog odgovora postiže točna klasifikacija bolesnika obzirom na infekciju HCV-om u čak 98% slučajeva. Za 448 bolesnika s CHC-om, Nakayama i suradnici su izradili model slučajnih šuma s CHC-om s obzirom na sociodemografske karakteristike i kliničke varijable. Identificirali su važnost fibroze i/ili ciroze jetre, drugih bolesti jetre, ascitesa i transplatinane jetre kao bitnih pokazatelja koji su povezani s ulaskom u liječničku skrb te presadenu jetru i etničku pripadnost kao važne pokazatelje virološkog izlječenja. Oštećenje jetre počinje fibrozom, što je potaknuto aktivacijom HSC, portalnih fibroblasti i sintezom kolagena. Stanice koje sintetiziraju kolagen najčešće se aktiviraju djelovanjem čimbenika rasta i citokina, kao što su TGF- β 1, TNF- α i IFN- γ . Stoga, značajno je za istražiti da li je stupanj fibroze jetre utjecao na sistemski imunosni odgovor tijekom liječenja (Nakayama i sur., 2021). U brazilskom istraživanju, Riberio i suradnici sistematizirali su bolesnike u dvije skupine (cirotični i ne-cirotični). Rezultati tog istraživanja pokazali su različite obrasce serumskih koncentracija citokina i kemokina u ranoj i kasnoj fazi te nakon liječenja DAA-om. Važni biomarkeri u ranoj fazi liječenja u ne-cirotičnih ispitanika bili su IL-5, IL-1Ra te dva kemokina CCL5 i CCL11, dok je nakon završetka liječenja značajno povišena bila samo koncentracija IL-5. U ranoj fazi liječenja u cirotičnih ispitanika značajno su bile povećane koncentracije IL-1 β , IL-6, IL-12, VEGF i PDGF-AA (Riberio i sur., 2021). U ovom istraživanju, analizirajući koncentracije citokina prije započinjanja liječenja kod bolesnika s CHC-om s obzirom na početni stupanj fibroze, značajne razlike u ekspresiji citokina nisu dokazane, dok kod uspoređivanja koncentracija čimbenika rasta kod bolesnika s CHC-om je dokazana značajna razlika kod Ang-2, EGF, PDGF-AA i VEGF.

Koncentracije biomarkera u serumu prije liječenja s DAA-om pokazuju da su bolesnici s cirozom u usporedbi s bolesnicima bez ciroze već imali oslabljen imunosni odgovor. Ravnoteža između prouparnih i anti-upalnih čimbenika je važna zbog toga što prouparni citokini mogu potaknuti apoptozu stanica i eliminaciju virusa, dok prekomjerna sinteza TNF- α i IFN- γ može uzrokovati nekrozu tkiva. Imunosne reakcije posredovane s IFN klase I i II i stimulatorom gena povezanih s interferonom (engl. *Stimulator of Interferon-related Genes*, STING) ukazuju na važnost urođene imunosti i imunosnu kontrolu replikacije HCV-a. Suprotno tome, kako liječenje napreduje, epigenetskim mehanizmima geni postaju utišani, što znači da se ekspresija prouparnih citokina smanjuje ovisno o viremiji (Jittavisutthikul i sur. 2016).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na važnost kemokina u fibrogenezi i kemoatrakciji upalnih stanica za vrijeme ozljede jetre (de Souza-Cruz i sur. 2016; Pereira i sur. 2019). Kemokin CCL11 pojačano je eksprimiran u utišanim HSC, a njegova ekspresija korelira sa stupnjem upale jetre s nekrozom i fibrozom te ukazuje na nepovoljnu prognozu i šest godina nakon praćenja. Infekcija HCV-om uzrokuje povećanu sintezu proučalnih citokina te je povezana s razvojem protuupalnog i profibrotičnog profila citokina i kemokina od početka virusne infekcije (de Souza-Cruz i sur. 2016; Pereira i sur. 2019).

Analizirajući ovisnost smanjenja stupnja fibroze 3 ili 4 kod bolesnika s CHC-om nakon postizanja SVR-a i koncentraciju citokina prije početka liječenja, u ovom istraživanju razlika u koncentracijama citokina nije bila značajna, dok su se kod analize čimbenika rasta pokazali značajnim Ang-2 i EPO. Meng i suradnici su pokazali da je EPO jedan od čimbenika koji su važni u remodeliranju tkiva (Meng i sur., 2012). Ovo istraživanje pokazalo je povećanje koncentracije EPO nakon izlječenja i nakon regresije fibroze kod bolesnika sa početnim stupnjem fibroze F3 i F4 što ukazuje na važnost EPO u regeneraciji tkiva jetre, odnosno regresiji fibroze. Hernández-Bartolomé i suradnici su analizirali koncentracije Ang-2 u serumu kao biomarkera ciroze CHC-a. Ekspresija Ang-2 u serumu analizirana je u uzorcima 179 bolesnika s CHC-om s cirozom i bez ciroze jetre. Koncentracija Ang-2 u serumu kod bolesnika s CHC-om bila je značajno povećana u bolesnika s cirozom (Hernández-Bartolomé i sur., 2016). U ovom istraživanju pokazano je značajno povećanje koncentracije Ang-2. Budući da značaj EPO i Ang-2 u CHC-u još uvijek nije dovoljno ispitani, potrebna su daljnja istraživanja koja bi potkrijepila ove rezultate.

Modelom logističke regresije analizirana je sistematizacija stupnja fibroze jetre u kojem su bolesnici s HCV-om bili podijeljeni u dvije grupe (bolesnici sa stupnjem fibroze 1 ili 2 i bolesnici sa stupnjem fibroze 3 ili 4). Bivarijantnom analizom utvrđena je povezanost sa stupnjem fibroze u kojem su se značajnim pokazali EGF i Ang-2. Ukoliko se koncentracija EGF-a dvostruko poveća, smanji se vjerojatnost za teži stupanj fibroze dva puta budući da je jedna od značajnijih uloga EGF-a regeneracija tkiva jetre. U slučaju da se koncentracija Ang-2 dvostruko poveća, vjerojatnost za napredovanje u teži stupanj fibroze se poveća četiri puta budući da je najvažnija uloga Ang-2 u angiogenezi, a HCC je najčešći primarni tumor jetre i vaskularizirani solidni tumor kojemu doprinosi angiogeneza. Ovi su podaci iznimno zanimljivi i jedinstveni pa su potrebna daljnja istraživanja.

Analizirane su i koncentracije citokina i čimbenika rasta s obzirom na genotipove 1 i 3 HCV-a. Rezultati su pokazali da razlika u koncentracijama citokina nije bila značajna kod bolesnika s CHC-om genotipova 1 i 3, dok je statistički značajna razlika za čimbenike rasta između ta dva genotipa uočena kod PDGF-AA, SCF i TGF- α . Za razliku od ovog istraživanja, Baharloo i suradnici su pokazali kod 90 bolesnika s CHC-om u uzorcima seruma da su bolesnici s podtipom HCV-a 3a imali veće koncentracije IL-10 i IL-17A u odnosu na bolesnike s genotipom 1a. Budući da su Th17 citokini

povezani s progresijom bolesti jetre kod bolesnika s CHC-om, prepostavili su da je IL-17A važan biološki marker u CHC-u (Baharlou i sur., 2017). Povećana učestalost steatoze kod bolesnika s CHC-om uzrokovanim genotipom 3 ukazuje na određene posebnosti imunopatogeneze ove bolesti obzirom na genotip HCV-a (Kasper i sur., 2017).

