



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



РУЖИЦА ЛУКИЋ

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

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: проф. др Иван Јовановић

КРАГУЈЕВАЦ, 2017. године

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

Овом приликом се захваљујем свом ментору проф. др Ивану Јовановићу на свесрдној помоћи током израде докторске дисертације, као и проф. др Небојши Арсенијевићу и проф. др Вељку Марићу на иницијативи, подршци, сугестијама и залагању у реализацији тезе.

Захваљујем се проф. др Небојши Арсенијевићу, проф. др Маји Ћупић, проф. др Жељку Мијаиловићу, проф. др Дејану Петровићу и проф. др Гордани Радосављевић на подршци, сугестијама и великом доприносу у реализацији ове тезе.

Хвала истраживачком тиму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и колективу Центра за биохемију и микробиологију у Универзитетској болници Фоча на помоћи у реализацији тезе, за уложени труд у финалној графичкој обради.

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

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

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Хепатитис Це вирус.....	2
1.1.1. Опште карактеристике.....	2
1.1.2. Морфологија, структура вируса и класификација	2
1.1.3. Генетичка варијабилност.....	4
1.1.4. Патогенеза HCV инфекције.....	6
1.1.5. Повезаност HCV генотипова са клиничким манифестацијама HС инфекције.....	8
1.2. Имуни одговор на хепатитис Це вирус.....	9
1.3. HCV инфекција код пацијената са терминалном болести бубрега.....	11
1.3.1. Фактори ризика за настанак HCV инфекције код пацијената на хемодијализи.....	12
1.4. Имуност пацијената са терминалном болести бубрега	14
1.5. Имуни одговор на HCV код пацијената са терминалном болести бубрега	16
1.6. Алгоритми у терапији HCV инфекције.....	17
1.7. Терапија HCV инфекције и мониторинг терапијског одговора.....	18
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	22.
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	23
3.1. Испитивани узорак.....	24
3.2. Истраживачки поступак.....	25
3.2.1. Лабораторијска дијагностика HCV инфекције.....	26
3.2.2. Одређивање биохемијских параметара функције јетре.....	27
3.2.3. Одређивање серумских цитокина.....	29
3.2.4. Доказивање анти HCV антители.....	30
3.2.5. Квалитативни RT-PCR	32
3.2.6. Квантитативни „Real time“ RT-PCR	33

3.2.7. Генотипизација HCV.....	34
3.3. Статистичка обрада података.....	35
4. РЕЗУЛТАТИ.....	38
5. ДИСКУСИЈА.....	51
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	58
7. СКРАЋЕНИЦЕ.....	59
8. ЛИТЕРАТУРА.....	61
9. ПРИЛОГ.....	78
9.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	78
9.2. KEYWORDS DOCUMENTATION.....	81
9.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА.....	84
9.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА.....	86
9.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS.....	87
9.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	88

1.УВОД

Прва идеја о постојању неког новог хепатитиса потиче још из седамдесетих година двадесетог вијека када је примјећена појава посттрансфузионог хепатитиса са скоро устаљеном инкубацијом од око 50 дана а да серолошки није припадао ни А ни В хепатитису. Хепатитис Це вирусна инфекција се манифестује као акутна и хронична форма болести али се у највећој мјери дијагностикује као хронична инфекција. Хепатитис Це вирус (HCV) узрочник хепатитиса Це, је водећи узрочник хроничног обољења јетре у свјетској популацији (Lavanchy, 2011). Због тога хепатитис Це вирусна инфекција представља озбиљан глобални здравствени проблем (Wang i Tai, 2016). Сматра се да око 3% свјетске популације (170-200 милиона људи) има хроничну HCV инфекцију, односно да око 2,7 милиона има активни хепатитис Це, који је дефинисан позитивним резултатом теста на HCV RНК у серуму пацијента (Hoshida, 2014; Yue-Cheng Yu, 2014). Сваке године се зарази 3-4 милиона људи, а више од 350.000 умре годишње од обољења повезаних са HCV инфекцијом (Da Silva, 2013; Bruno Pozzetto, 2014). Пацијенти са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (ТБИ), који су на хемодијализи, представљају ризичну групу за HCV инфекцију, због инвазивних медицинских процедура којима су изложени. Према литературним подацима, преваленција HCV инфекције код хемодијализираних пацијената је виша него у општој популацији и износи 3% у земљама западне Европе, до чак 20% у земљама јужне Европе (Thiel HJ, 2005; Rinonсе HT, 2013). HCV инфекцију карактерише интеракција између имунског система домаћина и самог вируса. Имуносупресија је једна од многих последица хроничне бубрежне инсуфицијенције. Дефекти имунског система су вјероватно последица дејства такозваних „уремичних токсина“, који обухватају велики број молекула као што су β 2-микроглобулин и реактивни кисеонични радикали (енгл. Reactive Oxygen Species- ROS).

Предмет овог истраживања је да се испитају карактеристике хепатитиса Це и антивирусног имунског одговора код пацијената са ТБИ на хемодијализи.

У уводном дијелу, прије описивања и дискусије добијених резултата, приказали смо опште аспекте патогенезе инфламацијске болести јетре и карциногенезе, као и основне механизме имунског одговора у овим болестима, који могу бити од значаја за разматрање наших резултата.

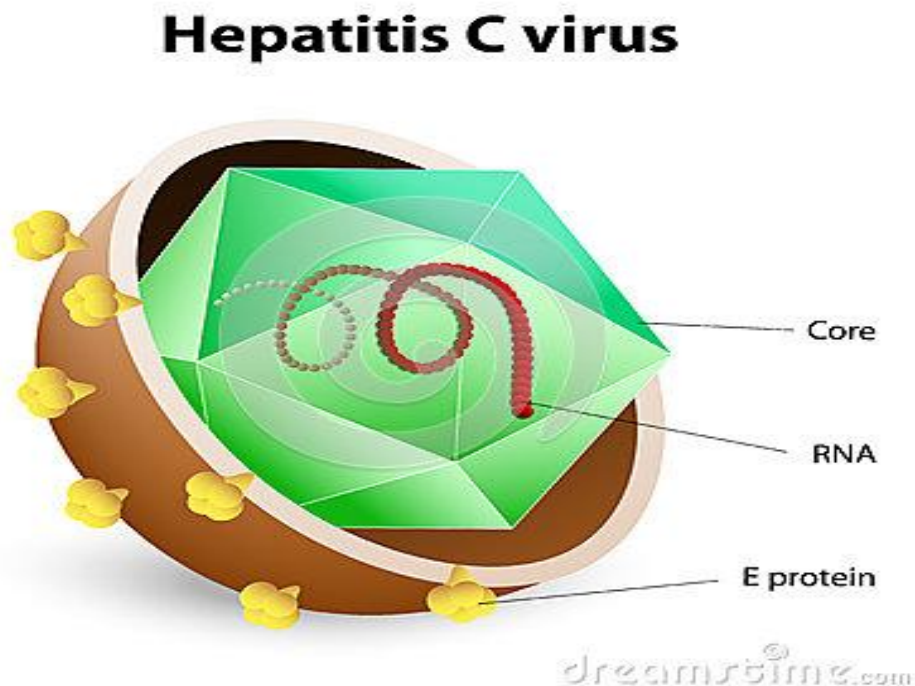
1.1. Хепатитис Це вирус

1.1.1. Опште карактеристике

Хепатитис Це вирус припада фамилији Flaviviridae, али је због својих специфичности у односу на остале флавивирусе издвојен у посебан род *Hepacivirus* (Jawetz и сар., 2004; Meir и Ramadori, 2009). На основу разлика у нуклеотидним секвенцама вирусног генома од 30% HCV изолати класификовани су у 7 генотипова који обухватају велики број субтипова а који имају различиту географску дистрибуцију (Јовановић и Мерковић, 2008; Gottwein, 2009; Kuiken, 2009).

1.1.2. Морфологија, структура вириона и класификација

Честица HCV је сферична партикула пречника 55-65 нм која садржи нуклеокапсид икозаедарне симетрије обавијен липидним омотачем (слика 1).



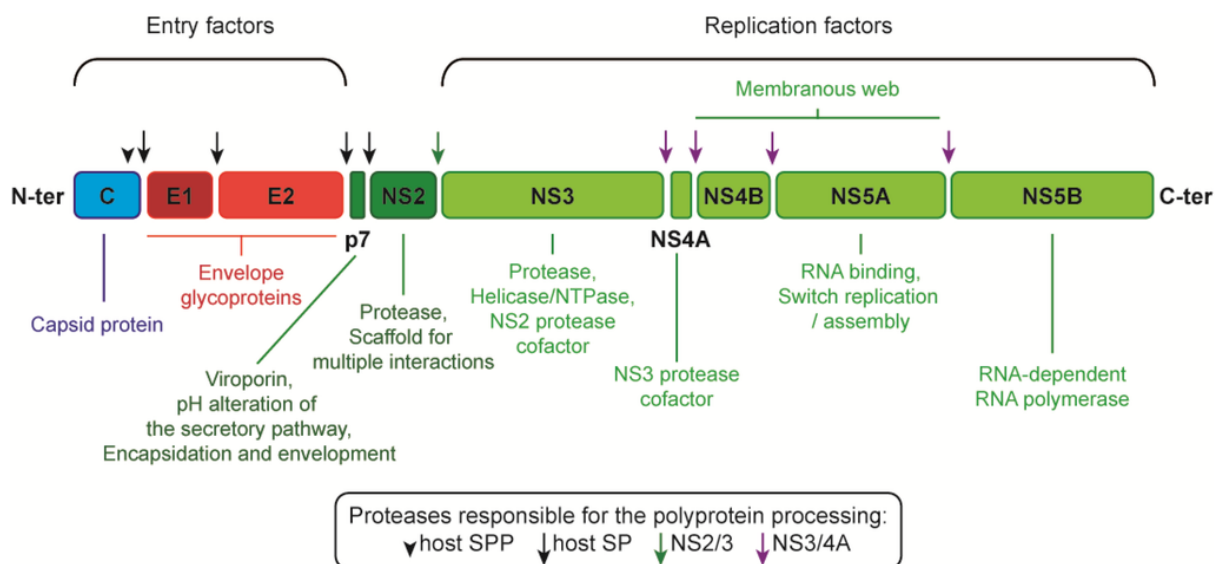
Слика 1. Структура хепатитис Це вириона

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

Вирусни геном представља једноланчана позитивна RNK (9.5 kb) која кодира полипротеин са 30000 аминокиселина и која на 5' крају има ковалентно везан VPg.

Геном садржи један отворени оквир читња (ORF- open reading frame), који је окружен некодирајућим регионима, који су потребни за транслацију и репликацију RNA вируса. Један полипротеин је кодиран од ORF, који је прије и посттранслаторно процесуиран ћелијским и вирусним протеазама како би синтетисали 10 зрелих протеина: C (Core), E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B и NS5A и NS5B (Lindenbach и Rice, 2005; Bartenschlager и сар., 2010; Lohmann, 2013).

Структурни дио генома (C, E1, E2 и евентуално P7 гени) кодира протеине нуклеокапсида или, »core« протеин и два гликопротеина омотача. Неструктурни дио вирусног генома, који обухвата NS2, NS3, NS4 и NS5 гене (Lin и сар., 1994; Reed и Rice, 2000; Bartenschlager и сар., 2013), одговоран је за синтезу RNK полмеразе, хеликазе, протеазе и осталих протеина неопходних у процесу репликације вируса (слика 2).



Слика 2. Морфологија и геномска структура вируса

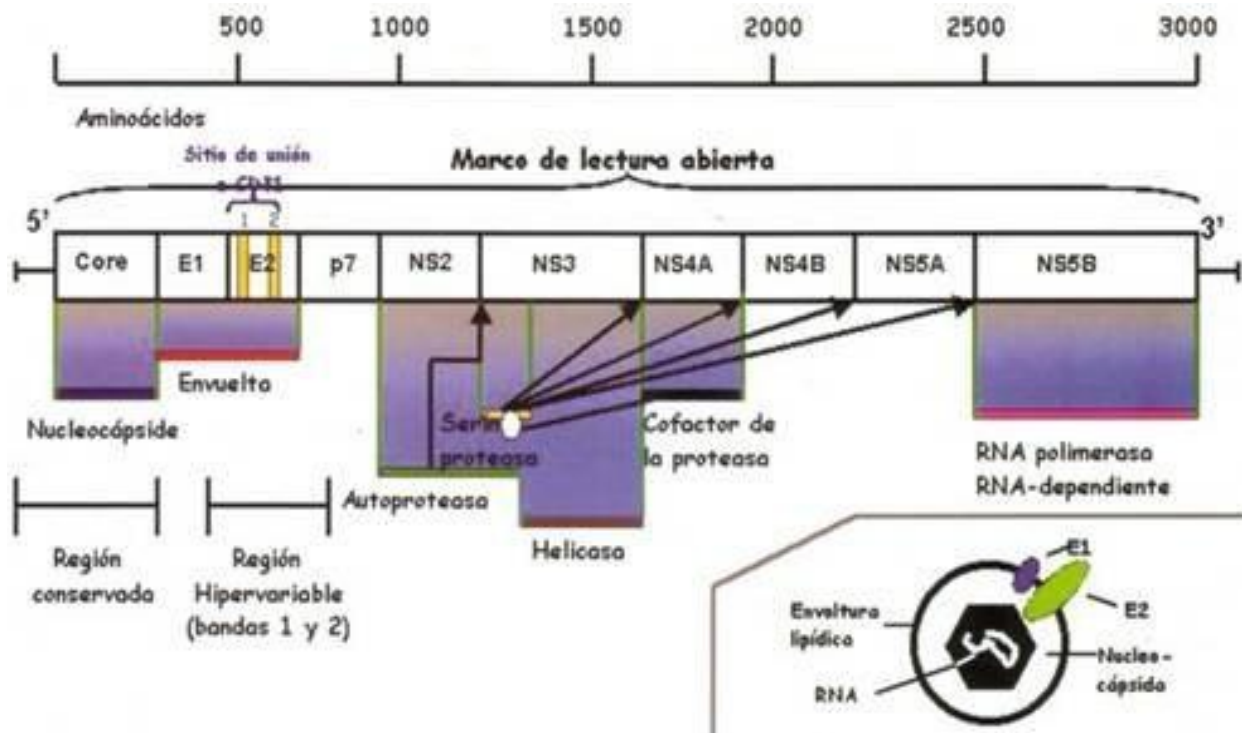
(Преузето од Vieyresi Dubuisson. *Viruses*. 2014; 6:1149-1187 doi:10.3390/v6031149)

HCV „core“ је познат као индуктор стеатозе, оксидативног стреса и хепатоцелуларног карцинома (HCC) (Mariya, 2001). E1 и E2 се сматрају првим вирусним протеинима који долазе у контакт са ћелијама домаћина (Liu и сар, 2006). Након вирусне инфекције, нуклеокапсид протеин језгра локализује се у цитосолу, ендоплазматском ретикулуму/Голџи апарату, митохондријама и језгру, и тако утиче на различите ћелијске функције (Hoshida и сар., 2014). Гликопротеини омотача (E1 и E2) су укључени у интеракцију са ћелијама домаћина и посредују улазак вируса, а уједно су и потенцијалне мете за развој вакцине (Zeisel и сар., 2013; Khan и сар., 2014). P7 је

протеин и назива се виропорин, позициониран на раскрсници између структурних и неструктурних вирусних протеина, који учествује у формирању јонских канала у липидној мембрани (Lin и сар., 1994; Carrere-Kremer и сар., 2004; Suresh, 2010). P7 и NS2 нису неопходни за репликацију генома, али су неопходни за склапање вирусне честице (Jones и сар., 2007; Steinmann и сар., 2007). NS3 има серин протеазну и хеликазну активност, и цијела низводно NS протеине заједно са NS4A. NS4B је компонента цитоплазматске мембране повезане са комплексом за HCV репликацију. NS5A је незаобилазан фактор у HCV репликацијском комплексу и склапању вириона. NS5B, RNA-зависна RNA полимераз, синтетише вирусне RNA (Hoshida и сар., 2014). Због своје неспособности да се стабилно интергрише у геном домаћина, за разлику од HBV, HCV захтијева континуирану репликацију за перзистенцију. Постоји неколико клиничких података, који указују на улогу HCV вирусних фактора у прогресији болести, као што су чешћа стеатоза код генотипа 3 и чешћи развој хепатоцелуларног карцинома (HCC) код генотипа 1b, иако постоје и супротне тврдње (Rubbia-Brandt и сар., 2000; Raimondi и сар., 2009; Lee и сар., 2010; Ishiguro и сар., 2011).

1.1.3. Генетичка варијабилност

Хепатитис Це вирус је варијабилан RNK вирус и варијабилност је последица мутација у геному вируса због високе репликативне активности вируса. Дневна продукција вириона је 10^{12} вириона а полуживот вируса је 2.7 сати (Нешковић и сар., 2003). Поред тога, репликацију генома катализује вирусна RNK полимераз која не може да исправља сопствене грешке које неминовно прави током синтезе. Конзервирани дијелови генома су 5' и 3' NTR (некодирајући региони) а најконзервиранији дио је ген који кодира ген капсида (С ген). За разлику од С гена Е1 и Е2 гени вириона различитих генотипова се разликују у нуклеотидним секвенцама. Поред тога Е2 регија је хиперваријабилна због спонтаних мутација у овом гену, што је од посебног значаја када се зна да су антителијела према Е2 протеину неутралишућа (Јовановић и Марковић, 2008) (слика 3).



Слика 3. HVR региони

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

Најваријабилнији дијелови су гени за протеине омотача. Први хиперваријабилни (HVR) регион представља 5' крај E2 гена означен као први хиперваријабилни регион - HVR 1. Други хиперваријабилни регион се налази на 3' крају HVR2, појављује се само код генотипа 1b чија је дужина 21 нуклеотид. HVR се састоји од 60 нуклеотида а његов полипептидни производ је главни неутралишући епитоп HCV (Shuklla и сар., 1995). Сви гени код различитих генотипова имају исту дужину, са изузетком E2, NS5A и 3' NTR. Генотипови 2a и 2b у NS5A региону имају инсертовану секвенцу од 60 нуклеотида (Нешковић и сар., 2003). Геномска анализа HCV који потиче из истог изолата показала је постојање разлика у структури и дужини секвенци односно појаву квазиврста. Термин квазиврсте произашао је из варијабилности генома HCV у оквиру истог изолата (разлика генома у барем једном нуклеотиду). За дужину итрајање терапије велики допринос дало је истраживање полиморфизама HCV генома који је варијабилан цијелом дужином (Shuklla и сар., 1995; Simmonds,1995). На основу процента нуклеотидне разлике генома, до данас је јасно дефинисано 7 различитих типова HCV (разлика генома до 30%) а у оквиру сваког генотипа утврђено је постојање неколико различитих субгенотипова који су дефинисани на основу нуклеотидне разлике од 20% на дужини цијелог генома (Simmonds и сар., 1993; Simmonds и сар., 2005). У сваком изолату једне инфициране особе присутно је више различитих квазиврста (Simmonds и

сар., 1993; Simmonds, 2004; Simmonds и сар., 2005; Kato, 2005). Квазиврсте код HCV-а се појављују углавном захваљујући постојању HVR1 E2 гена. Код генотипа 1b утврђено је постојање још једног хиперваријабилног дијела HVR 2 (Hijikata и сар, 1991). С обзиром да HVR кодира главне неутрализујуће епитопе, настајање квазиврста и њихове стаклене измјене у току инфекције су основни механизам којим HCV избјегава имунски одговор, настаје хронични хепатитис и тиме практично спречава настанак трајног имунитета. Варијабилност HCV је одговоран за непостојање ефикасне вакцине што онемогућава превенцију и контролу над ширењем инфекције. Значајан дио истраживања у молекуларној биологији HCV односи се на разјашњавање механизма настанка цирозе, као једног облика премалигне лезије као и хепатоцелуларног карцинома. Механизми HCV онкогенезе нису до данас сасвим познати. Највјероватније се она повезује са имунопатолошким збивањима која прате хроничну HCV инфекцију јер се још увијек тачно не зна који гени HCV имају онкогени потенцијал. Литературни подаци указују могућ утицај вирусних протеина на регулаторне нуклеарне протеинске компоненте хумане ћелије домаћина (Hijikata и сар., 1991; Miyasaka и сар., 2003). Како је присутна врло висока антигенска варијабилност, тако постоји и могућност шароликости антитијела, што и серолошку дијегностику понекада чини недовољно поузданом.

1.1.4. Патогенеза хепатитис Це вирусне инфекције

Извор HCV инфекције је човјек са акутном или хроничном Хепатитис Це инфекцијом. Вирус се налази у крви, саливи, сперми, вагиналном секрету, млијеку и другим тјелесним течностима. Пuteви преношења су: парентерални (преко крви, крвних деривата, трансплантираних органа и крвљу контаминираних предмета), сексуални и вертикални (перинатални и постнатални). Према подацима из литературе непознати пут преноса је и до 43% (Mc Lauchlan, 2000; Delić и сар., 1998). Најчешћи пут трансмисије међу мушкарцима био је због интравенског коришћења дроге или body piercing-а, док су се жене најчешће инфицирале због професионалног ризика при раду са инфицираним пацијентима (Delić, 2008).

Вирус доспијева у јетру путем крви. Патогенетски механизми који доводе до оштећења нису у потпуности разјашњени. Хуморални имунски одговор у акутној HCV инфекцији карактерише се појавом антитијела на капсидни С протеин, глкопротеине E1, E2 и остале неструктурне вирусне протеине. Активна инфекција у овој фази може да се потврди на основу присуства RNK генома и појаве антитијела на вирусне

антигене. Код око 15% инфицираних клинички ток иде по типу акутне инфекције. Код болесника са акутном HCV инфекцијом, чији је исход елиминација вируса, секвенца RНК вирусног генома може се открити PCR методом већ у току прве недеље, повишене вредности трансаминаза у периоду између 5-10 недеље, а антитијела између 7-ме и 30-те недеље од почетка инфекције. Послије елиминације вируса и нормализације вредности трансаминаза ниво антитијела одржава се још најмање годину дана или уопште не опада. Зато, због касне сероконверзије и присуства антитијела и послије елиминације вируса, код болесника са транзиторном виремијом антитијела не могу бити поуздан маркер вирусне репликације и инфекције (Јовановић и Марковић, 2008). Око 10-15% случајева доживи спонтану регресију („self-limited disease“), уз сероконверзију, претежно код младих и жена.

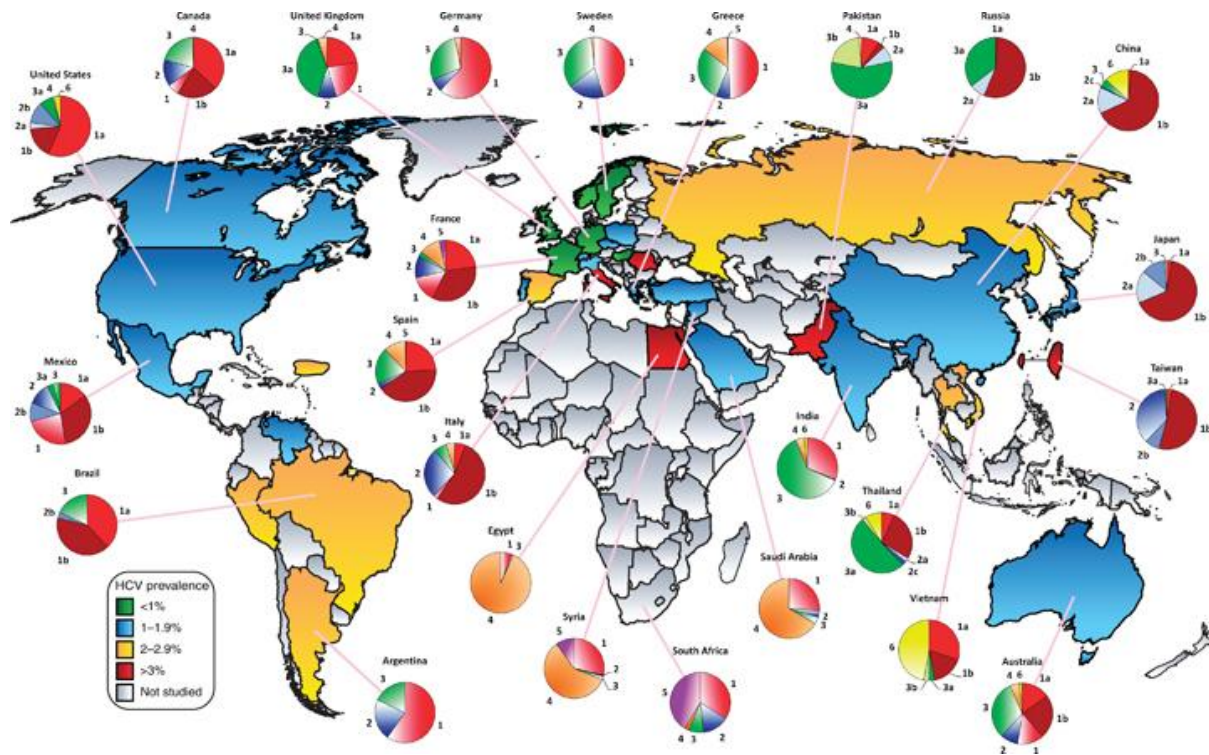
У преко 80% болесника, послије акутне инфекције, успоставља се перзистентна продуктивна, хронична инфекција (Rosen, 2011). Хронична инфекција се дефинише као присуство репликације вируса дуже од 6 мјесеци. Перзистентна HCV инфекција најчешће настаје као последица спонтаних мутација у E2 гену којима вирус избјегава елиминацију од стране имунског система (Nožić, 2003; Chang, 2003). Епидемиолошка и експериментална истраживања су показала да перзистентна HBV и HCV инфекција води успостављању хроничне инфекције која може да се компликује тешким болестима јетре, цирозом и хепатоцелуларним карциномом (Jesse Civan и сар., 2014; Лазаревић, 2014). С обзиром да вирус хепатитиса В не посједује трансформишуће гене, иако се помиње улога “х” гена у трансформацији (Chan и сар., 2013) вирус вејроватно дјелује индиректно, преко инсерционе мутагенезе или механизмом трансактивације протоонкогена (Sung и сар, 2012; Lazarević, 2014). Сматра се да имунски механизми учествују у онкогенези стимулацијом репарације ткива јетре (Hoshida и сар., 2014). Механизам трансформације ћелије вирусом хепатитиса С, који не посједује онкогене, такође није довољно познат. Вјерује се да је могућ механизам делеција p53 антионкогена, одговорног за заустављање уласка ћелије у S фазу деобног циклуса чиме се дозвољава ћелијска неконтролисана пролиферација која ћелију уводи у неконтролисан раст (Chan и сар, 2013). Када се успостави хронична инфекција многи фактори учествују у интеракцији између вируса и домаћина што утиче да је инфекција јединствена за сваког болесника. У факторе домаћина спадају имуногенетска предиспозиција, хуморални и ћелијски имунитет и продукција цитокина. У факторе вируса спадају директно цитопатогено дјеловање концентрације вируса а могуће и генотип. Кофактори, као што су конзумирање алкохола, имуносупресивни лијекови и

коинфекција са другим вирусима могу убрзати прогресију болести. Код болесника са хроничном HCV инфекцијом постоји перзистентна виремија праћена осцилирајућим вриједностима трансаминаза и антитијелима на вирусне амтигене (Delić и сар, 1998). Доказ присутности HCV RNK у два неовисна анти-HCV позитивна узорка узета у 6-9 мјесечном периоду потврда је хроничног хепатитиса С (Gupta, 2014). Сматра се да је оштећење јетре последица прије свега анти-HCV имунског одговора, а не директног цитопатогеног ефекта вируса *per se* (World health organizatione, 1999).

1.1.5. Повезаност HCV генотипова са клиничким манифестацијама HС инфекције

HCV генотипска дистрибуција у свијету је веома различита. Неки генотипови се јављају у високом проценту широм свијета (генотипови 1a, 1b, 2a, 2b) док се други јављају само у одређеним регијама (слика 4) (Wasley и Alter 2000; Nešković и сар., 2003; Alter, 2007; Delić и сар., 2008). Поједини HCV генотипови су јасно повезани са одрђеним дијеловима свијета што је важно за епидемиолошко праћење поријекла и ширења инфекције. У Европи доминирају генотипови 1, 2 и 3. Подтип 1b најчешћи је у јужној и источној Европи. У Југоисточној Европи је најчешћи тип 1b. У већини европских земаља ширење различитих генотипова везано је за старосне групе. Поједини подтипови чешћи су међу припадницима ризичних група па је тако генотип 3 чешћи међу интравенским корисницима дрога. Код хемофиличара и интравенских корисника дрога могуће је присуство више генотипова.

У литератури нема много података о дистрибуцији HCV генотипа међу хемодијализним (ХД) пацијентима. У студијама спроведеним у Холандији, Француској, Мароку, Мексику и Турској уочена је предоминантност генотипа 1b међу пацијентима на ХД-и (Perez и сар., 2003; Selcuk и сар, 2006). У неким студијама, генотип 1b је био у корелацији са вишом стопом еволуирања у хроничност, тежим обликом обољења јетре и агресивним током. Поједини истраживачи указују на то да је генотип 1b само маркер тежег обољења који осликава дуже трајање инфекције, јер су пацијенти са генотипом 1b обично старији (Zein NN, 2000). У студији у SAD-у, субтип 1 био је најчешћи, док су код италијанских ХД пацијената субтипови 2a и 3a били доминантни. Генерално гледано, чини се да је субтип 1a чешћи код ХД пацијената него код опште популације (Perez и сар., 2003; Marinaki и сар., 2015).