Koncentracija TGF- α i SCF kod bolesnika s CHC-om genotipa 3 bila je statistički značajnu veća u odnosu na bolesnike zaražene HCV-om genotipa 1. Koncentracija PDGF-AA kod bolesnika s CHC-om genotipa 1 bila je značajno veća u odnosu na bolesnike s genotipom 3. Istraživanja su pokazala kako je stupanj steatoze povezan s kinetikom intrahepatične virusne replikacije kod bolesnika genotipom 3, što ukazuje na izravni steatogeni učinak ove molekularne forme virusa (Noureddin i sur., 2018) Kod bolesnika s CHC-om, prevalencija steatoze u rasponu je od 40 do 86%, a ovisi o ispitivanoj populaciji i genotipu virusa (Radmanić i sur., 2019). S obzirom da do sada nisu provedena istraživanja koja ispituju koncentracije čimbenika rasta u infekciji HCV-om u odnosu na genotipove, trebalo bi ove rezultate dodatno potvrditi.

Ovo istraživanje je pokazalo da infekcija HCV-om uzrokuje promjenu citokina i čimbenika rasta na razini transkripcije gena i ekspresije proteina u imunosnom sustavu uslijed liječenja DAA-om. Dodatna analiza molekularnih obrazaca važnih za razvoj i regresiju fibroze kod CHC-a te modulatora bioloških odgovora koji ih reguliraju na lokalnoj, ali i na sistemskoj razini, značajno će pridonijeti boljem razjašnjavanju fiziologije imunoreakcija u kroničnoj infekciji HCV-om te mehanizmima nastanka fiboze.

6. ZAKLJUČCI

1. Infekcija HCV-om uzrokuje promjenu u profilu ekspresije citokina i čimbenika rasta na razini transkripcije gena i ekspresije proteina.
2. Tijekom CHC-a dolazi do potiskivanja prijenosa signala čimbenika rasta TGF-β putem pojačane ekspresije gena *SMAD-6* i smanjene ekspresije gena *CAV-1*.
3. Smanjenje ekspresije gena koji kodiraju sintezu remodelirajućih enzima izvanstaničnog matriksa (*LOX*, *MMP-1*, *PLG* i *TIMP-3*), staničnih adhezijskih molekula (*ITGA-1*, *ITGA-2*) i transkripcijskog faktora (*CEBPB*) uz povećanu ekspresiju gena koji kodiraju sintezu enzima *MMP-8* ukazuje na značajne i višestruke promjene u različitim molekularnim mehanizmima koji su značajni za imunopatogenezu fibroze u CHC-u.
4. Povećana ekspresija Th2 citokina IL-4 i IL-5 ukazuje na dominaciju humoralne imunosti koja ne iskazuje zaštitni učinak u CHC-u.
5. Povećana koncentracija čimbenika rasta EGF, EPO, HGF, SCF i VEGF koji imaju važnu ulogu u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji, regeneraciji, eritropoezi, hematopoezi i angioigenezi nakon primjene DAA pokazuje kako iskorjenjivanje virusa omogućuje eksresiju modulatora biološkog odgovora koji doprinose regeneraciji jetre.
6. Ekspresija citokina kod bolesnika s CHC-om na individualnoj razini je homogena, dok je koncentracija čimbenika rasta heterogena u pojedinih bolesnika.
7. Povećana ekspresija čimbenika rasta SCF kod bolesnika s CHC-om povezana je s povećanom ekspresijom Th2 citokina IL-4 koji utječe na fenotip aktiviranih fibroblasta potičući njihovu diferencijaciju u miofibroblaste tj. stanice koje imaju iznimno značajnu ulogu u patogenezi fibroze jetre.
8. Značajne razlike u obrascu ekspresije čimbenika rasta TGF- α , SCF i PDGF-AA kod bolesnika s CHC-om uzrokovanim genotipovima 1 i 3 HCV-a ukazuju na posebnosti u patogenezi CHC-a uzrokovanog genotipom 3 HCV-a koji se povezuje s povećanom učestalosti steatoze.

7. LITERATURA

Abbas AK, Lichtman A, Pillai S, Batinić D. Stanična i molekularna imunologija. Virusni hepatitisi. 8 izdanje. Zagreb: Medicinska naklada,2018.

Abbas AK, Lichtman AU. Basic immunology. Functions and disorders of the immune system. 3rd edition. Saunders, Philadelphia, 2011.

Abdel-Hakeem MS, Shoukry NH. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. Front Immunol. 2014;5:274. doi: 10.3389/fimmu.2014.00274.

Adams RL, Pirakitikulr N, Pyle AM. Functional RNA structures throughout the Hepatitis C Virus genome. Curr Opin Virol. 2017;79-86. doi: 10.1016/j.coviro.2017.04.007.

Acharya P, Chouhan K, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Cellular Mechanisms of Liver Fibrosis. Front Pharmacol. 2021;12:671640. doi: 10.3389/fphar.2021.671640.

Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. Cells. 2019;8(5):471. doi: 10.3390/cells8050471.

Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. Mayo Clin Proc. 2006;81(9):1241-57. doi: 10.4065/81.9.1241.

Amoras EDSG, Monteiro Gomes ST, Freitas Queiroz MA, de Araújo MSM, de Araújo MTF, da Silva Conde SRS, Ishak R, Vallinoto ACR. Intrahepatic interleukin 10 expression modulates fibrinogenesis during chronic HCV infection. PLoS One. 2020;15(10):e0241199. doi: 10.1371/journal.pone.0241199.

Attallah AM, El-Far M, Ghaly MF, Omran MM, Albannan MS, Attallah AA, Shoghey TM, Atrees MM, Elbendary MS, Farid K. Circulating levels of collagen III and MMP-1 in patients with chronic hepatitis C co-infected with hepatitis B virus. Br J Biomed Sci. 2017;74(2):95-100. doi: 10.1080/09674845.2017.

Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. Turk J Gastroenterol. 2018;29(1):14-21. doi: 10.5152/tjg.2018.17330.

Baharlou R, Romani B, Kiani SJ, Sadeghi K, Shadmand E, Fazel H, Jalilian FA, Kord E, Yaghoubi S, Nikmanesh Y, Ahmadi Vasmehjani A. Genotype-related variations in proinflammatory and regulatory cytokine levels in treated and treatment-naive HCV-infected patients. *Med Microbiol Immunol*. 2018;207(1):65-74. doi: 10.1007/s00430-017-0527-9.

Baiocchini A, Del Nonno F, Taibi C, Visco-Comandini U, D'Offizi G, Piacentini M, Falasca L. Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) modifications in patients with chronic hepatitis C. *Sci Rep*. 2019;9(1):8760. doi: 10.1038/s41598-019-45114-1.

Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med*. 2002;195(5):603-16. doi: 10.1084/jem.20011629.

Barooah P, Saikia S, Kalita MJ, Bharadwaj R, Sarmah P, Bhattacharyya M, Goswami B, Medhi S. IL-10 Polymorphisms and Haplotypes Predict Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma Occurrence in Patients with Hepatitis C Virus Infection from Northeast India. *Viral Immunol*. 2020 ;33(6):457-467. doi: 10.1089/vim.2019.0170.

Batyrova AS, Vasilieva EM, Bakanov MI, Surkov AN. [Biomarkers of angiogenesis and endothelial dysfunction in children and adolescents with chronic viral hepatitis.]. *Klin Lab Diagn*. 2019;64(10):588-593. Russian. doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-10-588-593.

Batsaikhan B, Lu MY, Yeh ML, Huang CI, Huang CF, Lin ZY, Chen SC, Huang JF, Hsieh PH, Chuang WL, Lee JC, Yu ML, Dai CY. Elevated interleukin-4 levels predicted advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *J Chin Med Assoc*. 2019;82(4):277-281. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000064.