Слика 4. Дистрибуција HCV генотипова у свијету

(Преузето од Negro и Alberti. Posted by HCV New Drugs at Monday. 2011:31:1-3)

1.2. ИМУНСКИ ОДГОВОР НА ХЕПАТИТИС ЦЕ ВИРУС

Хепатитис Це вирус инфекцију карактерише интеракција између имунског система домаћина и самог вируса. Са појавом вирусних антигена, у крвотоку, покрећу се и ефекторски механизми урођене и стечене имуности. NK (енгл. *Natural Killer Cells*) ћелије представљају прву линију одбране од вирусних инфекција. Оне реагују на интрацелуларне микроорганизме убијањем инфицираних ћелија- хепатоцита и продукцијом IFN- γ који активира макрофаге. Стечена имуност игра значајну улогу у елиминацији и контроли вирусне инфекције. Интензитет, разноврсност и квалитет стеченог имунског одговора детерминишу исход инфекције (Thimme и сар., 2001). Клинички значај хуморалног имунског одговора није сасвим јасан. Антитијела према вирусу нису способна да елиминишу HCV али могу ометати улазак вируса у ћелију или помоћи његову елиминацију механизмом опсонизације. Антитијела могу допринијети оштећењу хепатоцита директном цитотоксичношћу, везивањем комплемента и антитијело-зависном цитотоксичношћу. Иако се током ове инфекције стварају неутралишућа антитијела, она су специфична за сој вируса те не омогућавају потпуну заштиту од реинфекције хомологним или хетерологним вирусом, а експерименталне

инфекције на мајмунима упућују на то да имуност није доживотна. Ефекторске функције вирус специфичних CD8⁺ и CD4⁺ Т лимфоцита важне су за елиминацију вируса и резолуцију болести (Thimme и сар., 2003). CD8⁺ цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T lymphocyte, CTL) представљају главни механизам стечене антивирусне имуности. CTLs елиминишу вирусом инфициране ћелије продукцијом перфоринона и гранзима и посредством лиганата смрти. CTL, који учествују у елиминацији вируса, продукују велике количине IFN- γ (Thimme и сар., 2001; Thimme и сар., 2002). Међутим, у раној фази инфекције CD8⁺ лимфоцити не могу излучити антивирусне цитокине као IFN- γ , стање названо „заочени фенотип“. У каснијој фази они поново стичу способност продукције цитокина што је повезано са брзим смањењем виремije и на послетку елиминацијом вируса. Специфични CD8⁺ и CD4⁺ Т лимфоцити перзистирају годинама након инфекције, чак дуже од хуморалног одговора. Насупрот томе, у перзистентној инфекцији одговор CD8⁺ лимфоцита је знатно слабији и није мултиспецифичан. Одговор вирус-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита праћен је појачаном секрецијом IL-2 и IFN- γ (Schulze и сар., 2005). С друге стране, перзистентност HCV инфекције праћена је повећаном заступљеношћу регулаторних CD4⁺CD25⁺ Т лимфоцита (Treg), који могу директно или индиректно да супримирају активност HCV- специфичних цитотоксичких Т лимфоцита код пацијената (Sugimoto и сар., 2003) као и лучење интерферона- γ што поспјешује перзистенцију вируса. Цитокини представљају протеине које продукују прије свега ћелије имунског система (Chen, 2005) и који су снажни имуномодулатори и главни учесници у заштити од вирусне инфекције, било „обликовањем“ имунског одговора домаћина било инхибирањем репликације вируса (Koziel, 1999). Углавном се класификују у двије групе: Тип-1 (про-инфламаторни) цитокини: IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α , IFN- γ . Ови цитокини учествују у стимулацији вирус-специфичних цитотоксичких Т лимфоцита и следственој елиминацији вирусне инфекције; Тип-2 цитокини: IL-4, IL-10 који стимулишу активацију и диференцијацију В лимфоцита. IL32 у хепатоцитима је повезан са упалом и фиброзом јетре код HCV инфекције (Moschen и сар., 2011). Инхибиција NK ћелија од стране Е2 протеина може допринијети слабљењу имунитета и успостављању хроничне инфекције (Tseng и Klimpel, 2002). Интерлеукин-6 (IL-6) је мултифункционални цитокин укључен у естроген-регулисану карциногенезу јетре (Naugler и сар., 2007). Антиген екстрацелуларног HCV core протеина ће бити слабије презентован путем IL-6 (Taske и сар., 2011). Активирање интерферонског пута је добро познат урођени имунски одговор на HCV инфекцију, а недавне студије су разјасниле и његову улогу у анти-туморској имуности (Fuertes и сар, 2013). Нуклеарни фактор капа-

В (NF- κ B) пут је умјешан у развој НСС посебно током напредовања активираних туморских клонова (Pikarsky и сар., 2004), иако постоји нешто и супротних мишљења око његове улоге у хепатокарциногенези (Luedde и Schwabe, 2011). HCV core протеин инхибира NF- κ B посредован имунским одговором (Joo и сар, 2005).

Једном када доспије у хепатоцит HCV користи различите механизме за промјене антигена и избјегава домаћинов имунски одговор, стога стимулишући развој хроничне инфекције у јетри (Kanto и Hayashi, 2006). Хепатитис Це вирус користи неколико стратегија да избјегне имунски одговор домаћина: висока стопа репликације HCV-а може надмашити нормални имунски одговор; студије сугеришу на то да CD8⁺ Т лимфоцити постају 'анергични' и неспособни да произведу IFN током врхунца виремије; HCV 'контранапада' неколико компоненти ћелијског имунског одговора промовисањем CD95 (Fas)-индуковане апоптозе вирус-специфичних цитотоксичних Т лимфоцита (Shapel и сар, 2014).). Иако је HCV осјетљив на интерферон *in vitro*, новије студије су показале да HCV може интерферирати с његовом антивирусном активношћу. HCV може супримирати интрацелуларну продукцију интерферона због инхибиторног учинка појединих неструктурних протеина HCV (NS3-NS4A, NS5A) на секрецију интерферона. Такође је доказан инхибиторни учинак гликопротеина HCV на NK ћелије. Везивањем на површину NK ћелија, гликопротеини инхибирају њихову активацију, секрецију цитокина и цитотоксичну активност. Неки HCV протеини показују имуномодулаторски учинак. Опажено је да протеин капсида (С) дјелује на диференцијацију Т лимфоцита и њихову функцију. Протеин С се веже на рецепторе за комплемент на површини макрофага и Т лимфоцита што смањује продукцију IL-2 те и пролиферацију Т лимфоцита.

Иако је ћелијски имунски одговор домаћина прилично слаб у хроничној фази хепатитиса Це, баланс јетра-инфилтрирајућих, HCV-специфичних CD4⁺ и CD8⁺ Th1, Th17 и NK ћелија одређује развој фиброзе и цирозе јетре (Helen Shapel и сар., 2014).

1.3. HCV ИНФЕКЦИЈА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕСТИ БУБРЕГА

Иако постоје разлике у учесталости и преваленцији у зависности од сржаве, скорашње студије су означиле ESRD као 18.фактор смрти (Lozano и сар., 2012). Раније студије су потврдиле значај дијабетес мелитуса и пушења као главних фактора ризика за развој ESRD-а (Haroun и сар, 2003). ESRD се дефинише као смањена гломеруларна филтрација и албуминурија и дијели се на пет фаза на основу нивоа екскреције

протеина у урину и функције бубрега (Ојо, 2014). Један је од најважнијих узрока кардиоваскуларног обољења, морталитета и смањеног квалитета живота (Hill и сар, 2016). Инфекција са HCV може, али чешће није разлог постојања хроничне болести бибрега (ХББ). Пацијенти са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом углавном имају хронични хепатитис Це (Marinaki и сар., 2015). Хронична HCV инфекција штетно утиче на квалитет живота, смањује животни вијек, доводи до одбацивања трансплантације бубрега, и повећава смртност од MDF пацијената који пате од хроничних болести бубрега (Kalantar-Zadeh и сар, 2007; Ghany и сар, 2009; Li Cavoli и сар., 2012). Велики број других важних аспеката HCV инфекције код ESRD пацијената је препознато, укључујући и лажно-негативне серолошке тестове и одсуство биохемијске дисфункције упркос виремији. Међутим, и поред тога, може доћи до прогресивног обољења јетре, а то је посебно забрињавајуће за пацијента који је прималац бубрежног трансплантата (Fabrizi и сар., 2002). Иницијална виремична фаза је повезана са повећањем у активности аланин трансминазе (ALT) (до 74 IU/L) од средње основне од 25 IU/L и претходи му анти- HCV сероконверзија; њу прате истрајна виремија, нормализовање ALT активности и истрајна анти- HCV повезаност. Стога, једини показатељ акутне HCV инфекције код HD пацијената може бити благи и иначе необјашњив пораст у нивоу ALT-е (Fabrizi и сар, 1998).

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

Пацијенти са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом, који су на хемодијализи, представљају ризичну групу за HCV инфекцију, због инвазивних медицинских процедура којима су изложени. Вишеструки фактори ризика су повезани са преносом HCV код пацијената на хемодијализи (Alavian, 2009). Иако је данас ризик од нозокомијалне HCV трансмисије сведен на минимум због употребе одвојених дијализних машина за пацијенте који имају HCV инфекцију и ХД пацијенте и даље постоји могућност стицања ове инфекције на одјељењима за хемодијализу (Agarwal и сар., 2009; De Jesus и сар., 2013). Фактори ризика за настанак HCV инфекције код пацијената на хемодијализи укључују број трансфузија крви, трајање хемодијализе, начин дијализирања, преваленција HCV инфекције у дијализној јединици, претходна трансплантација органа, кориштење интравенских дрога, мушки пол, старија животна доб и болнички пренос HCV у хемодијализној јединици који може настати због грешака у стандардној пракси контроле инфекције, физичке близине зараженог

пацијента, cross-инфекције путем апарата за дијализу, прекинут интегритет мембране дијализатора или обрада дијализатора (Natov и Pereira, 2005). Дијелење лијекова (хепарин) и неадекватно прање руку особља прије, и мање често, након активности укључује ризик од контаминације препознати су као важни узроци ширења HCV-а у ХД јединицама (Bukh и сар., 1993). Тако су Окуда и сар. У свом раду описали значајну улогу медицинског особља у трансмисији HCV инфекције у болничким условима. Они описују да немијењање рукавица приликом извлачења игле за приступ дијализи између пацијената на ХД са HCV инфекцијом и оних без ње представља висок ризик за настанак нозокомијалне инфекције на одјељењима за хемодијализу. Након едуковања чланова особља и примјене љепљиве подлоге у вријеме извлачења игала, ниједан додатни случај акутног HCV-а није откривен у периоду од више од годину дана код 730 пацијената на хроничној ХД (Okuda и сар., 1995 Fabrizi и сар., 2002; Yue-Cheng и сар., 2014). Филогенетска анализа HCV изолата имплицира да многе HCV инфекције током хемодијализе су сигурно резултат болничких преноса пацијент-пацијент (Rahnavardi и сар., 2008; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hepatitis C virus transmission at an outpatient hemodialysis unit--New York, 2009). Ризик од инфекције обично расте са преваленцијом HCV, а број и дужина излочености хемодијализи у одговарајућим ХД јединицама (Sypsa и сар., 2005; El-Amin и сар., 2007; Kalantar-Zadeh и сар., 2007; da Silva и сар., 2013). Према литературним подацима, преваленција HCV инфекције код хемодијализираних пацијената је виша него у општој популацији и износи 3% у земљама западне Европе, до чак 20% у земљама јужне Европе (Thiel и сар., 2005; Rinonse и сар., 2013). У протекле двије деценије, осјетљивост и специфичност лабораторијских тестова за детекцију HCV је значајно побољшана, што је довело до још строжијег скрининга давалаца крви и значајног пада нових HCV инфекција (Rahnavardi, 2008; Li Cavoli и сар., 2012; Moini и сар., 2013). С друге стране, доступност еритропоетина је смањила потребу за трансфузијом крви код пацијената на хемодијализи. У складу са тим, ризик од HCV инфекције путем трансфузије крви код ових пацијената је значајно смањена у многим земљама (Rahnavardi М, 2008; Yu и сар., 2014). Важно је напоменути да је HCV инфекција независни предиктор морталитета код болесника на хемодијализи (Fabrizi и Martin, 2010).

1.4. ИМУНОСТ ПАЦИЈЕНАТА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕСТИ БУБРЕГА

Током последњих 20 година, многе студије су се фокусирали на дисфункцију имунског система код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (Vacher-Coronat, H, 2008). Показано је да су и целуларна и хуморална имуност измјењене код ових пацијената (Vacher-Coronat, H, 2008; Knerl K, 2005).

ESRD прати инфламација и погоршана функција имунског система (Бетјес МГ, 2013). Имуносупресија је једна од многих последица хроничне бубрежне инсуфицијенције (Peraldi MN, 2009). Функција Fc- γ рецептора на моноцит/макрофагима је смањена код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом, и ова измјена функције макрофага доприноси генералној имуносупресији (Ruiz P, 1990). Т лимфоците карактерише смањена способност пролиферације индуковане митогеном (Chatenoud L, 1986; Sester U, 2000). Смањена експресија активационог рецептора NKG2D на NK ћелијама и повећана синтеза његовог лиганда MICA детектовани су код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и објашњавају смањену активност NK ћелија као дио системске имунодефицијенције регистроване код ових пацијената (Peraldi MN, 2009). Ове абнормалности не могу се кориговати хемодијализом. Измјењена стечена имуност (ослабљен имунски одговор на патогене и на вакцинацију) карактеристична је за пацијенте са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (Eleftheriadis T, 2007). Неки од ових дефеката су вјероватно последица дејства такозваних „уремичних токсина“ (Ringoir S. 1997; Vanholder R, 1995), који обухватају велики број молекула као што су β 2-микроглобулин и реактивни кисеонични радикали (енгл. Reactive Oxygen Species- ROS) (Marie-Noëlle Peraldi, 2009).

Хиперцитокинемија је типична карактеристика уремије, вјероватно због акумулације про-инфламаторних цитокина као последица смањене бубрежне елиминације и/или повећане индукције уремичких токсина, волумног оптерећења, оксидативни стрес, коморбидитети (Kimmel и сар., 1998; Stenvinkel и сар., 2005). Уремија је повезана са имуносупресијом због утицаја урмијског миљеа и разних поремећаја који се дешавају на имунокомпетентним ћелијама. Све три класе рецептора на ћелијама урођене имуности су захваћене поремећајима код ових пацијената. Значајно је повећан ниво маноза-везујућег лектина код ESRD пацијената (Satomura и сар., 2002). Са друге стране, доказано је, код инфицираних ХД пацијената, ниски а не висок ниво маноза-

везујућег лектина је повезан са повећаном смртношћу (Satomura и сар., 2006). Истраживања су показала да је експресија два главна макрофагна (ендоцитозна) рецептора за препознавање, SR-A и CD36, повећана код ESRD пацијената (Ando и сар., 1996; Ando и сар., 1997; Chmielewski и сар., 2005). Ово би могло бити посљедица хроничне стимулације макрофагних рецептора изазвани упалним процесима и/или оксидативним стресом (Chmielewski и сар., 2005, Kato и сар., 2007). ESRD доводи до сметњи различитих цитокина и на генерализовану хипецитокинемију укључујући анти-инфламаторне цитокине, као што су IL-10 (Stenvinkel и сар., 2005), као и про-инфламаторне цитокине као што су TNF (Stenvinkel и сар., 2005) и IL-6 (Stenvinkel и сар., 2002; Pessits-Filho и сар., 2003). Ослабљена бубрежна функција доводи до смањења филтрације и генералног повећања цитокина, што се сматра главним кривцима за повећане клонцентрације цитокина у циркулацији ESRD пацијената (Stenvinkel и сар., 2005), а тзв. интерлеукин хипотеза 1983 године, претпоставља да је повећање су IL-1 посредована хипотензивним епизодама у ХД пацијената (Henderson и сар., 1983).

Th лимфоцити продукујући различите цитокине, имају разнолик утицај на имунски одговор. Th1 лимфоцити активирају макрофаге и неутрофиле, док Th2 лимфоцити су укључени у промовисање урођене имуности. Равнотежа између Th1 и Th2 се сматра важном у напредовању атеросклеротских лезија код ESRD пацијената (Stenvinkel и сар., 2005). Код пацијената на перитоонеалној дијализи, сазријевање подгрупа Th ћелија је умањена у односу на контроле, али и у односу на хемодијализне пацијенте.

Измјењена функција Т лимфоцита, која се налази код ESRD пацијената, може приписати оштећеној функцији рецептора (Eleftheriadis и сар., 2007), јер активација Т-ћелија овиси у великој мјери од TLR-а. ESRD, а посебно ХД, повезана је са лимфопенијом В-лимфоцита. Претпоставља се да је један од главних узорака овог поремећаја повећана склоност смрти Б лимфоцита апоптозом (Fernandez-Fresnedo., 2000). Међутим, доказано је да су нивои Ig, серумски IgG, IgM и IgA, нормални код пацијената на дијализи (Eleftheriadis и сар., 2007).

Пацијенти на хемодијализи често „пате“ од поновљених бактеријских инфекција, имају слаб одговор на хепатитис Б вакцину и чешће развијају туморе у односу на општу популацију (Descamps-Latcha, В1993).

1.5. ИМУНСКИ ОДГОВОР НА HCV КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ТЕРМИНАЛНОМ БОЛЕСТИ БУБРЕГА

Иако фактори који „штите“ уремичне пацијенте од имунски посредованог оштећења јетре нису добро познати, постоје неке занимљиве теорије о овом парадоксу. Чини се да је овај дефектни имунски одговор мултифакторијалан. Иmunска дефицијенција се осликава смањеном функцијом фагоцита и антиген-презентујућих ћелија, као и ослабљеним хуморалним и ћелијским имунским одговором услед потрошње Б лимфоцита, као и наивних и меморијских CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита (Vaziri ND, 2012). Описан је дефект у функцији антиген презентујућих ћелија, у експресији костимулатора В7-2 (CD86), што води смањеној пролиферацији и активацији Т лимфоцита (Girndt M, 2001). Уочене су алтерације субпопулације Б-лимфоцита са неравнотежом између незрелих и меморијских Б-лимфоцита, као и смањење експресије сигнализације преко BAFF рецептора и доводи до смањења диференцијације и преживљавања Б-лимфоцита (Kim KW, 2012; Pahl MV, 2010).

Galektin 3 је мултифункционални β-галактозид-везујући лектин исказан на различитим ћелијама попут епителних ћелија, ендотелних ћелија, леукоцита, итд (Breuilh и сар., 2007). Различита позиција Galektina 3, у језгру, цитоплазми или на површини ћелије, омогућава његову интеракцију са екстраћелијским и интраћелијским лигандима, стога објашњавајући мултифункционалну улогу овог молекула у биологији ћелије (Ahmad и сар., 2004; Радосављевић и сар., 2011). Galektin 3 учествује у неколико биолошких процеса, укључујући пролиферацију ћелија, диференцијацију и апоптозу, а такође игра битну улогу у регулисању имунског одговора домаћина код инфламације, инфекције и тумора (Breuilh и сар., 2007; Радосављевић и сар., 2011; Viguiер и сар., 2014). Раније студије откриле су значај Gal-3 као потенцијалног маркера за различита обољења јетре. Показано је да је системски ниво Gal-3 знатно смањен код пацијената са хроничном HCV инфекцијом (Ulu и сар., 2015). Такође је показано да постоји снажна корелација између повишеног системског нивоа Galektina 3 и реналне дисфункције и високог ризика за развој хроничног обољења бубрега (Desmedt и сар., 2016). Па ипак, улога Galektin 3 у биологији ESRD пацијената заражених HС вирусом још увијек је нејасна.

Овај статус „редукованог имунонадзора“, а не очите „имуносупресије“ има анти-инфламаторни, заштитни ефекат на пацијенте на дијализи са хроничном HCV

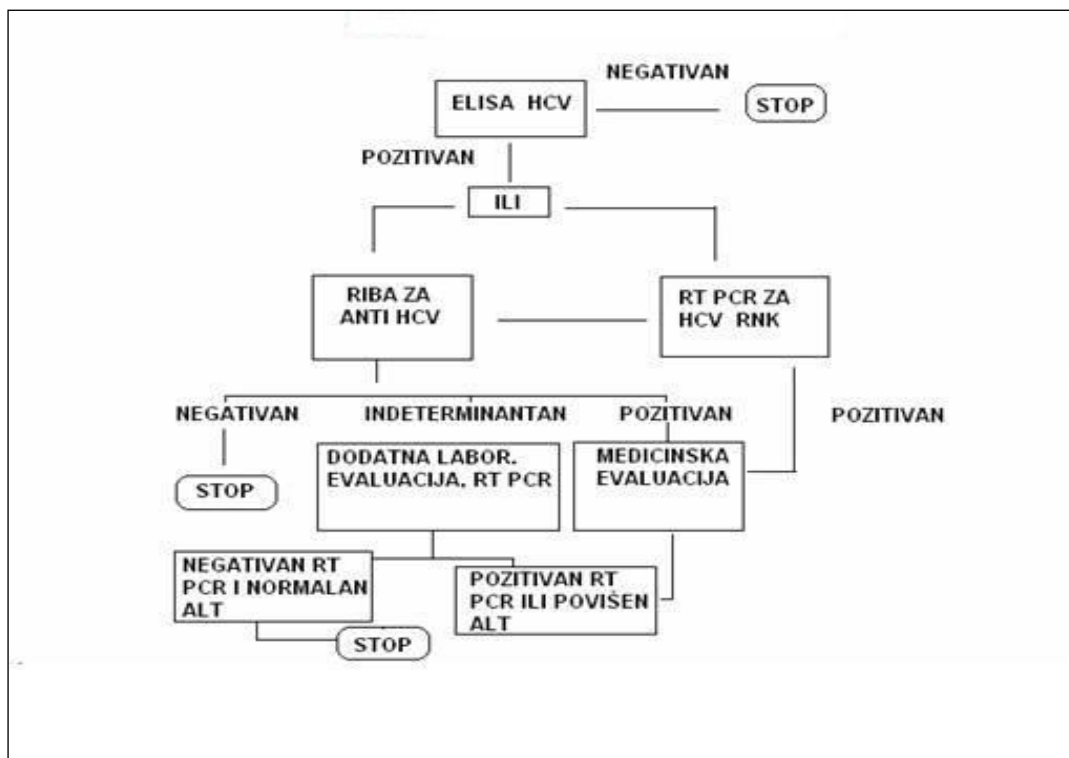
инфекцијом. Треба узети у обзир ниску виремију код ових пацијената као фактор слабог имунског одговора.

1.1.6. Алгоритми у дијагностици HCV инфекције

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

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

Шема 1. Алгоритам у дијагностици HCV инфекције



1.1.7. Терапија HCV инфекције и мониторинг терапијског успјеха

Лијечење акутног и хроничног хепатитиса Це укључује супституциону и симптоматску терапију. Специфична терапија у првом реду представља интерферонска терапија. Рибавирин у комбинацији са Интерфероном даје најбоље резултате у лијечењу хроничног вирусног Це хепатитиса.

Златни стандард у лијечењу хроничне HCV инфекције је пегиловани интерферон алфа 2а 180 μ г недељно и рибавирин 800-1200 мг на дан подијељено у 2 до 3 дозе у трајању 24 до 48 недеља зависно од генотипа (Hadziyannis, 2000; Deutsch и сар., 2008). IFN је специфичан за ћелију која га је произвела а не за вирус који је индуковао његову синтезу тако да IFN може да штити ћелије исте биолошке врсте од дејства било ког вируса. Више од 50 молекула IFN по ћелији успоставља антивирусно стање (Делић и сар., 1998; Јовановић и Марковић., 2008).

Имунорегулаторна активност се остварује на неколико начина:

- Активирањем макрофага
- Повећањем цитотоксичне активности Т Ly
- Појачањем активности НК ћелија
- Промјенама у мембранама ћелија имунског система
- Повећањем нивоа МНС I (major histocompatibility complex) и МНС II класе антигена
- Повећањем броја рецептора за Fc фрагмент имуноглобулина
- Улогом у регулацији антигенске презентације

Рибавирин је синтетски аналог гуанозина и активан је према RNK вирусима. Рибавирин је синтетски триазол који има антивирусни ефекат као трифосфат. Не уграђује се у структуру RNK или DNK током њихове синтезе. Има сложено и вишеструко дјеловање. Омета транскрипцију и постраскрипциону обраду вирусне RNK као и функцију саме RNK полимеразе (Делић и сар., 1998; Јовановић и Марковић., 2008).

Фактори који утичу на ефикасност терапије су генотип вируса, количина вируса у крви, раса, старост, мушки пол, BMI већи од 30 кг/м², злоупотреба алкохола, коинфекција са HBV, екстрахепатичне манифестације, стеатоза, одмакла цироза > F 2,

доза, придржавање и подношење терапије, трајање терапије. Генотип је најважнији предиктор терапијског одговора (Hadziyannis, 2000; Божић и сар., 2003; Теоћ и сар., 2010). Велики број генотипова и субгенотипова као и варијабилност генома, заједно са slabим разумијевањем патофизиологије хроничне HCV инфекције објашњава садашњу немогућност развијања ефикасне профилактичке вакцине (Honegger и сар., 2014).

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

Стадиј СКС	IFN ^a	Рбавирин	Нуспојаве
1 и 2	PG-IFN alfa-2a: 180µg sc. 1x седмично PG-IFN alfa-2b: 1,5 µg/kg sc. 1x седмично	800-1200 mg на дан у двије подјелене дозе	IFN: главобоља, грипа, депресија Рибавирин: погоршана анемија због хемоллизе
3 и 4	PG-IFN alfa-2a: 135 µg sc. 1x седмично PG-IFN alfa-2b: 1 µg/kg sc. 1x седмично	Стадиј 3: 400-800 mg на дан у двијеподијелене дозе Није препоручено код eGFR<50 ml/min/ 1,73 m ²	IFN: исто као изнад Рибавирин може узроковати хемолитичку анемију и његова употреба мора бити подржана са повећањем еритропоетина по потреби
5	PG-IFN alfa-2a: 135µg sc. 1x седмично PG-IFN alfa-2b: 1 µg/kg sc. 1x седмично	Није препоручено	IFN: исто као горе
5D	Alfa-2a IFN: 3mU sc. 3x седмично Alfa-2b IFN: 3 mU sc. 3x седмично	Није препоручено	IFN: исто као горе
5Т 1-5	Није препоручено изузев код третирања холестетичког хепатитиса или васкулитиса опасног по живот	Није препоручено	Коришћење IFN је повезано са одбацивањем и затајењем алографта

Табела 1. eGFR- Калкулисана гломеруларна филтрација; IFN-интерферон; sc. субкутано; а) Пацијенти са генотипом 1 и 4 HCV требају примати терапију 48 седмица, ако се „позитивни терапијски одговор“ постигне за 12 седмица (цијењено као >2log смањења титра вируса-мјерено као NAT); Генотипови 2 и 3 третирају се 24 седмице; б) Видјети у тексту и одговарајућој табели дозе Рибавирина прилагођене минутној

гломеруларној филтрацији. Пацијенти с генотипом HCV 2 и 3 треба да примају 800 mg Рибавирин дневно код стадија 1 и 2 ХБИ. Пацијенти с генотипом 1 и 4 и стадијем 1 и 2 ХБИ треба да примају 1000-1200 mg Рибавирин дневно.

Ефекат препоручених терапијских протокола (PG-INF i ribavirin) је доста ограничен, а у контролисаним клиничким студијама креће се до око 60% у општој популацији, док су подаци о учинку ове терапије код ХББ и дијализних пацијената лимитиране употребљивости. Као друго, ова терапија је врло скупа, па је „cost-benefit“ разматран увијек за сваки појединачни случај. Потребно је узети у обзир опште стање пацијента, степен инсуфицијенције бубрежне функције, патохистолошко и функционално стање јетре (које се према садашњој методологији може доста успјешно квантификовати, тј. присуство знакова активног хепатитиса, степен фиброзе ткива јетре, INR и истало). Одлука о томе да ли третирати HCV инфекцију код ХББ треба да се базира на тренутном стању хистологије јетре, животној доби пацијента, коморбидитетима, те у коначници и подношењу терапије. Према ревидираним смјерницама „National Institut of Health“ -NIH, USA) из 2002 године, које су оригинално урађене 1997. године стоји да биопсија јетре није неопходна за почетак третмана.

Прецизније, биопсија је неопходна ако се PCR реакцијом утврди да се ради о генотиповима 1 и 4 (од укупно 7 познатих генотипова HCV). Ако се ради о генотиповима 2 и 3, код којих је „позитивни терапијски одговор“, биопсија није неопходна. Пацијенти са трансплантираним бубрегом треба да буду третирани антивирусном терапијом, у чему се слажу сви објављени водичи (табела 1).