Bièche I, Asselah T, Laurendeau I, Vidaud D, Degot C, Paradis V, Bedossa P, Valla DC, Marcellin P, Vidaud M. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology*. 2005;332(1):130-44. doi: 10.1016/j.virol.2004.11.009.

Björkström NK, Strunz B, Ljunggren HG. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(2):112-123. doi: 10.1038/s41577-021-00558-3.

Bohmwald K, Gálvez NMS, Canedo-Marroquín G, Pizarro-Ortega MS, Andrade-Parra C, Gómez-Santander F, Kalergis AM. Contribution of Cytokines to Tissue Damage During Human Respiratory Syncytial Virus Infection. *Front Immunol.* 2019;10:452. doi: 10.3389/fimmu.2019.00452.

Boldeanu MV, Siloş I, Bărbulescu AL, Sandu RE, Geormăneanu C, Pădureanu V, Popescu-Drigă MV, Poenariu IS, Siloş CA, Ungureanu AM, Dijmărescu AL, Boldeanu L. Host immune response in chronic hepatitis C infection: involvement of cytokines and inflammasomes. *Rom J Morphol Embryol.* 2020;61(1):33-43. doi: 10.47162/RJME.61.1.04.

Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:53-61. doi: 10.1016/j.cytofr.2015.10.002.

Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9739. doi: 10.3390/ijms21249739.

Capone F, Guerriero E, Sorice A, Maio P, Colonna G, Castello G, Costantini S. Characterization of metalloproteinases, oxidative status and inflammation levels in the different stages of fibrosis in HCV patients. *Clin Biochem.* 2012;45(7-8):525-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.02.004.

Caviglia GP, Sciacca C, Abate ML, Olivero A, Rosso C, Touscoz GA, Ciancio A, Rizzetto M, Smedile A. Chronic hepatitis C virus infection and lymphoproliferative disorders: mixed cryoglobulinemia syndrome, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30(4):742-7. doi: 10.1111/jgh.12837.

Chen PH, Chen X, He X. Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834(10):2176-86. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.10.015.

Cheng H, Pan Y, Yao Y, Zhu Z, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y. Expression and significance of caveolin-1 in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med.* 2017;14(5):4356-4362. doi: 10.3892/etm.2017.5038.

Chigbu DI, Loonawat R, Sehgal M, Patel D, Jain P. Hepatitis C Virus Infection: Host–Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells.* 2019;8(4):376. doi: 10.3390/cells8040376.

Choi M, Lee S, Choi T, Lee C. A hepatitis C virus NS4B inhibitor suppresses viral genome replication by disrupting NS4B's dimerization/multimerization as well as its interaction with NS5A. *Virus Genes*. 2013;47(3):395-407. doi: 10.1007/s11262-013-0956-5.

Cokakli M, Erdal E, Nart D, Yilmaz F, Sagol O, Kilic M, Karademir S, Atabey N. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. *BMC Cancer*. 2009;9:65. doi: 10.1186/1471-2407-9-65.

Colpitts CC, Baumert TF. SMAD About Hepatitis C Virus Cell Entry and Liver Disease. *Gastroenterology*. 2017;152(1):21-23. doi: 10.1053/j.gastro.2016.11.029.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-62. doi: 10.1126/science.2523562.

Choobin H, Bamdad T, Shekarabi M. The pattern of antiviral protein expression induced by interferon λ1 in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis C virus infection. *Arch Virol*. 2020;165(3):583-592. doi: 10.1007/s00705-019-04438-z.

Cosset FL, Mialon C, Boson B, Granier C, Denolly S. HCV Interplay with Lipoproteins: Inside or Outside the Cells? *Viruses*. 2020;12(4):434. doi: 10.3390/v12040434.

Dabral P, Khera L, Kaul R. Host proteins associated with Hepatitis C virus encoded NS4A. *Virusdisease*. 2014;25(4):493-6. doi: 10.1007/s13337-014-0240-x.

Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija; peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2017.

de Souza-Cruz S, Victória MB, Tarragô AM, da Costa AG, Pimentel JP, Pires EF, Araújo Lde P, Coelho-dos-Reis JG, Gomes Mde S, Amaral LR, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Victória Fda S, Malheiro A. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: a proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10. *BMC Microbiol*. 2016;16:3. doi: 10.1186/s12866-015-0610-6.

Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci Signal.* 2019;12(570):eaav5183. doi: 10.1126/scisignal.aav5183.

Dhar D, Baglieri J, Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood).* 2020;245(2):96-108. doi: 10.1177/1535370219898141.

DI Maira G, Pastore M, Marra F. Liver fibrosis in the context of nonalcoholic steatohepatitis: the role of adipokines. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2018;64(1):39-50. doi: 10.23736/S1121-421X.17.02427-8.

Dranoff JA, Wells RG. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology.* 2010;51(4):1438-44. doi: 10.1002/hep.23405.

Du K, Liu J, Broering R, Zhang X, Yang D, Dittmer U, Lu M. Recent advances in the discovery and development of TLR ligands as novel therapeutics for chronic HBV and HIV infections. *Expert Opin Drug Discov.* 2018;13(7):661-670. doi: 10.1080/17460441.2018.1473372.

Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S3-S13. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.

Duncan JD, Urbanowicz RA, Tarr AW, Ball JK. Hepatitis C Virus Vaccine: Challenges and Prospects. *Vaccines (Basel).* 2020;8(1):90. doi: 10.3390/vaccines8010090.

El-Bassiouni NE, Nosseir MM, Madkour ME, Zoheiry MM, Bekheit IW, Ibrahim RA, Ibrahim IM, El Bassiouny AE. Role of fibrogenic markers in chronic hepatitis C and associated hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2012;39(6):6843-50. doi: 10.1007/s11033-012-1509-z.

El-Emshaty HM, Nasif WA, Mohamed IE. Serum Cytokine of IL-10 and IL-12 in Chronic Liver Disease: The Immune and Inflammatory Response. *Dis Markers.* 2015;2015:707254. doi: 10.1155/2015/707254.

European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; Clinical Practice Guidelines Panel: Chair:; EASL Governing Board representative:; Panel members:; EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *J Hepatol.* 2020;73(5):1170-1218. doi: 10.1016/j.jhep.2020.08.018.

Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB, Brooks DG. Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2011;208(5):987-99. doi: 10.1084/jem.20101773.

Fang MZ, Jackson SS, O'Brien TR. IFNL4: Notable variants and associated phenotypes. *Gene.* 2020;730:144289. doi: 10.1016/j.gene.2019.144289.

Fénéant L, Levy S, Cocquerel L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses.* 2014;6(2):535-72. doi: 10.3390/v6020535.

Feng H, Feng J, Zhang Z, Xu Q, Hu M, Wu Y, Lu Y. Role of IL-9 and IL-10 in the pathogenesis of chronic spontaneous urticaria through the JAK/STAT signalling pathway. *Cell Biochem Funct.* 2020;38(4):480-489. doi: 10.1002/cbf.3481.

Fernández-Ponce C, Dominguez-Villar M, Muñoz-Miranda JP, Arbulo-Echevarria MM, Litrán R, Aguado E, García-Cozar F. Immune modulation by the hepatitis C virus core protein. *J Viral Hepat.* 2017;24(5):350-356. doi: 10.1111/jvh.12675.

Gao Y, Nepal N, Jin SZ. Toll-like receptors and hepatitis C virus infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2021;20(6):521-529. doi: 10.1016/j.hbpd.2021.07.011.

Gawlik K, Gallay PA. HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. *Immunol Res.* 2014;60(1):1-10. doi: 10.1007/s12026-014-8494-3.

Ghany MG, Lok ASF, Dienstag JL, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Jake Liang T, Seeff LB, Cohen DE, Bezerra JA, Chung RT. The 2020 Nobel Prize for Medicine or Physiology for the Discovery of Hepatitis C Virus: A Triumph of Curiosity and Persistence. *Hepatology.* 2021;74(5):2813-2823. doi: 10.1002/hep.31830.

Göschl L, Scheinecker C, Bonelli M. Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Semin Immunopathol.* 2019 May;41(3):301-314. doi: 10.1007/s00281-019-00741-8.

HCV classification. International Committee for Taxonomy of Viruses. https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification; 2021. (pristupljeno: travanj 2021)

He Z, Yang D, Fan X, Zhang M, Li Y, Gu X, Yang M. The Roles and Mechanisms of lncRNAs in Liver Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1482. doi: 10.3390/ijms21041482.

Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S14-25. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.035.

Hernández-Bartolomé Á, López-Rodríguez R, Borque MJ, González-Moreno L, Real-Martínez Y, García-Buey L, Moreno-Otero R, Sanz-Cameno P. Angiopoietin-2/angiopoietin-1 as non-invasive biomarker of cirrhosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2016;22(44):9744-9751. doi: 10.3748/wjg.v22.i44.9744.

Hofmann M, Tauber C, Hensel N, Thimme R. CD8+ T Cell Responses during HCV Infection and HCC. *J Clin Med.* 2021;10(5):991. doi: 10.3390/jcm10050991.

Huang G, Brigstock DR. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17(7):2495-507. doi: 10.2741/4067.

Huang J, Xu R, Wang M, Liao Q, Huang K, Shan Z, You Q, Li C, Rong X, Fu Y. Association of HLA-DQB1*03:01 and DRB1*11:01 with spontaneous clearance of hepatitis C virus in Chinese Li ethnicity, an ethnic group genetically distinct from Chinese Han ethnicity and infected with unique HCV subtype. *J Med Virol.* 2019;91(10):1830-1836. doi: 10.1002/jmv.25531.

Ikenaga N, Peng ZW, Vaid KA, Liu SB, Yoshida S, Sverdlov DY, Mikels-Vigdal A, Smith V, Schuppan D, Popov YV. Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal. *Gut.* 2017;66(9):1697-1708. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312473.

Irshad M, Gupta P, Irshad K. Immunopathogenesis of Liver Injury During Hepatitis C Virus Infection. *Viral Immunol.* 2019;32(3):112-120. doi: 10.1089/vim.2018.0124.

Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, Liu X, Xu J, Wang P, Paik YH, Meng F, Asagiri M, Murray LA, Hofmann AF, Iida T, Glass CK, Brenner DA, Kisilevka T. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(32):E3297-305. doi: 10.1073/pnas.1400062111.

Janczewska-Kazek E, Marek B, Kajdaniuk D, Borgiel-Marek H. Effect of interferon alpha and ribavirin treatment on serum levels of transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2006;12(6):961-5. doi: 10.3748/wjg.v12.i6.961.

Jittavisutthikul S, Seesuay W, Thanongsaksrikul J, Thueng-In K, Srimanote P, Werner RG, Chaicumpa W. Human Transbodies to HCV NS3/4A Protease Inhibit Viral Replication and Restore Host Innate Immunity. *Front Immunol.* 2016;7:318. doi: 10.3389/fimmu.2016.00318.

Kasper LD, Fauci AS. Harrison's Infectious diseases. 3rd. Viral infectious. McGraw-Hill Education, New York, 2017.

Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene.* 2017;614:1-7. doi: 10.1016/j.gene.2017.03.003.

Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(3):151-166. doi: 10.1038/s41575-020-00372-7.

Krenke K, Szczaluba K, Bielecka T, Rydzanicz M, Lange J, Koppolu A, Płoski R. FARSA mutations mimic phenylalanyl-tRNA synthetase deficiency caused by FARS2 defects. *Clin Genet.* 2019;96(5):468-472. doi: 10.1111/cge.13614.

Lambrecht J, van Grunsven LA, Tacke F. Current and emerging pharmacotherapeutic interventions for the treatment of liver fibrosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2020;21(13):1637-1650. doi: 10.1080/14656566.2020.1774553.

Latronico T, Mascia C, Pati I, Zuccala P, Mengoni F, Marocco R, Tieghi T, Belvisi V, Lichtner M, Vullo V, Mastroianni CM, Liuzzi GM. Liver Fibrosis in HCV Monoinfected and HIV/HCV Coinfected Patients: Dysregulation of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Their Tissue Inhibitors TIMPs and Effect of HCV Protease Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):455. doi: 10.3390/ijms17040455.

Lauletta G, Russi S, Conteduca V, Sansonno L. Hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:502156. doi: 10.1155/2012/502156.

Li C, Lu L, Qi Z, Zhu Y, Su F, Zhao P, Dong H. Transcriptome and miRNome Analysis Provide New Insight Into Host Lipid Accumulation, Innate Immunity, and Viral Persistence in Hepatitis C Virus Infection in vitro. *Front Microbiol.* 2020;11:535673. doi: 10.3389/fmicb.2020.535673.

Li SF, Gong MJ, Zhao FR, Shao JJ, Xie YL, Zhang YG, Chang HY. Type I Interferons: Distinct Biological Activities and Current Applications for Viral Infection. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(5):2377-2396. doi: 10.1159/000495897.

Li Y, Xie Q, Lu F, Zhao J, Mao P, Li Z, Liu S, Zhuang H. Association between epidermal growth factor 61A/G polymorphism and hepatocellular carcinoma susceptibility in Chinese patients. *Liver Int.* 2010;30(1):112-8. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02134.x.

Li W, Li L, Hui L. Cell Plasticity in Liver Regeneration. *Trends Cell Biol.* 2020;30(4):329-338. doi: 10.1016/j.tcb.2020.01.007.

Lin XY, Wang H, Tan Y. [Role of Hepatocyte Growth Factor in Wound Repair]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2018 Dec 20;40(6):822-826. Chinese. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.10246. Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(10):688-700. doi: 10.1038/nrmicro3098.

Lohmann V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:167-98. doi: 10.1007/978-3-642-27340-7_7.

Luna JM, Scheel TK, Danino T, Shaw KS, Mele A, Fak JJ, Nishiuchi E, Takacs CN, Catanese MT, de Jong YP, Jacobson IM, Rice CM, Darnell RB. Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell.* 2015;160(6):1099-110. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.025.

Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):417-26. doi: 10.1055/s-2001-17555.

Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky JM, Razavi H, Terrault N, Younossi Z. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17006. doi: 10.1038/nrdp.2017.6.

Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology.* 2014;147(3):577-594.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2014.06.043.

Marín-Serrano E, Rodríguez-Ramos C, Díaz-García F, Martín-Herrera L, Fernández-Gutiérrez-Del-Alamo C, Girón-González JA. Hepatocyte growth factor and chronic hepatitis C. *Rev Esp Enferm Dig.* 2010;102(6):365-71. doi: 10.4321/s1130-01082010000600004.

Matthaeus C, Taraska JW. Energy and Dynamics of Caveolae Trafficking. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8:614472. doi: 10.3389/fcell.2020.614472.

Mayr C. What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(10):a034728. doi: 10.1101/cshperspect.a034728.

McGivern DR, Masaki T, Lovell W, Hamlett C, Saalau-Bethell S, Graham B. Protease Inhibitors Block Multiple Functions of the NS3/4A Protease-Helicase during the Hepatitis C Virus Life Cycle. *J Virol.* 2015;89(10):5362-70. doi: 10.1128/JVI.03188-14.

Mederacke I. Liver fibrosis - mouse models and relevance in human liver diseases. *Z Gastroenterol.* 2013;51(1):55-62. doi: 10.1055/s-0032-1330422.