У последњих неколико година дошло је до наглог развоја нових доктрина у терапији HCV инфекције, који се прије свега односе на превазилажење употребе пегилованог α IFN из HCV терапијског протокола у комбинацији са рибавирином или тзв. Трипл терапије са још два антивиротика боцепревиrom и телепревиrom због брзог развоја резистенције на лијек. Потпуно познавање животног циклуса HCV а посебно кристалне структуре релевантних вирусних протеина је омогућило развој нових директно дјелујућих анти HCV лијекова (engl. direct acting antivirals DDA), чији је главни циљ обезбеђивање дуготрајног стабилног вирусолошког одговора. Данас постоје три групе ових лијекова. Прва група је усмјерена против вирусне протеазе NS3/4A (инхибитори протеазе; називи лијекова се завршавају на –преви), други против вирусне RNK-зависне RNK-полимеразе NS5B (полимеразни инхибитори, називи им се завршавају на –бовир) и трећа група DDA усмјерени су против вирусних протеина који учествује у формирању репликационог комплекса NS5A (NS5A инхибитори,

и завршавају се суфиксом –асвир) (Zopf и сар., 2016). Sofosbuvir (SOF) је инхибитор NS5B-полимеразе. Као аналог нуклеотида узрокује престанак репликације ланца. У SOF има пан-генотипске ефикасности и висока отпорност баријера. Узима се једном дневно са добром подношљивошћу. Нема унакрсних реакција са другим супатанцама (Lawitz и сар., 2013). Због елиминације SOF-а преко бубрега он се може дати само пацијентима са гломеруларном филтрацијом изнад 30 мл/мин по 1.73 м². Болесници са тешким оштећењем бубрега (гломеруларне филтрације <30 мл/мин по 1.73 м²) или хроничним обољењем бубрега који су на дијализи стога захтјевају други антивирусни режим (Pockros и сар., 2015). Симепревивр има клинички релевантне антивирусне ефекте против генотипова 4 и 6. Слично боцепревиру узима се само једном дневно. Нежељени ефекти се састоје углавном од лезија на кожи са или без свраба, мучнина и диспнеја. Симепревивр је неуспјешан у лијечењу инфицираних генотипом 1а ((Lenz и сар., 2015). Daclatasvir (DCV) је NS5A-инхибитор који има високу антивирусну активност против генотипова 1-4 *in vivo* и *in vitro* и против генотипова 5 и 6. (Karino и сар., 2013). Ledipasvir (LDV) представља још један NS5A-инхибитор са антивирусном активношћу посебно против генотипа 1 и дјелимично против других генотипова, као што су 4, 5 и 6. LDV је доступан само у комбинацији Fix дозу са SOF (Afdhal и сар., 2014).

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

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

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

Утврдити учинак терминалне бубрежне инсуфицијенције на:

1. клиничко-биохемијске параметре функције јетре (трансаминазе, гама GT, LDH);
2. виремију („viral load“);
3. концентрације цитокина (ST2, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, IL-33, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , Galektin-3) у серуму;

код пацијената са хепатитис Це вирусном инфекцијом

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

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

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

3.1. ИСПИТИВАНИ УЗОРАК

Рађена је компаративна-експериментална студија током које су се упоређивали тестирани параметри у експерименталној и контролној групи испитаника. У студији је учествовало 140 испитаника, старосне доби од 18-70 год. Сви испитаници укључени у студију подјељени су у четири групе. Прву и другу групу су чинили пацијенти са терминалном бубрежном болести изабрани унутар 5 одвојених ХД. Свим пацијентима у тих 5 ХД јединица у току редовне дијагностичке процедуре урађено је серолошко тестирање на присуство Anti-HCV антителијела, на основу чега су ти пацијенти и подијељени у двије групе. Прву групу чинили су пацијенти код којих смо доказали присуство Anti-HCV антителијела и који су дали свој пристанак да даље учествују у студији. Другу групу чинили су пацијенти којима није доказано присуство Anti-HCV антителијела а који су дали свој пристанак за учешће у студији. Тако да је у коначном истраживању прву групу испитаника чинило 40 пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (на хемодијализи) која је утврђена биохемијским параметрима који су испитивани и хепатитис Це вирусном инфекцијом која је утврђена серолошким маркерима и касније и квалитативним RT-PCR-ом. Другу групу чинило је 20 пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (на хемодијализи), која је утврђена биохемијским параметрима. Трећу групу испитаника чинило је 20 пацијената са хепатитис Це вирусном инфекцијом, утврђеном серолошким маркерима и касније квалитативним RT-PCR-ом а који нису били на дијализи, тј. немају терминалну бубрежну болест, што су и показали биохемијски параметри који су испитивани. Четврта група је контролна, коју чине добровољни даваоци крви Универзитетске болнице у Фочи (n=20). Испитаници из свих испитиваних група су потписали образац за сагласност учешћа у студији.

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

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

3.2. ИСТРАЖИВАЧКИ ПОСТУПАК

Протокол студије подразумева да су у студију укључени сви болесници код којих је HCV инфекција доказана серолошки, налазом анти HCV антитела. Све микробиолошке (серолошке, молекулске) и биохемијске анализе рађене су у Центру за лабораторијску дијагностику одејек за микробиологију и биохемију Универзитетске болнице у Фочи (Република Српска), а имунолошке анализе су урађене у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Свим испитаницима који су на дијализи крв је узимана прије дијализног поступка, из разлога што се процесом дијализе вредности свих до сада испитиваних параметара значајно мијењају и има се другачија слика у односу на стварно стање код ових пацијената, а установљено је да хепарин који се користи током дијализе може ометати и саму PCR технику. Осим тога, хемодијализни поступак смањује HCV-RNK нивое адсорпцијом HCV-RNK на унутрашње површине дијализатора и уништава вирусне честице хидрауличким притиском (Okuda и сар., 1996; Fabriz и сар., 2002). Из тог разлога су овакви пацијенти, патогенеза њихових обољења (са посебним освртом на хепатитис Це вирусну инфекцију), као и клиничка слика и даље контроверза.

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

-Узорци

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

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

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

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

3.2.1. Лабораторијска дијагностика HCV инфекције

Надзор над HCV инфекцијом подразумијева двије стратегије: серолошку, којом се у свакодневном раду најчешће доказује HCV инфекција детекцијом специфичних HCV антитијела, док су за потврду инфекције и утврђивање активности вируса, од посебног значаја молекулски тестови. Дијагноза пацијената заражених хепатитис Це вирусом врши се помоћу двије категорије вирусолошких тестова: индиректни тестови и директни тестови (Chavaliez и сар., 2011). Индиректни серолошки тестови, којима се доказује серолошки специфичан имунски одговор, су најчешће ензим-имунотестови треће генерације који откривају антитијела на HCV. Антигени коришћени у тестовима да открију антитијела су из структурних и не-структурних дијелова HCV-а: capsid, protein, cofactors, polymerase, itd (Penin и сар., 2004). Директни вирусолошки тестови обухватају тестове којима се доказују вирусни антигени и вирусна нуклеинска киселина. Савремена HCV дијагностика базира се на примјени директних тј. молекуларно биолошких метода као што су квалитативни PCR тестови за доказивање HCV RNK генома, „real time“ PCR за квантификовање HCV генома тј. утврђивање

виремије-„viral load“ као и методе за генотипизацију HCV (Thiel и сар., 2005; Deutsch и сар., 2008).

Као први тестови раде се серолошки тестови којима се детектују антителијела на хепатитис Це вирус. Уобичајено је да се HCV инфекција дијагностикује налазом HCV антителијела (тестови) најчешће уз обавезну потврду Western blot тестом, RIBA тестом или RT-PCRтестом.

3.2.2. Одређивање биохемијских параметара

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

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

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

За одрђивање **концентрације урее** у серуму коришћен је ензимски, спектофотометријски кинетички метод. Каталитичким дејством уреазе, уреа се хидролизује до амонијака и угљеник (IV) –оксида. Настали амонијак, у присуству глутамат дехидрогеназе (GLDH), са α -кетоглутаратом и NADH гради глутамат. Брзина оксидације NADH директно зависи од концентрације урее. Референтна вредности: серум 3.0- 7.8 mmol/L .

Концентрација укупног и директног билирубина у серуму одређена је по методи Malloy-Evelyn-а. Билирубин у овом тесту реагује са диазотовом сулфанилном

коселином (диазобензосулфонска киселина која настаје реакцијом натријум нитрита и сулфанилне киселине у присуству HCL) при чему настаје розе-љубичасти азопигмент. Диазобензосулфонска киселина заправо раскида везу између II и III пириоловог прстена билирубина па настају два дипирола који затим реагују са диазобензосулфонском киселином стварајући азопигмент. Коњуговани (директни) билирубин реагује одмах, док некоњуговани (индиректни) реагује тек након издвајања из везе са албумином. Због тога се у реакцију смјешу, у којој се одређује концентрација цјелокупног билирубина додаје концентровани метил алкохол који таложи бјеланчевине и истовремено раскида везу некоњугованог билирубина и албумина. Концентрација некоњугованог билирубина у серуму добија се тако што се од вредности укупног одузме вриједност коњугованог билирубина. Референтне вредности: директни билирубин 0-3.4 $\mu\text{mol/L}$; укупни билирубин 3.4-17.1 $\mu\text{mol/L}$.

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

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

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

За одређивање **активности гама-глутамил-трансферазе (GGT)** у серуму коришћен је кинетички, колориметријски метод. Ензим L- γ -глутамилтрансфераза GGT

катализује преношење γ -глутамил групе, дозор супстрата (L- γ -глутамил-3-карбокси-нитроанилид – GRUPA) на глицилглицин акцептор, уз ослобађање 5-амино-2-нитробензоата у алкалној средини. Континуирани пораст апсорбеније на 405 нм директно је пропорционалан активности GGT. Референтне вредности: мушкарци 11-50 U/L 37°; жене 7-32 U/L 37°.

3.2.3. Одређивање серумских концентрација цитокина

Концентрације IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-33, IFN- γ и TNF- α у серуму испитивни су одговарајућим комерцијалним ELISA тестом специфичним за хумане цитокине (DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA). За анализу IL-1, IL-6, IL-12 и IL-33 коришћен је (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA), а за TNF- α , IL-10 и IFN- γ коришћен је (OptEIA Set, BD Biosciences, San Diego, CA. USA) тест.

Стандарди су прије употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 250 pg/ml за IL-1; 600 pg/ml за IL-6; 2000 pg/ml за IL-10 и IL-12; 1500 за IL-33 и 1000pg/ml за TNF- α , IFN- γ а од оваквих штокова направљена су серијска растућа разблажења у 7 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача. 100 μ l радне концентрације везујућег антителијела (енгл. Capture Antibody) сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. microtiter plate- MTP) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су потом прелијеplене адхезивном фолијом (енгл. ELISA Plate Sealers) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчиће испрани пуфером за испирање (енгл. Wash Buffer) у аутоматској машини за испирање MTP-а. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (BlockBuffer, 1%BSA у PBS-у) финалног волумена 300 μ l и MTP су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди насути су у MTP, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања MTP, у све бунарчиће је додато по 100 μ l радне концентрације детекционог антителијела (енгл. DetectionAntibody), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури.

Плоче су потом испране, а у бунарчиће је сипано 100 μ l радне концентрације Streptavidin-HRP (енгл. Streptavidin horseradish peroxidase). Инкубација на собној температури и бе здиректног излагања свјетлости прекинута је након 20 минута, испирањем MTP-а. У бунарчиће је сипано 100 μ l раствора супстрата (енгл. SubstrateSolution:

ColorreagentA+ColorreagentB,1:1). Двадесет минута касније, додати је 50µl стоп раствора (енгл. Stop Solution: 2N H₂SO₄) и одмах потом мјерена оптичка густина у сваком бунарчићу, помоћу Microplate reader-а (Zenyth, Anthos, UK) подешеног на 450nm.

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

3.2.4. Доказивање анти HCV антителијела

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

Прије почетка рада сви узорци су се одмрзавали на собној температури до потпуног отапања, а потом прочишћени центрифугирањем. Бочице са калибраторима, контролама и узорци серума су промјешани користећи мјешач типа вортекс (за серуме одвојене од пелета). Прије тестирања узорака серума од пацијента, у први и други тест „HCV“ стрип (комерцијални стрип чији централни дио садржи различите реагенсе неопходне за рад теста) пипетирано је по 100 µl калибратора означеног као S1 који се тестира у дупликату, у трећи тест „HCV“ стрип пипетирано је 100 µl C1 позитивне контроле, а у четврти тест „HCV“ стрип 100 µl C2 негативне контроле која нам служи за провјеру да перформанса реагенаса није промјењена. Потом у предвиђено удубљење (бунарчић) на тест „HCV“ стрипу пипетирано је по100 µl серума сваког пацијента појединачно и убачено у апарат заједно са претходно припремљеним контролама и калибраторима као и њима одговарајућим „HCV“ SPR-овима (фишечичићи обложени

антигенима који представљају HCV језгро, NS3 и NS4 протеине). Према упутству произвођача пустан је у рад апарат који аутоматски сам изводи све кораке теста. Током првог корака узорак се разређује и заједно са реакционим раствором циклично улази и излази из SPR-а. Anti-HCV антитијела присутна у узорку везују се за антигене који представљају HCV језгро. Невезане компоненте узорка се испирају. Током наредног корака, мишија моноклонска анти-хуман IgG антијела у Fab облику, коњугована за рекомбинантну алкалну фосфатазу се циклично уводе и изводе из SPR-а и повезаће се за хумани Ig повезан молекулима у чврстој фази. Даљи кораци испирања уклониће неvezане компоненте. Када се заврши тестирање, компјутер аутоматски анализира резултате. Флуоресценција се мјери два пута у епрувети за читање реагенс стрипа за сваки тестирани узорак. Прво читање је читање позадине кивете супстрата прије него што се SPR унесе у супстрат. Друго читање се ради после инкубирања супстрата са ензимом преосталим у унутрашњости SPR-а. Ензим коњугата катализира хидролизу овог супстрата у флуоресцентни производ (4 Methyl-umbelliferon), чија се флуоресценција мјери на 450 нм. Интензитет флуоресценције је пропорционалан концентрацији антигена присутног у узорку. На крају теста, резултате аутоматски рачуна апарат на основу „S1“ сачуваног у меморији. RFV (релативна флуоресцентна вредност) је рачуната одузимањем читања позадине од коначног резултата. За интерпретацију смо користили арбитрарне јединице = тест вредност (TV) уз граничну вредност 1,00. TV представља количник RFV узорка / RFV „S1“ и пропорционална је количини антитијела у узорку, која се прате. Дијагностичка специфичност VIDAS Anti-HCV теста је око 99,50% а дијагностичка осјетљивост теста око 99,77%.

3.2.5. Квалитативни RT PCR

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

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

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

Премјештени су припремљени узорци и контроле у простор за умножавање. Умножавање је неопходно отпочети што је прије могуће, али не касније од 45 минута

након што су обрађени узорци и контроле додане у епрувете тзв А-прстенове који садрже *Master Mix*, а како би се осигурало оптимално извођење теста.

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

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

3.2.6. Квантитативни “Real time” RT-PCR

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

Табела 2: Процедура произвођача интерпретира тест према следећем:

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

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

3.2.7. Генотипизација HCV

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

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

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

3.3. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

A. Варијабле кој се мјере

Анализирані су следећи параметри:

- 1) лабораторијска анализа: вриједности урее, креатинина, број еритроцита, број леукоцита, гама GT, LDH, AST, ALT, вредност билирубина;
- 2) серумске концентрације анти HCV антитела;
- 3) виремија тј. број копија HCV RНК/ml, генотип HCV;
- 4) серумске концентрације IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-33, IFN-γ и TNF-α.

Д1. Категоризација варијабли

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

Независне варијабле:

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

Зависне варијабле:

- **Примарне зависне исходишне варијабле:** виремија тј. број копија HCV RNK/ml, генотип HCV, серумске концентрације анти HCV антитела.
- **Секундарне зависне исходишне варијабле:** лабораторијске анализе (број леукоцита, гама GT, LDH, AST, ALT, вриједност билирубина), серумске концентрације IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-33, IFN- γ и TNF- α .