Meng F, Francis H, Glaser S, Han Y, DeMorrow S, Stokes A, Staloch D, Venter J, White M, Ueno Y, Reid LM, Alpini G. Role of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in remodeling during liver regeneration. *Hepatology.* 2012;55(1):209-21. doi: 10.1002/hep.24673.

Michalopoulos GK, Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(1):40-55. doi: 10.1038/s41575-020-0342-4.

Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol.* 2000;75:115-57. doi: 10.1016/s0065-2776(00)75003-6.

Morris R, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Sci.* 2018;27(12):1984-2009. doi: 10.1002/pro.3519.

Mukozu T, Nagai H, Matsui D, Kanekawa T, Sumino Y. Serum VEGF as a tumor marker in patients with HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2013;33(3):1013-21.

Nakayama JY, Ho J, Cartwright E, Simpson R, Hertzberg VS. Predictors of progression through the cascade of care to a cure for hepatitis C patients using decision trees and random forests. Comput Biol Med. 2021;134:104461. doi: 10.1016/j.combiomed.2021.104461.

Neufeldt CJ, Joyce MA, Van Buuren N, Levin A, Kirkegaard K, Gale M Jr, Tyrrell DL, Wozniak RW. The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites. PLoS Pathog. 2016;12(2):e1005428. doi: 10.1371/journal.ppat.1005428.

Noureddin M, Wong MM, Todo T, Lu SC, Sanyal AJ, Mena EA. Fatty liver in hepatitis C patients post-sustained virological response with direct-acting antivirals. World J Gastroenterol. 2018;24(11):1269-1277. doi: 10.3748/wjg.v24.i11.1269.

Owusu DO, Phillips R, Owusu M, Sarfo FS, Frempong M. Increased levels of circulating IL-10 in persons recovered from hepatitis C virus (HCV) infection compared with persons with active HCV infection. BMC Res Notes. 2020;13(1):472. doi: 10.1186/s13104-020-05313-w.

Panic A, Reis H, Wittka A, Darr C, Hadaschik B, Jendrossek V, Klein D. The Biomarker Potential of Caveolin-1 in Penile Cancer. Front Oncol. 2021;11:606122. doi: 10.3389/fonc.2021.606122.

Papić N, Dušek D, Nemeth Blažić T, Kurelac I, Krznarić J, Vince A. Rezultati liječenja 3D- terapijom i model eliminacije infekcije HCV-om u Republici Hrvatskoj. Liječnički vjesnik. 2018 (pristupljeno 28.03.2022.);140(7-8). <https://doi.org/10.26800/LV-140-7-8-27>

Papic N, Radmanic L, Dusek D, Kurelac I, Zidovec Lepej S, Vince A. Trends of Late Presentation to Care in Patients with Chronic Hepatitis C during a 10-Year Period in Croatia. Infect Dis Rep. 2020;12(3):74-81. doi: 10.3390/idr12030016.

Parlati L, Hollande C, Pol S. Treatment of hepatitis C virus infection. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2021;45(4):101578. doi: 10.1016/j.clinre.2020.11.008.

Park SH, Rehermann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. Immunity. 2014;40(1):13-24. doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.010.

Pereira GL, Tarragô AM, Neves WLL, da Silva Neto PV, de Souza PS, Dos Santos Affonso J, de Sousa KS, da Silva JA, Costa AG, da Silva Victoria F, Victoria MB, Malheiro A. Immunological Dynamics Associated with Direct-Acting Antiviral Therapies in Naive and Experimented HCV Chronic-Infected Patients. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:4738237. doi: 10.1155/2019/4738237.

Piasecki A, Leiva O, Ravid K. Lysyl oxidase inhibition in primary myelofibrosis: A renewed strategy. *Arch Stem Cell Ther.* 2020;1(1):23-27. doi: 10.46439/stemcell.1.005.

Pol S, Lagaye S. The remarkable history of the hepatitis C virus. *Genes Immun.* 2019;20(5):436-446. doi: 10.1038/s41435-019-0066-z.

Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(3):161-176. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9.

Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Héliot L, Rouillé Y, Dubuisson J. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001278. doi: 10.1371/journal.ppat.1001278.

Preporuke za liječenje hepatitisa C, 2021. (pristupljeno 05.veljače 2022; <https://bfm.hr/hepatitis-c/>)
Radmanić L, Papić N, Kurelac I, Dušek D, Židovec Lepej S, Vince, A. Promjene stadija fibroze i steatoze jetre u bolesnika s kroničnim hepatitism C koji su liječeni direktno djelujućim antivirusnim lijekovima i postigli trajni virološki odgovor. *Infektološki glasnik.* 2019; 39 (3), 60-65.
<https://doi.org/10.37797/ig.39.3.1>

Ribeiro IG, Coelho-Dos-Reis JGA, Fradico JRB, Costa-Rocha IAD, Silva LD, Fonseca LADS, Stancioli RCS, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Teixeira R. Remodeling of immunological biomarkers in patients with chronic hepatitis C treated with direct-acting antiviral therapy. *Antiviral Res.* 2021;190:105073. doi: 10.1016/j.antiviral.2021.105073.

Rockey DC, Friedman SL. Fibrosis Regression After Eradication of Hepatitis C Virus: From Bench to Bedside. *Gastroenterology.* 2021;160(5):1502-1520.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2020.09.065.

Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*. 2020;9(4):875. doi: 10.3390/cells9040875.

Schilter H, Findlay AD, Perryman L, Yow TT, Moses J, Zahoor A, Turner CI, Deodhar M, Foot JS, Zhou W, Greco A, Joshi A, Rayner B, Townsend S, Buson A, Jarolimek W. The lysyl oxidase like 2/3 enzymatic inhibitor, PXS-5153A, reduces crosslinks and ameliorates fibrosis. *J Cell Mol Med*. 2019;23(3):1759-1770. doi: 10.1111/jcmm.14074.

Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biol*. 2018;68-69:435-451. doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.006.

Sghaier I, Mouelhi L, Rabia NA, Ghazoueni E, Almawi WY, Loueslati BY. IL-10 and IL-28B gene variants as predictors of sustained response to peginterferon and ribavirin therapy in chronic HCV infection. *Cytokine*. 2022;151:154008. doi: 10.1016/j.cyto.2017.03.007.

Shrivastava S, Mukherjee A, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *J Virol*. 2013;87(22):12284-12290. doi:10.1128/JVI.01962-13.

Shehata F, Abdel Monem N, Sakr M, Kasem S, Balbaa M. Epidermal growth factor, its receptor and transforming growth factor- β 1 in the diagnosis of HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 2013;30(3):673. doi: 10.1007/s12032-013-0673-x.

Shen C, Ge Z, Dong C, Wang C, Shao J, Cai W, Huang P, Fan H, Li J, Zhang Y, Yue M. Genetic Variants in KIR/HLA-C Genes Are Associated With the Susceptibility to HCV Infection in a High-Risk Chinese Population. *Front Immunol*. 2021;12:632353. doi: 10.3389/fimmu.2021.632353.

Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(9):555-567. doi: 10.1038/s41575-018-0020-y.

Seidkhani-Nahal A, Khosravi A, Mirzaei A, Basati G, Abbasi M, Noori-Zadeh A. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in ischemic stroke patients: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Neurol Sci*. 2021;42(5):1811-1820. doi: 10.1007/s10072-020-04698-7.

Sousa GM, Oliveira IS, Andrade LJ, Sousa-Atta ML, Paraná R, Atta AM. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. *Cytokine*. 2012;60(1):138-42. doi: 10.1016/j.cyto.2012.06.003.

Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun*. 2018;87:1-15. doi: 10.1016/j.jaut.2017.12.007.

Steinmann E, Doerrbecker J, Friesland M, Riebesehl N, Ginkel C, Hillung J, Gentzsch J, Lauber C, Brown R, Frentzen A, Pietschmann T. Characterization of hepatitis C virus intra- and intergenotypic chimeras reveals a role of the glycoproteins in virus envelopment. *J Virol*. 2013;87(24):13297-306. doi: 10.1128/JVI.01708-13.

Stuttfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*. 2009;61(9):915-22. doi: 10.1002/iub.234.

Talaat RM, Salem TA, El-Masry S, Imbarek A, Mokhles M, Abdel-Aziz A. Circulating pro- and anti-angiogenic mediators in patients infected with hepatitis C at different stages of hepatocellular carcinoma. *J Med Virol*. 2014;86(7):1120-9. doi: 10.1002/jmv.23932.

Tam AYY, Horwell AL, Trinder SL, Khan K, Xu S, Ong V, Denton CP, Norman JT, Holmes AM, Bou-Gharios G, Abraham DJ. Selective deletion of connective tissue growth factor attenuates experimentally-induced pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension. *Int J Biochem Cell Biol*. 2021;134:105961. doi: 10.1016/j.biocel.2021.105961.

Tan-Garcia A, Lai F, Sheng Yeong JP, Irac SE, Ng PY, Msallam R, Tatt Lim JC, Wai LE, Tham CYL, Choo SP, Lim T, Young DY, D'Ambrosio R, Degasperi E, Perbellini R, Newell E, Le Bert N, Ginhoux F, Bertoletti A, Chen Q, Dutertre CA. Liver fibrosis and CD206⁺ macrophage accumulation are suppressed by anti-GM-CSF therapy. *JHEP Rep*. 2019;2(1):100062. doi: 10.1016/j.jhepr.2019.11.006.

Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 2016;64(6):1994-2014. doi: 10.1002/hep.28820.

Tomer S, Arora SK. A juggernaut of innate & adaptive immune cells in chronic hepatitis C. Indian J Med Res. 2020;151(4):279-286. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1387_17.

Tzavlaki K, Moustakas A. TGF-β Signaling. Biomolecules. 2020;10(3):487. doi: 10.3390/biom10030487.

Ursu L, Calenic B, Diculescu M, Dima A, Constantinescu I. HLA Alleles and KIR Genes in Romanian Patients with Chronic Hepatitis C. J Gastrointestin Liver Dis. 2020;29(4):595-601. doi: 10.15403/jgld-2546.

Vilibic-Cavlek T, Kucinar J, Kaic B, Vilibic M, Pandak N, Barbic L, Stevanovic V, Vranes J. Epidemiology of hepatitis C in Croatia in the European context. World J Gastroenterol. 2015;21(32):9476-93. doi: 10.3748/wjg.v21.i32.9476.

Vince A. Virusni hepatitisi. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.283-300. (Begovac J i sur. Klinička infektologija)

Vince A, Židovec Lepej S, Bingulac-Popović J, Miletić M, Kuret S, Sardelić S, Vrakela IB, Kurelac I. Distribution of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Croatia: 2008-2015. Cent Eur J Public Health. 2018;26(3):159-163. doi: 10.21101/cejph.a5021.

Wang Q, Lash GE. Angiopoietin 2 in placentation and tumor biology: The yin and yang of vascular biology. Placenta. 2017;56:73-78. doi: 10.1016/j.placenta.2017.03.021.

Wang CC, Tseng KC, Tzeng IS, Kao JH. The impact of cytokine change after hepatitis C virus clearance by direct antiviral agents on the risk of hepatocellular carcinoma. J Formos Med Assoc. 2021;120(3):965-973. doi: 10.1016/j.jfma.2020.10.015.

WHO. Combating Hepatitis B and C to Reach Elimination by 2030. [Internet]. 2016 (citirano 2022 Jan 11). Dostupno na: <https://www.who.int/hepatitis/publications/hepelimination-by-2030-brief/en/>.
WHO. Global hepatitis report 2017.[internet]. 2017 (citirano 2022 Jan 13). Dostupno na: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>

Weiskirchen R, Tacke F. Liver Fibrosis: From Pathogenesis to Novel Therapies. Dig Dis. 2016;34(4):410-22. doi: 10.1159/000444556.

Wieland S, Makowska Z, Campana B, Calabrese D, Dill MT, Chung J, Chisari FV, Heim MH. Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatology*. 2014;59(6):2121-30. doi: 10.1002/hep.26770.

Sung PS, Racanelli V, Shin EC. CD8(+) T-Cell Responses in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Front Immunol*. 2014;5:266. doi: 10.3389/fimmu.2014.00266.

World Health Organization regional office for Europe. Hepatitis C in the WHO European region [Internet]. 2019 [citrano 202 Jan 15]. Dostupno na: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0009/377253/Fact-Sheet

Wu M, Ruan J, Zhong B. [Progress in human epidermal growth factor research]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2020;36(12):2813-2823. Chinese. doi: 10.13345/j.cjb.200209.

Wu MJ, Shanmugam S, Welsch C, Yi M. Palmitoylation of Hepatitis C Virus NS2 Regulates Its Subcellular Localization and NS2-NS3 Autocleavage. *J Virol*. 2019;94(1):e00906-19. doi: 10.1128/JVI.00906-19.

Xia HZ, Du Z, Craig S, Klisch G, Noben-Trauth N, Kochan JP, Huff TH, Irani AM, Schwartz LB. Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol*. 1997;159(6):2911-21.

Xu P, Luo A, Xiong C, Ren H, Yan L, Luo Q. SCUBE3 downregulation modulates hepatocellular carcinoma by inhibiting CCNE1 via TGF β /PI3K/AKT/GSK3 β pathway. *Cancer Cell Int*. 2022;22(1):1. doi: 10.1186/s12935-021-02402-z.

Yang C, Wang YL, Sun D, Zhu XL, Li Z, Ni CF. Increased expression of epidermal growth factor-like domain-containing protein 7 is predictive of poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(4):867-872. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_745_17.

Yamakawa S, Hayashida K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma*. 2019;7:10. doi: 10.1186/s41038-019-0148-1.

Yamazaki H, Oda M, Takahashi Y, Iguchi H, Yoshimura K, Okada N, Yokomori H. Relation between ultrastructural localization, changes in caveolin-1, and capillarization of liver sinusoidal endothelial cells in human hepatitis C-related cirrhotic liver. *J Histochem Cytochem*. 2013;61(2):169-76. doi: 10.1369/0022155412468590.

Ying HZ, Chen Q, Zhang WY, Zhang HH, Ma Y, Zhang SZ, Fang J, Yu CH. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Mol Med Rep*. 2017;16(6):7879-7889. doi: 10.3892/mmr.2017.7641.

Zhai N, Chi X, Li T, Song H, Li H, Jin X, Crispe IN, Su L, Niu J, Tu Z. Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(6):743-9. doi: 10.1038/cmi.2014.119.

Zhang CY, Yuan WG, He P, Lei JH, Wang CX. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol*. 2016;22(48):10512-10522. doi: 10.3748/wjg.v22.i48.10512.

Zhang F, Sodroski C, Cha H, Li Q, Liang TJ. Infection of Hepatocytes With HCV Increases Cell Surface Levels of Heparan Sulfate Proteoglycans, Uptake of Cholesterol and Lipoprotein, and Virus Entry by Up-regulating SMAD6 and SMAD7. *Gastroenterology*. 2017;152(1):257-270.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.033.

Zhang LJ, Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(11):1681-5. doi: 10.3748/wjg.v12.i11.1681.