Збуњујуће варијабле:

- Старост болесника
- Терапија болесника

В. Снага студије и величина узорка

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

С. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА

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

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

4. РЕЗУЛТАТИ

У студију је било укључено 100 пацијената. Они су били подељени у четири групе: 40 пацијената са крајњим стадијумом болести бубрега и хепатитис Це вирусне инфекције (HCV⁺иХБИ), 20 хепатитис Це позитивних пацијената (HCV⁺), 20 пацијената са крајњим стадијумом болести бубрега (ХБИ) и 20 здравих особа контролне групе (ЗК). Статистички значај је тестиран као независни узорак Studentovim t-testom или Mann-Whitney Rank Sum testom, где је то могуће.

Клиничке и патолошке карактеристике ових пацијената представљене су у Табели 1. Није било битније разлике у полној дистрибуцији између дефинисаних група пацијената. Пацијенти су били сличне старосне доби; средња вриједност 55.2 ± 9.32 код HCV⁺и ХБИ групе пацијената наспрем 53.8 ± 10.38 код HCV⁺ групе пацијената наспрем 55.6 ± 12.72 код ХБИ групе пацијената наспрем 52.9 ± 7.49 код здраве контролне групе пацијената. Битна разлика уочена је у трајању дијализе између ESRD HCV⁺ пацијената (13.8 ± 8) и ХБИ пацијената (3.85 ± 1.53) ($p=0.00$). Није било статистички битне разлике у трајању HCV инфекције између HCV⁺иХБИ групе пацијената (7.02 ± 4.28) и HCV⁺ пацијената (8.25 ± 4.68).

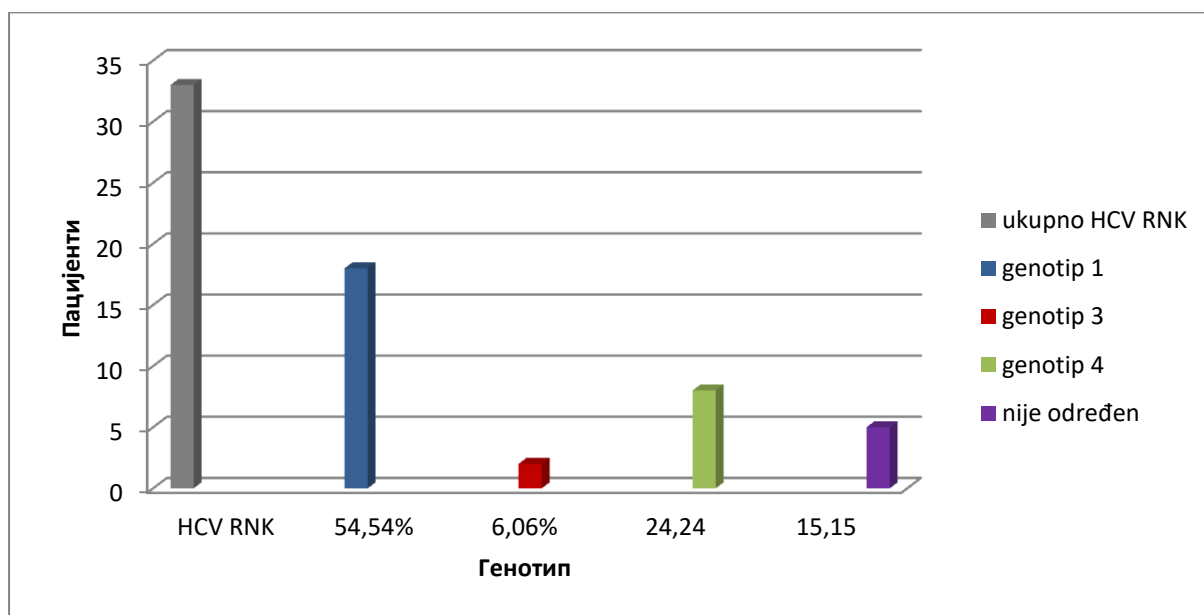
Табела 1: Демографски подаци и клиничке мјере

Параметар	HCV ⁺ иХБИ	HCV ⁺	ХБИ	ЗК
Пол:				
Мушкарци	18	9	13	12
Жене	22	11	7	8
Старост (године \pm SE)	$55,2 \pm 1,47$	$53,8 \pm 2,32$	$55,6 \pm 2,84$	$52,9 \pm 1,67$
Дијализа (година \pm SE)	$13,8 \pm 1,26$ *	/	3.85 ± 0.34 *	/
HCV-статус (година \pm SE)	$7,02 \pm 0,67$	$8,25 \pm 1,04$	/	/

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

Најчешћи узроци бубрежне инсуфицијенције код испитиваних пацијената били су хронични гломерулонефритис, шећерна болест, полицистични бубрези реше друге болести као што су хипертензија, амилоидоза и ренална дисфункција. 60% пацијената је касније у току болести као коморбидитете имала осим хепатитис Ц вирусне инфекције и анемију, бубрежну остеодистрофију, *cor hipertonikum*, а њих 17% је имало и хепатитис Бе инфекцију.

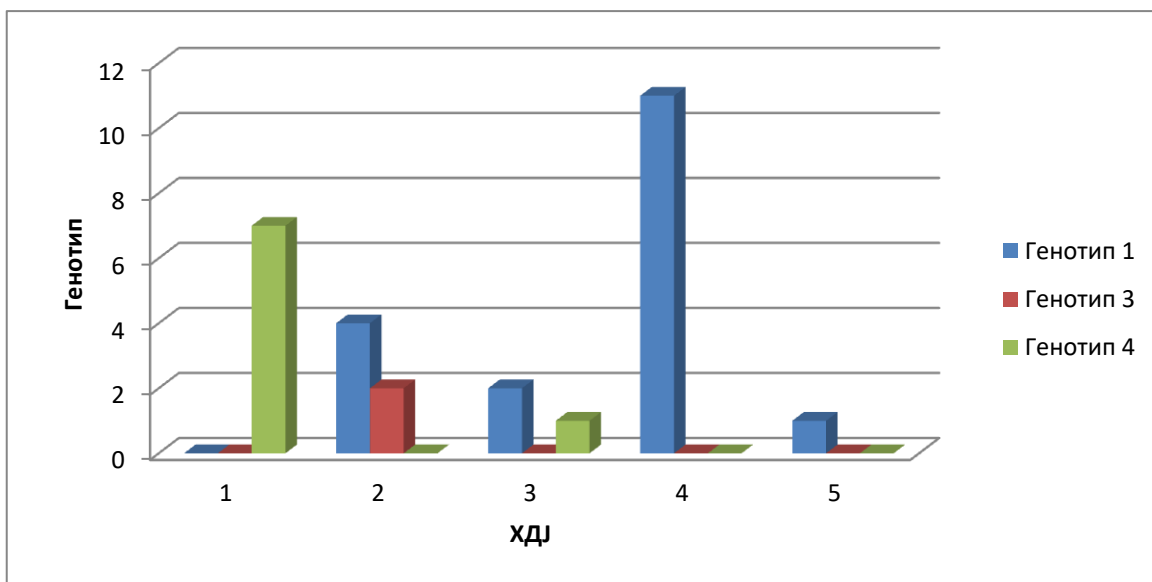
Анти-HCV антитијела била су присутна прије ступања на хемодијализу код 5 (12,5%) пацијената, а 35 (87,5%) њих су стекли антитијела у наредним годинама током дијализирања. HCV RNK је откривен код 34 (85%) пацијената на дијализи док код њих 6 (15%) није. Код пацијената са недетектабилном виремијом били су у питању ниски титрови антитијела. 11 (27,5%) пацијената на хемодијализи има високу виремију $>8 \times 10^6$ IU/ml, њих 23 (57,5%) има ниску виремију мање од 8×10^6 IU/ml, а 6 (15%) нема виремију. Код 6 (15,15%) пацијената са откривеном HCV RNK због због изузетно ниске вриједности виремије, <25 IU/ml, није било могуће одредити генотип (графикон 1).



Графикон 1. Дистрибуција по генотиповима Коод 34 пацијента са детектованом RNK њих 18 је имало генотип 1, 2 пацијента су имали генотип 3, док је генотип 4 имало 8 пацијената. Није било могуће одредити генотип код 6 пацијената.

Резултати су приказани графиконом 3D Column.

Од 5 ХДЈ које су учествовале у студији у три јединице је био заступљен само по један генотип и то у двије генотип 1, а у једној генотип 4. Двије ХДЈ су били зступљени генотип 1 и 3 у једној а генотип 1 и 4 у другој (графикон 2)

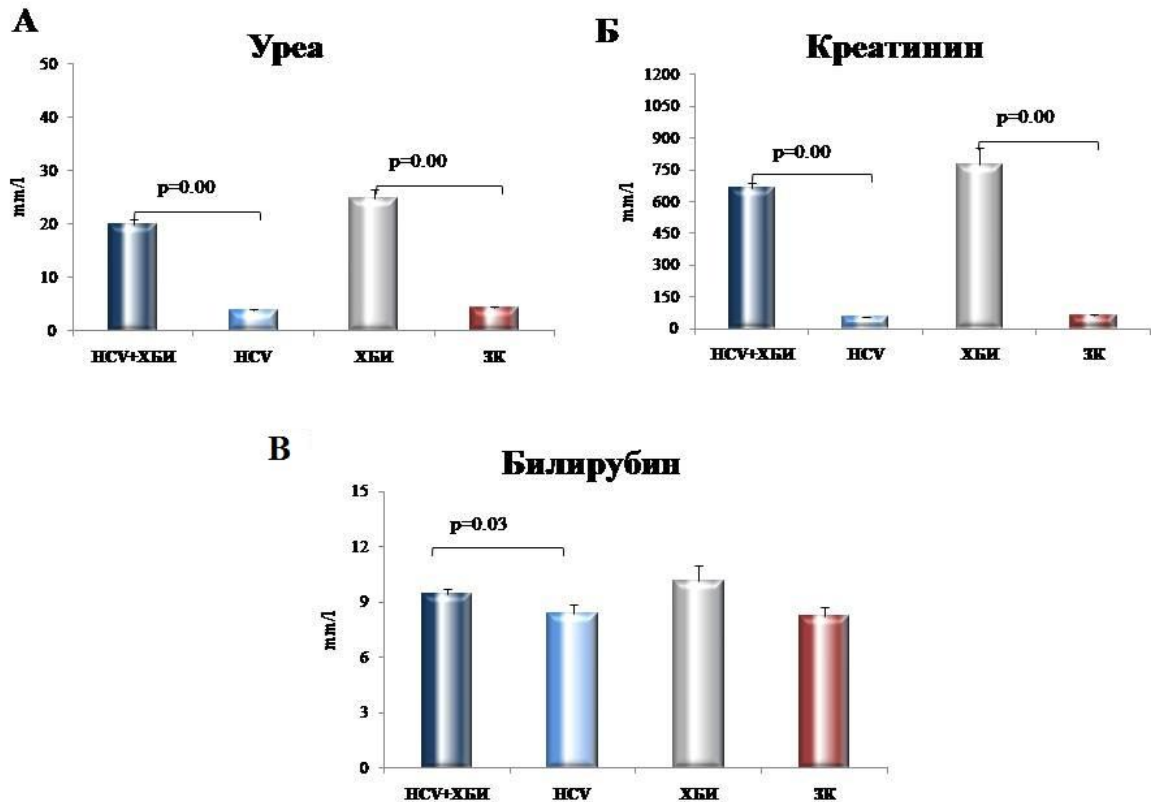


Графикон 2. Дистрибуција генотипова по хемодијализним јединицама.

У ХДЈ 1 код свих пацијената са детектованом HCV RNK заступљен је био само генотип 4 и то код 7 пацијената. ХДЈ 2 била су 3 пацијента са генотипом 1 и 2 пацијента са генотипом. У ХДЈ 3 код 2 пацијента нађен је генотип 1 а код једног генотип 4, у ХДЈ 4 заступљен је био само генотип 1 код 11 пацијената и у ХДЈ 5 један пацијент са генотипом 1.

Резултати су приказани графиконом 3D Column.

Анализиране су и упоређене серумске концентрације биохемијских параметара и то урее, креатинина и билирубина у свим дефинисаним групама. Из добијених резултата може се видјети да су. Средње концентрације урее и креатинина биле су знатно више код ХБИ пацијената у поређењу са здрави контролним субјектима. Резултати су такође показали да су серумски нивои урее и креатинина били знатно виши код HCV⁺+ХБИ пацијената у поређењу са HCV⁺ пацијентима Када је у питању ниво билирубина у серуму испитаника, статистички значајна разлика је уочена између HCV⁺+ХБИ и HCV⁺ групе испитаника при чему су пацијенти који припадају HCV⁺+ХБИ групи имали значајно више вриједности билирубина (Графикон 3).



Графикон 3. Нивои биохемијских параметара (уреае, креатинина и билирубина) у серуму.

Серумски нивои биохемијских параметара, су одређени методом по Jaffe-u ; затим ензимским, спектофотометријским кинетичким методом и билирубин методом по Malloy-Evelyn-a.

ЗА: концентрација уреае високо статистички значајно је виша код пацијената са ХБИ у односу на контролну групу испитаника (средња вриједност±стандардна грешка 24.77±1.71 наспрам 4.28±0.22 mmol/l;p=0,00), као и код НCV⁺+ХБИ пацијената у поређењу са НCV⁺ пацијентима (19.90±0.91 наспрам 3.77±0.34 mmol/l; p<0,05).

ЗБ: концентрација креатинина високо статистички значајно је виша код пацијената са ХБИ у односу на контролну групу испитаника (средња вриједност±стандардна грешка 777.96±80 наспрам 63.68±1.87 mmol/l;p=0,00), као и код НCV⁺+ХБИ пацијената у поређењу са НCV⁺ пацијентима (667.11±21.74 наспрам 57.07±1.61 mmol/l;p<0,05).

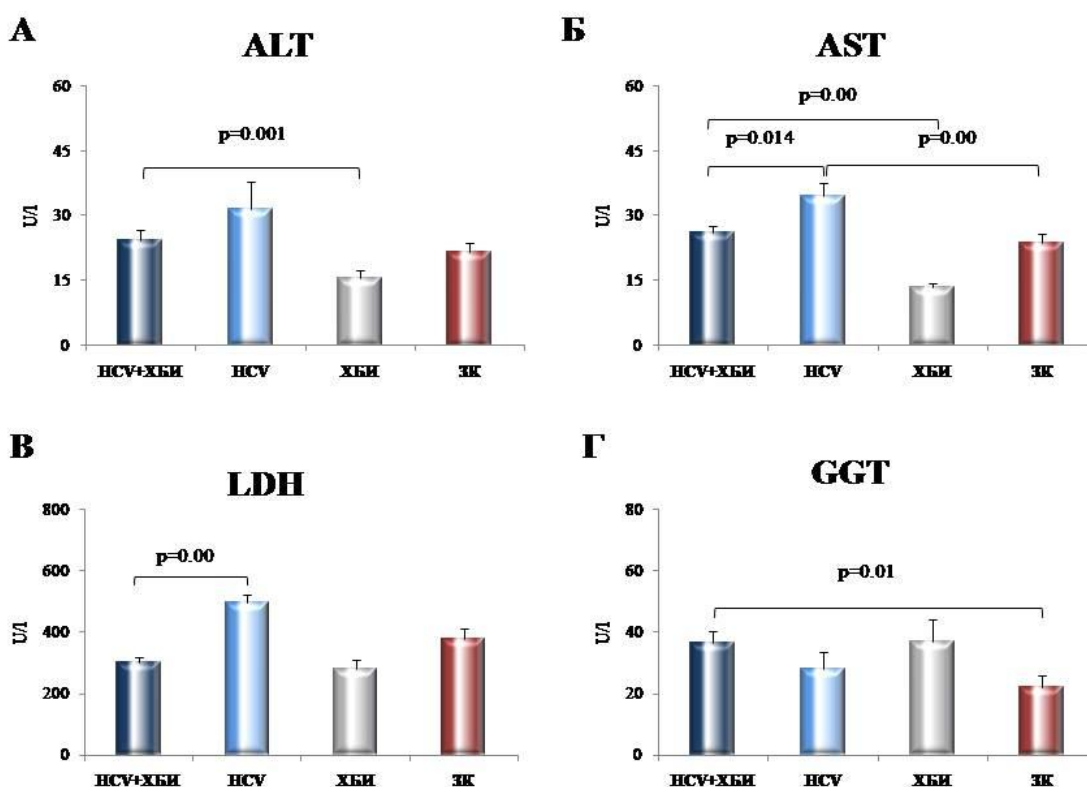
ЗВ: концентрација билирубина високо статистички значајно је виша код НCV⁺+ХБИ пацијената у поређењу са НCV⁺ пацијентима(средња вриједност±стандардна грешка 9,4±0,26 наспрам 8,4±0,51.; p<0,53).

Приказане вредности су представљене 2D Column.дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whytney-евим тестом.

Као додаток, мјерили смо маркере функције јетре а резултати су показали да су НCV⁺+ХБИ пацијенти имали смањен ниво аланин аминотрансферазе (ALT) и знатно нижу серумску концентрацију аспартат аминотрансферазе (AST) у поређењу са пацијентима (није досегло статистички значај, подаци нису приказани) и знатно нижу

серумску концентрацију аспартат аминотрансферазе AST у поређењу са HCV⁺ пацијентима. Такође смо измјерили лактат дехидрогеназу (LDH) у серумима свих дефинисаних група. HCV⁺+ХБИ пацијенти имали су знатно смањен ниво LDH у поређењу са HCV⁺ пацијентима. Када је у питању ензим гама глутамил трансфераза (GGT) значајно више вриједности уочене су у групи испитаника са HCV⁺+ХБИ у односу на контролну групу испитаника (графикон 4).



Графикон 4. Серумски нивои биохемијских параметара јетре (ALT, AST, LDH и GGT).

Серумски нивои биохемијских параметара, су одређени IFCC кинетичким UV методом.

4А: (није doseglo statistički značaj, podaci nisu prikazani), али постоји високо статистички значајна разлика између вредности у групи HCV⁺+ХБИ и пацијената са ХБИ (24,43±2,40 наспрам 31,71±6,26; p<0,05).

4Б: Постоји статистички значајна разлика између нивоа AST код HCV⁺+ХБИ и HCV⁺ пацијената (26.10±1.71 наспрам 34.53±3.22 U/l; p<0.05),

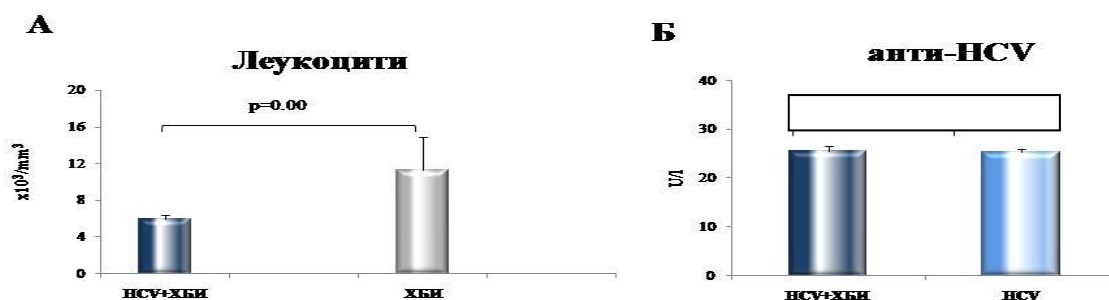
4В: Ниво лактат дехидрогеназе (LDH) високо статистички значајно нижи у HCV⁺+ХБИ у односу на HCV⁺ групу испитаника. (300.40±18.40 наспрам 495.88±27.79 U/l; p<0.05)

4Г: Код вредности (GGT) статистички значајна разлика је уочена између HCV⁺+ХБИ и контролне групе испитаника (36,35±3,87 наспрам 22,10± 3,67; p<0.05)

Приказане вредности су представљене 2D Column. дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whytney-евим тестом

Мјерен је ниво бијелих крвних елемената, при чему су испитаници из HCV⁺+ХБИ групе имали значајно мању концентрацију леукоцита од пацијената који су били HCV⁺ али нису имали обољење бубрега. Такође је измјерен серумски ниво анти -HCV антителија код HCV⁺+ХБИ и код HCV⁺ групе пацијената. Резултати су показали да се концентрације антителија у испитиваним групама нису разликовале (графикон 5).



Графикон 5. Број леукоцита и серумске концентрације анти HCV антителија.

Серумски нивои биохемијских параметара, су одређени на принципу импенданције и волуметријског бројања крвних ћелија. Анти HCV антителија су одређена ELISA (ELFАтехника) тестом.

5А: Између HCV⁺+ХБИ и HCV⁺ групе испитаника уочена је висока статистички значајна разлика у броју леукоцита (средња вриједност±стандардна грешка 5,97±0,42 наспрам 11,35±3,54; p<0.05).

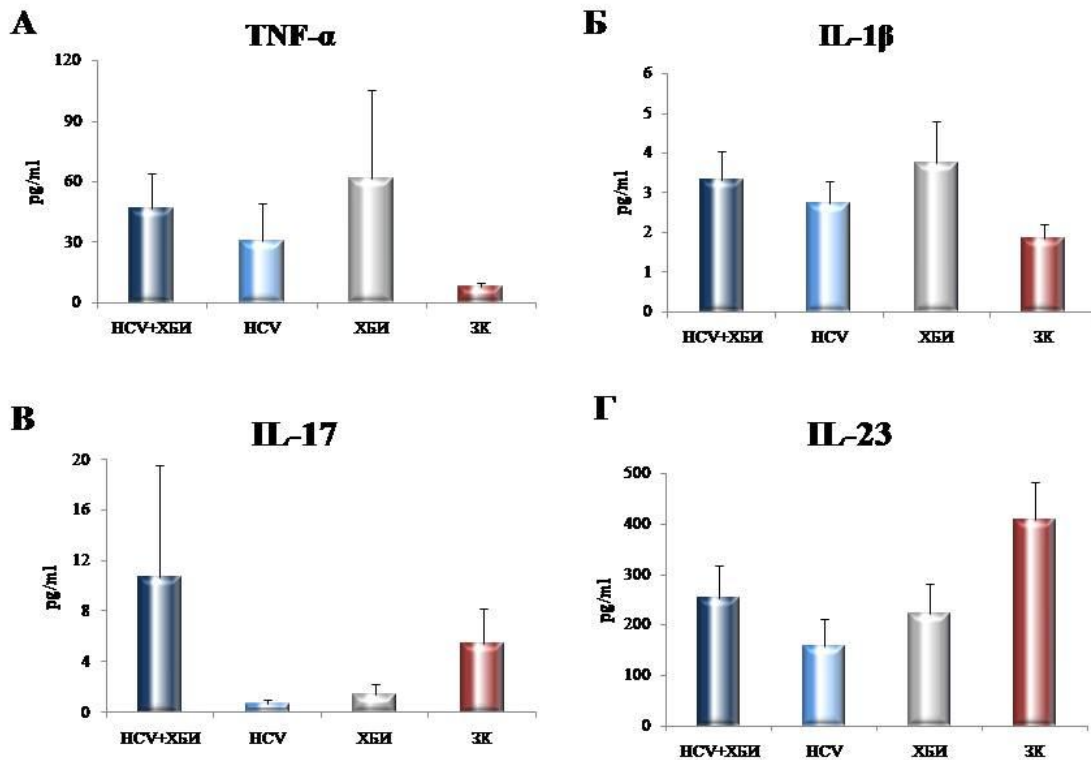
5Б: Није примјећена значајна разлика у нивоу анти-HCV антителија у ESRD HCV⁺ пацијенте у поређењу са HCV⁺ пацијентима (средња вриједност±стандардна грешка 25.49±1.11 наспрам 25.47±0.49 S/CO; p>0,05).

Приказане вредности су представљене 2D Column дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whytney-евим тестом

Испитали серумске концентрације цитокина IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-23 и IL-33, TNF- α , TGF- β . Пацијенти су подијељени у четири групе, на основу функције бубрега и Хепатитис Це вирусне инфекције.

Поређење TNF- α , IL-1 β , IL-17 и IL-23 серумских нивоа није открило статистички значајну разлику између група HCV⁺+ХБИ пацијената и HCV⁺ пацијената (графикон 6).



Графикон 6. Серумске концентрације TNF- α , IL-1 β , IL-17 и IL-23.

Серумски нивои цитокина код испитаника, су одређени ELISA тестом. Између свих група испитаника није уочена статистички значајна разлика у серумским вредностима TNF- α , IL-1 β , IL-17 и IL-23.

6А: TNF- α : 46,29±17,71 наспрам 30,15±18,84 pg/ml; p>0.05.

6Б: IL-1 β : 3.32±0.72 наспрам 2.71±0.57 pg/ml; p>0.05.

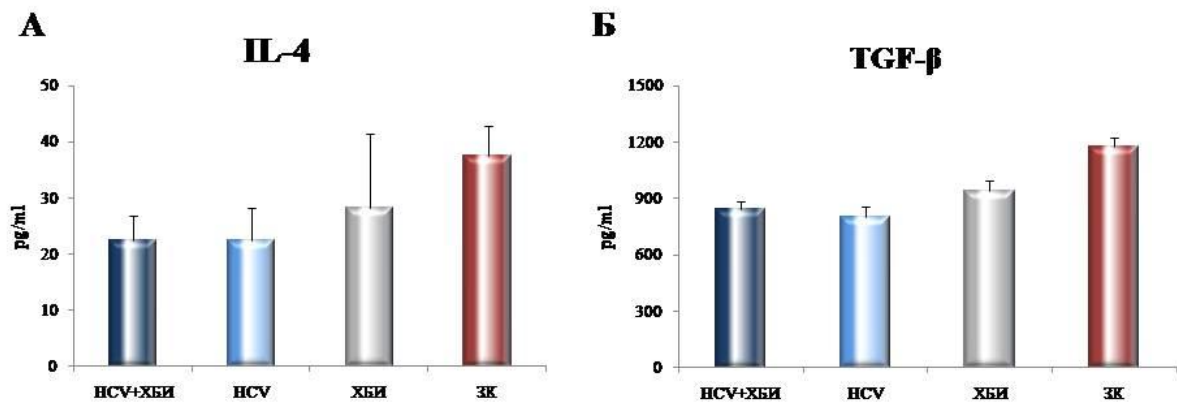
6В: IL-17: 10,66±8,91 наспрам 0,62±0,35 pg/ml; p>0.05.

6Г: IL-23: 253.58±62.93 наспрам 157.61±54.69 pg/ml; p>0.05.

Приказане вредности су представљене 2D Column дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whytney-евим тестом

Забилежњн је благи пораст серумске концентрације IL-4 и TGF- β код здраве контролне групе у односу на остале (графикон 7).



Графикон 7. Серумске концентрације IL-4 и TGF-β.

Серумски нивои цитокина код испитаника, су одређени ELISA тестом.

Између свих група испитаника није уочена статистички значајна разлика у серумским вредностима IL-4 и TGF-β

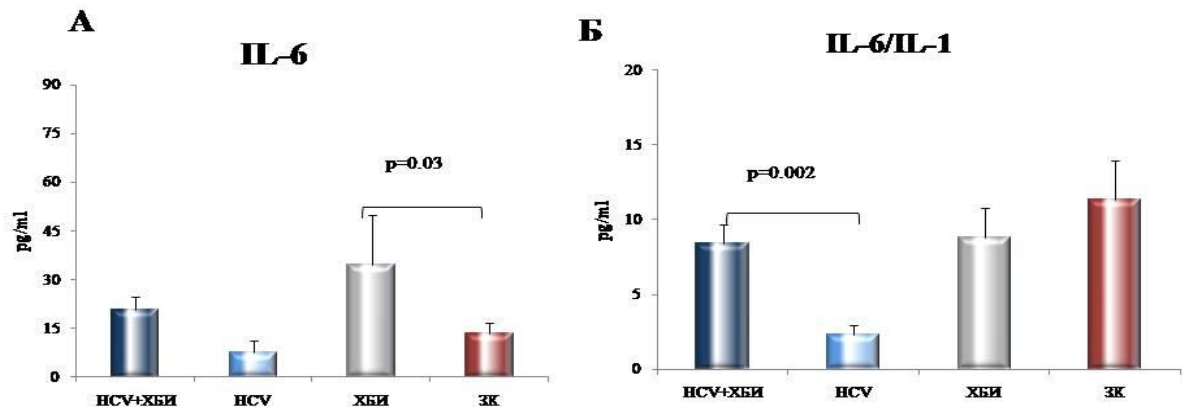
7А: Серумске вредности у групи у HCV⁺+ХБИ и HCV⁺ пацијената (22.36±4.47 наспрам 22.42±5.93 pg/ml; p>0.05).

7Б: Серумске вредности у групи у HCV⁺+ХБИ и HCV⁺ пацијената (p>0,05)

Приказане вредности су представљене 2D Column дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Након тога смо анализирали концентрацију IL-6 у серуму све четири дефинисане групе. ХБИ пацијенти имали су знатно повишене нивое IL-6 у поређењу са здравим контролним субјектима. Серумски ниво IL-6 такође је био знатно повишен у групи HCV⁺+ХБИ пацијената у поређењу са HCV⁺ пацијентима као и са здравим контролама . Сугерисано је да је однос контрарегулаторних цитокина релевантан маркер процеса обољења. Стога су размотрени омјери хепатопротективног IL-6 те IL-1β и IL-23. Једина битна уочена разлика био је IL-6/IL-1. Омјер IL-6/IL-1 био је повећан у групи HCV⁺+ХБИ пацијената у односу са HCV⁺ пацијентима (графикон 8).



Графикон 8. Серумске концентрације IL-6 и односа IL-6 са IL-1.