Zhao Z, Lin CY, Cheng K. siRNA- and miRNA-based therapeutics for liver fibrosis. *Transl Res*. 2019;214:17-29. doi: 10.1016/j.trsl.2019.07.007.

Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(3):301-15. doi: 10.1038/cmi.2015.97.

8. POPIS KRATICA

| POPIS KRATICA | |
|---------------|---|
| aHSC | aktivirane zvjezdaste jetrene stanice |
| ALT | alanin aminotransferaza |
| ANG-2 | angiopoietin-2 |
| ARF | alternativni okvir čitanja |
| ARFP | protein alternativnog okvira čitanja |
| CB | kanabionoid |
| CCL | kemokinski ligand |
| CD | receptor za molekule DNA u citosolu |
| CD4 | klaster diferencijacije 4 |
| CD8 | klaster diferencijacije 8 |
| CD81 | klaster diferencijacije 81 |
| CHC | kronični hepatitis C |
| CLDN1 | klaudin-1 |
| CLR | lektinske receptore tipa C |
| CXCR | kemokinski receptor |
| DAA | direktno djelujući antivirusni lijekovi |
| DAMP | molekularni obrazac povezan s oštećenjem molekula |
| DC | dendritične stanice |
| ECM | vanstanični matriks |
| EGF | epidermni čimbenik rasta |
| EGFR | receptor epidermalnog čimbenika rasta |
| EPO | eritropoietin |
| FGF | čimbenik rasta fibroblasta |
| G-CSF | čimbenik rasta kolonija granulocita |
| GM-CSF | čimbenik rasta kolonija granulocita i makrofaga |
| HBV | virus hepatitisa B |
| HCC | hepatocelularni karcinom |
| HCV | virus hepatitisa C |
| HDL | lipoprotein visoke gustoće |
| HGF | čimbenik rasta hepatocita |
| HIV | virus humane imunodeficijencije |
| HLA | humani leukocitni antigen |
| HSC | jetrene zvjezdaste stanice |
| IFN | interferon |
| IFN- γ | interferon gama |
| IL | interleukin |
| IL-1 | interleukin 1 |
| IL-1 β | interleukin 1 beta |
| IL-4 | interleukin 4 |
| IL-5 | interleukin 5 |

| | |
|---------------|--|
| IL-6 | interleukin 6 |
| IL-9 | interleukin 9 |
| IL9R | receptor interleukina-9 |
| IL-10 | interleukin 10 |
| IL-12 | interleukin 12 |
| IL-13 | interleukin 13 |
| IL-17 | interleukin 17 |
| IL-21 | interleukin 21 |
| IL-22 | interleukin 22 |
| IL-23 | interleukin 23 |
| IL-26 | interleukin 26 |
| IRES | interno vezno mjesto ribosoma |
| IRF | regulatorni čimbenik interferona |
| ISG | interferon stimulirani geni |
| LD | lipidne kapljice |
| LDL | lipoproteini niske gustoće |
| LDL-R | lipoproteinski receptori niske gustoće |
| M-CSF | čimbenik rasta kolonija makrofaga |
| NGF | čimbenik rasta neurona |
| NK | prirodne stanice ubojice |
| NLR | receptore slične proteinu NOD |
| NS | ne-strukturni proteini |
| OCLN | okludin |
| ORF | otvoreni okvir čitanja |
| PAMP | prepoznavanje molekularnih obrazaca patogena |
| PCR | lančana reakcija polimeraze |
| pDC | plazmacitoidne dendritične stanice |
| PDGF | čimbenici rasta dobiveni iz trombocita |
| PDGFR | receptor čimbenika rasta dobiven iz trombocita |
| PPAR | peroksisomni receptori aktivirani proliferirajućim čimbenicima |
| PWID | osobe koje injektiraju droge |
| RLR | receptore slične proteinu RIG-I |
| RT-PCR | lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom |
| SAP | proteini akutne faze |
| SCF | čimbenik matičnih stanica |
| SR-BI | receptor receptora klase B tipa I |
| STAT | pretvarač signala i aktivator transkripcije |
| SVR | trajni virološki odgovor |
| TCR | T stanični receptor |
| TFH | folikularne efektorske populacije stanica |
| TGF | transformirajući čimbenik rasta |
| TGF- α | transformirajući čimbenik rasta alfa |
| TGF- β | transformirajući čimbenik rasta beta |

| | |
|---------------|--|
| TLR | Toll-like receptori slični Toll-u |
| TNF | čimbenik tumorske nekroze |
| TNF- α | čimbenik tumorske nekroze alfa |
| TNF- β | čimbenik tumorske nekroze beta |
| TRAIL | ligand koji inducira apoptozu povezanu s čimbenicima |
| TREG | T-regulatorne stanice |
| UTR | netranslatirajuća regija |
| VEGF | čimbenik rasta vaskularnog endotela |
| VLDL | lipoproteini vrlo niske gustoće |
| WHO | Svjetska zdravstvena organizacija |
| qHSC | utišane zvjezdaste jetrene stanice |

9. SAŽETAK

Virus hepatitisa C (HCV) pripada porodici *Flaviviridae* i rodu *Hepacivirus*. Konični hepatitis C (CHC) povezan je s nastankom upalne bolesti jetre, fibroze, ciroze te hepatocelularnog karcinoma. Molekularni mehanizmi imunopatogeneze CHC-a te uloga kompleksnih interakcija modulatora biološkog odgovora značajnih za razvoj fibroze nedostatno su istraženi. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti transkriptomski profil 84 gena koji su značajni u patogenezi fibroze te koji kodiraju sintezu profibrotičnih i antifibrotičnih medijatora biološkog odgovora, komponenti izvanstaničnog matriksa i adhezijskih molekula, remodelirajućih enzima, upalnih citokina i kemokina, čimbenika rasta koji pripadaju superporodici TGF- β , transkripcijskih čimbenika, kao i proteina značajnih za epitelno-mezenhimalnu tranziciju u osoba s CHC-om i zdravih osoba. Uz to, napravljena je usporedba koncentracija citokina i čimbenika rasta u serumu bolesnika s CHC-om i zdravih osoba i analiziran učinak antivirusnog liječenja u osoba koje su postigle trajni virološki odgovor. Tijekom CHC-a dolazi do inhibicije prijenosa signala čimbenika rasta TGF- β putem pojačane ekspresije gena *SMAD-6* i smanjene ekspresije gena *CAV-1*. Smanjenje ekspresije gena koji kodiraju sintezu remodelirajućih enzima izvanstaničnog matriksa (*LOX*, *MMP-1*, *PLG* i *TIMP-3*), staničnih adhezijskih molekula (*ITGA-1*, *ITGA-2*) i transkripcijskog faktora (*CEBPB*) uz povećanu ekspresiju gena koji kodiraju sintezu enzima *MMP-8* ukazuje na značajne i višestruke promjene u različitim molekularnim mehanizmima koji su značajni za imunopatogenezu fibroze u CHC-u. Nakon izlječenja infekcije HCV-om dokazana je značajno smanjena koncentracija proučalnog citokina IL-6. Statistički značajno povećane koncentracije čimbenika rasta EGF, HGF i VEGF nakon izlječenja infekcije HCV-a ukazuju na važnu ulogu ovih modulatora biološkog odgovora u regresiji fibroze, regeneraciji i cijeljenju tkiva jetre. Visoke koncentracije PDGF-AA i PDGF-BB kod bolesnika s CHC-om ukazuju na važnu ulogu PDGF-a u procesima popravka i regeneracije tkiva. Značajno povećana ekspresija čimbenika rasta SCF kod bolesnika s CHC-om povezana s povećanom ekspresijom Th2 citokina IL-4 koji utječe na fenotip aktiviranih fibroblasta potičući njihovu diferencijaciju u miofibroblaste. Značajne razlike u obrascu ekspresije čimbenika rasta TGF- α , SCF i PDGF-AA kod bolesnika s CHC-om uzrokovanim genotipovima 1 i 3 HCV-a ukazuju na posebnosti u patogenezi CHC-a uzrokovanog genotipom 3 HCV-a koji se povezuje s povećanom učestalosti steatoze.

Ovo istraživanje pokazalo je da infekcija HCV-om uzrokuje promjenu citokina i čimbenika rasta na razini transkripcije gena i ekspresije proteina u imunosnom sustavu uslijed liječenja DAA-om. Dodatna analiza molekularnih obrazaca važnih za razvoj i regresiju fibroze kod CHC-a te modulatora bioloških odgovora koji ih reguliraju na lokalnoj, ali i na sistemskoj razini, značajno će pridonijeti boljem razjašnjavanju fiziologije imunoreakcija u koničnoj infekciji HCV-om te mehanizmima nastanka fibroze.

10. SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) belongs to the family *Flaviviridae* and the genus *Hepacivirus*. Chronic hepatitis C (CHC) has been associated with inflammatory liver disease, fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The molecular mechanisms of CHC immunopathogenesis and the role of complex interactions of biological response modulators important for the development of fibrosis have been insufficiently investigated. The aim of this study was to compare the transcriptome profile of 84 genes that are important in the pathogenesis of fibrosis and encode the synthesis of profibrotic and antifibrotic mediators of biological response, extracellular matrix components and adhesion molecules, remodeling enzymes, inflammatory cytokines and chemokines, transcription factors, as well as proteins important for epithelial-mesenchymal transition in patients with CHC and healthy individuals. In addition, I compared cytokine and growth factors concentrations in sera of patients with CHC and healthy individuals and analyzed the effect of antiviral therapy in patients who achieved a sustained virological response. During CHC, suppression of TGF- β signal transduction occurs through increased *SMAD-6* gene expression and decreased *CAV-1* gene expression. Decreased expression of genes encoding the synthesis of remodeling extracellular matrix enzymes (*LOX*, *MMP-1*, *PLG* and *TIMP-3*), cell adhesion molecules (*ITGA-1*, *ITGA-2*) and transcription factor (*CEBPB*) with increased expression of genes encoding the synthesis of enzymes *MMP-8* indicates significant and multiple changes in various molecular mechanisms that are important for the immunopathogenesis of fibrosis in CHC. Significantly reduced concentration of the proinflammatory cytokine IL-6 has been shown after achieving sustained virological response. Significantly increased concentrations of growth factors EGF, HGF, and VEGF after achieving sustained virological response indicate an important role of these biological response modulators in fibrosis regression, regeneration, and liver tissue healing. High concentrations of PDGF-AA and PDGF-BB in patients with CHC indicate an important role of PDGF in tissue repair and regeneration processes. Significantly increased expression of SCF in patients with CHC is associated with increased expression of the Th2 cytokine IL-4. Significant differences in the pattern of expression of growth factors TGF- α , SCF and PDGF-AA in patients with CHC caused by HCV genotypes 1 and 3 indicate peculiarities in the pathogenesis of CHC caused by HCV genotype 3.

In conclusion, this study showed that HCV infection causes changes in cytokines and growth factors at the level of gene transcription and protein expression in the immune system due to DAA treatment. Additional analysis of molecular patterns important for the development and regression of fibrosis in CHC will significantly contribute to better understanding of immunoreactions in chronic HCV infection and mechanisms of fibrosis.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 01. kolovoza 1992. godine u Čakovcu. Pohađala sam Opću gimnaziju „Josipa Slavenskog“ u Čakovcu. Nakon završetka opće gimnazije, 2011. godine sam upisala Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjera eksperimentalne biologije. Diplomski studij završavam 2017. godine obranom rada pod nazivom „Raznolikost gena HLA-DRB4 u Hrvatskoj“. Pri kraju fakulteta, provela sam jedan semestar na Erasmus stručnoj praksi u Zavodu za transfuzijsku medicinu i serologiju u Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien-Medizinischer Universitätscampus u Beču u Austriji. Za vrijeme fakulteta, bila sam član Udruge studenata biologije (BIUS) u Mikrobiološkoj sekciji. Dobitnica sam dvije specijalne Rektorove nagrade za projekte: Noć biologije 2013. i Grabovača 2014. Posjedujem certifikat Goethe Instituta Deutsche Sprachdiplom Goethe Certificate C1. Bila sam studentski predstavnik u Vijeću biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te studentski predstavnik PMF-a u Vijeću prirodoslovlja.

Ubrzo nakon završetka fakulteta, 2017. godine zapošljavam se u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu gdje radim na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku, kao znanstveni novak i molekularni biolog. U 2018. godini upisujem Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti smjera biomedicina. Dobro se služim engleskim i njemačkim jezikom. Imam dobre IT vještine (Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint, Outlook, Explorer, R studio, upravljanje programom za citiranje radova (Mendeley) i znam koristiti bioinformatičke programe u analizi i dijagnostici npr. „HLA Type Stream NGS Analysis Software“. Stručno sam se usavršavala u Sveučilišnoj bolnici Essen na Odjelu za gastroenterologiju i hepatologiju u Essenu u Njemačkoj.

POPIS ZNANSTVENIH RADOVA:

1. Grubić Z, Maskalan M, Radmanić L, Štingl Janković K, Burek Kamenarić M, Žunec R. The distribution of the DRB4*01:03:01:02N null allele in HLA-DRB1~DQB1 haplotypes in the Croatian population. *HLA*, 2018; 91(1):23-28. doi: 10.1111/tan.13178.
2. Radmanić L, Papić N, Dušek D, Židovec Lepej S, Vince A. Promjene stadija fibroze i steatoze jetre u bolesnika s kroničnim hepatitisom C koji su liječeni direktno djelujućim antivirusnim lijekovima i postigli trajni virološki odgovor. *Infektočki glasnik*, 2019;39(3):60-65. doi:10.37797/ig.39.3.1.
3. Židovec Lepej S, Korać P, Škorić D, Batović M, Gršković P, Begić V, Harabajsa S, Radmanić L, Šimičić P. Biological features of SARS-CoV-2 and current approaches to antiviral therapy and vaccination. *Molecular and experimental biology in medicine*, 2020;3(2):1-16.

4. Židovec Lepej S, Matulić M, Gršković P, Pavlica M, Radmanić L, Korać P. miRNAs: EBV Mechanism for Escaping Host's Immune Response and Supporting Tumorigenesis. *Pathogens*, 2020;9 (5):353-353. doi:10.3390/pathogens9050353.
5. Papić N, Radmanić L, Dušek D, Kurelac I, Židovec Lepej S, Vince A. Trends of Late Presentation to Care in Patients with Chronic Hepatitis C during a 10-Year Period in Croatia. *Infect Dis Rep*, 2020;12(3):74-81. doi: 10.3390/idr12030016.
6. Radmanić L, Cetinić Balent N, Šimičić P, Vince A, Židovec Lepej S, Đaković Rode O. The Need for Systematic Monitoring and Improved Surveillance of Hepatitis C Patients in Croatia. *Southeastern European Medical Journal*, 2020;2(4):28-34.
7. Stipoljev F, Vujišić S, Ježek D, Vičić A, Radmanić L, Papić N, Židovec Lepej S. Mid trimester amniotic fluid soluble receptor tunica interna endothelial cell kinase-2 levels and risk for preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 2022;27(1):69-73. doi: 10.1016/j.preghy.2021.12.009.