Серумски нивои цитокина код испитаника, су одређени ELISA тестом.

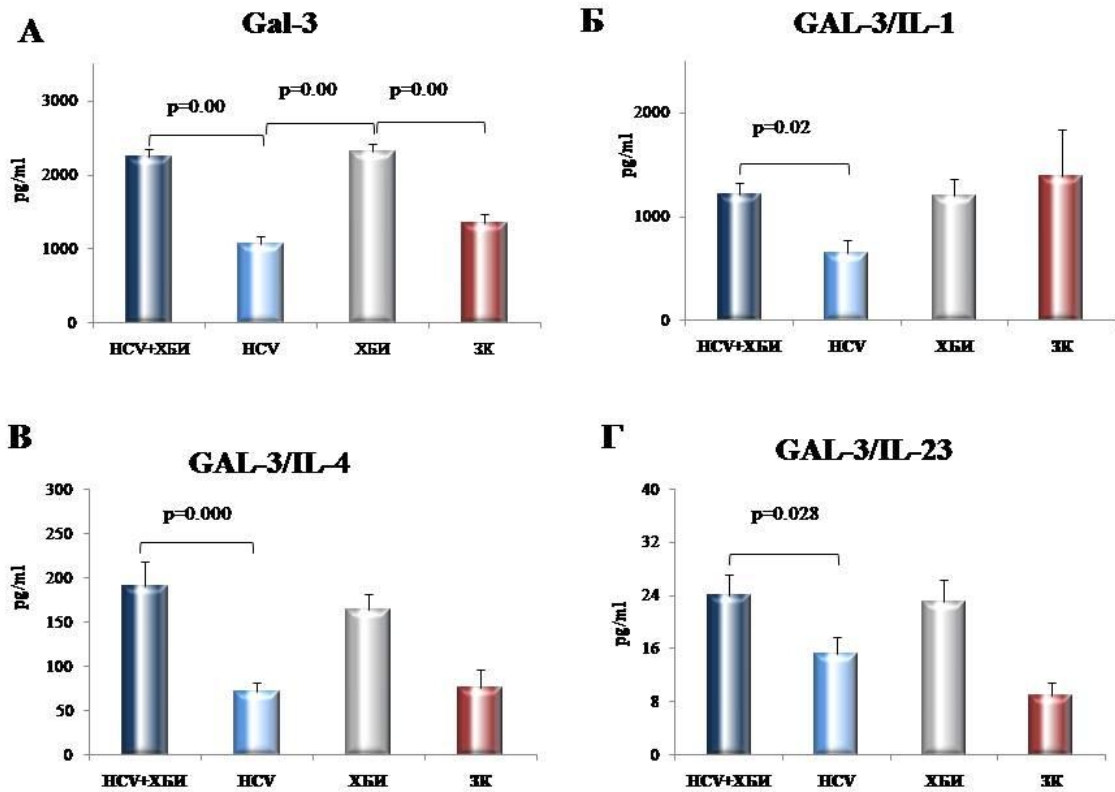
8А: Постоји статистички значајна разлика у нивоима IL-6 између ХБИ и ЗК пацијената (34.46 ± 15.43 наспрам 13.56 ± 3.1 pg/ml; $p < 0.05$), као и између HCV⁺ХБИ и HCV⁺ (20.79 ± 3.81 наспрам 7.36 ± 3.87 pg/ml; $p < 0.05$).

8Б: Постоји статистички значајна разлика у односу IL-6/IL-1 групи HCV⁺ХБИ пацијената у односу са HCV⁺ пацијентима (8.42 ± 1.25 наспрам 2.35 ± 0.57 ; $p < 0.05$), али не и између ХБИ и ЗК пацијената.

Приказане вредности су представљене 2D Column дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Измјерили смо серумске нивое Galektina-3 у све четири групе пацијената као и његов однос са проинфламаторним и имуносупресивним цитокинима.. ESRD (ХБИ) пацијенти имали су знатно повишену концентрацију Galektina-3 у поређењу са здравим контролним субјектима. Показано је да су HCV⁺иХБИ пацијенти такође имали повећан ниво Galektina-3 у поређењу са HCV⁺ пацијентима. Резултати су показали да је концентрација Galektina-3 значајно виша у групи пацијената са хроничним обољењем бубрега у односу на HCV⁺ и пацијенте из здраве контролне групе. Када је у питању однос GAL-3 и IL-1, концентрације GAL-3/IL-1 су статистички значајно више у HCV⁺ХБИ групи пацијената у односу на HCV⁺ групу. Слична ситуација је и са GAL-3/IL-4 и GAL-3/IL-23, гдје је исто уочено да је концентрација ових цитокина значајно виша у HCV⁺ХБИ групи пацијената у односу на HCV⁺ групу (графикон 9).



Гтафикон 9. Серумски нивои Galektina-3 и односа Galektina-3 и проинфламаторних и имunosупресивних цитокина.

Серумски нивои цитокина код испитаника, су одређени ELISA тестом.

9А: НCV⁺иХБИ пацијенти имали су знатно повишену концентрацију Galektina-3 у поређењу са здравим контролним субјектима (2308.31±111.29 наспран 1341.90±127.85 pg/ml; p<0.05). Високо статистички значајно повишен ниво galektina-3 (GAL-3) је уочен у НCV⁺иХБИ групи пацијената у односу на НCV⁺ групу (2252.50±97.18 наспран 1072.76±108.80 pg/ml; p<0.05), такође, висока статистички значајна разлика је уочена и између ХБИ групе и група НCV⁺(2308,31±111,29 наспран 1072.76±108.80 pg/ml; p<0.05) и ЗК(2308,31±111,29 наспран 1341,90±127,85 pg/ml; p<0.05)., при чему су вриједности GAL-3 биле значајно више у ХБИ групи пацијената.

9Б: НCV⁺иХБИ пацијенти имали су високо статистички значајно виши омјер Gal-3/IL-1 (1212.26±107.54 наспран 641.91±131.37; p<0.05)

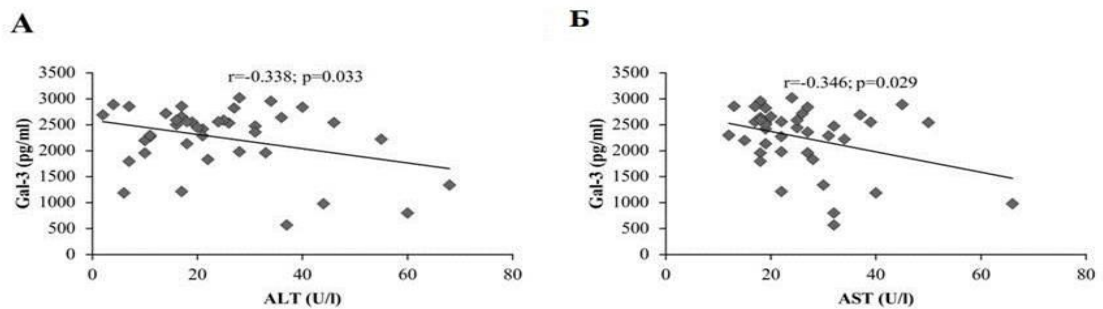
9В: НCV⁺иХБИ пацијенти имали су високо статистички значајно виши омјер Gal-3/IL-4 (190.24±27.98 наспран 71.51±9.93; p<0.05).

9Г: НCV⁺иХБИ пацијенти имали су високо статистички значајно виши омјер Gal-3/IL-23 (24.14±3.03 наспран 15.24±2.52; p<0.05).

Приказане вредности су представљене 2D Column дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whytney-евим тестом.

Анализиране су корелације између Galectin-3 и маркера оштећења јетре у групи болесника са терминалним стадијумом бубрежне болести и хепатитис Це вирусном инфекцијом. На основу p вредности, корелација може бити позитивна или негативна и слаба ($p=0.1-0.3$), умјерена ($p=0.3-0.5$) и јака ($p>0.5$) (графикон 10).



Графикон 10. Корелација Galectin-3 и маркера оштећења јетре.

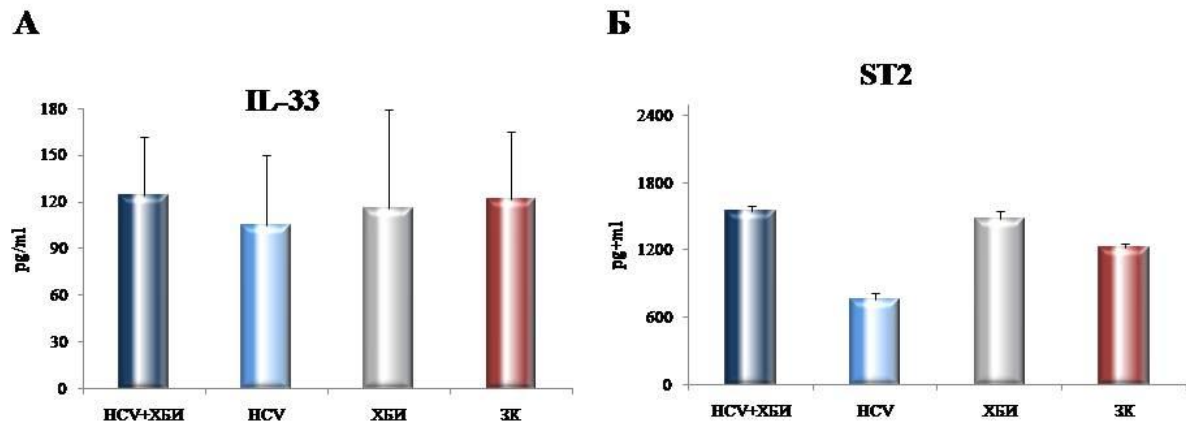
10А: Постоји умјерена негативна корелација између Galectina-3 и ALT ($p<0.05$)

10Б: Постоји умјерена негативна корелација између Galectina-3 и AST ($p<0.05$)

Приказане вредности су представљен *Scatter* дијаграмом.

Статистички значај је тестиран као независни узорак Studentovim t-testom.

Испитиване серумске концентрације IL-33 и ST2 у све четири групе пацијенат имале су приближно једнаке вриједности, с тим што су оба параметра имале нешто височије вриједности у HCV⁺+ХБИ групи и код пацијената у групи ХБИ (графикон 11).



Графикон 11. Серумске концентрације IL-33 и ST2.

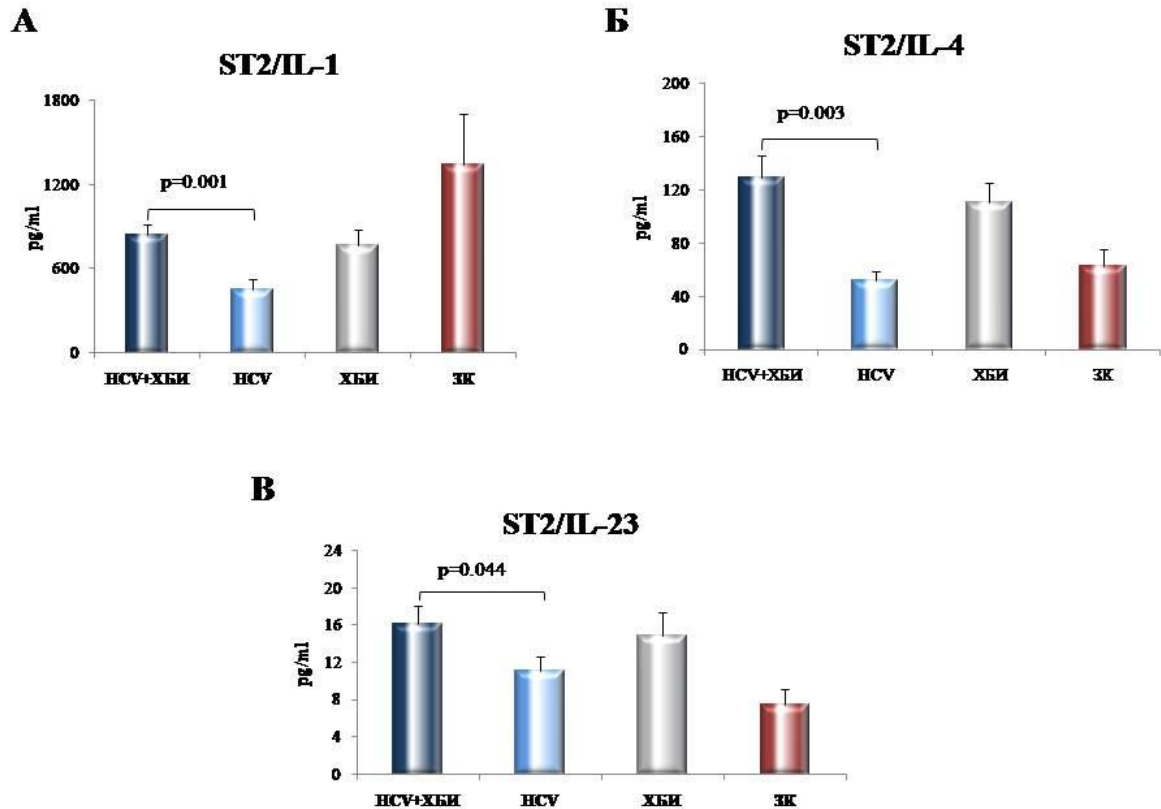
Серумски нивои цитокина код испитаника, су одређени ELISA тестом.

Графикони А и Б нам показују да између различитих група испитаника није уочена статистички значајна разлика када је у питању серумска концентрација IL-33 и ST2 ($p < 0.05$).

Приказане вредности су представљене 2D Column дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Мјерени су односи серумских концентрација између ST2 и IL-1, IL-4 и IL-23 у све четири тестиране групе пацијената. Пацијенти HCV⁺+ХБИ у односу на HCV⁺ групе испитаника имали су височије концентрације када је у питању однос ST2/IL-1. Као и однос ST2/IL-4, статистички значајна разлика је уочена и у односу ST2/IL-23 између HCV⁺+ХБИ и HCV⁺ групе пацијената. У свим поменутих односима концентрација цитокина је виша у HCV⁺+ХБИ групи пацијената у односу на HCV⁺ групу пацијената (графикон 12)



Графикон 12. Однос између ST2 и IL-1, IL-4 и IL-23.

Серумски нивои цитокина код испитаника, су одређени ELISA тестом.

Између HCV⁺+ХБИ и HCV⁺ групе испитаника уочена висока статистички значајна разлика када је у питању однос **А**: ST2/IL-1 (845,77±69,99 наспрам 457,62±68,19; p<0.05), као и **Б**: ST2/IL-4 (129,34±17,08 наспрам 52,00±6,73; p<0.05), а статистички значајна разлика је уочена и у односу **Б**: ST2/IL-23 (16,16±1,91 наспрам 11,20±1,48; p<0.05), при чему је у свим ситуацијама концентрација цитокина значајно виша у HCV⁺+ХБИ групи пацијената.

Приказане вредности су представљене 2D Column дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

5. ДИСКУСИЈА

Познато је да су пацијенти на хемодијализи са високим ризиком за настанак хепатитис Це вирусне инфекције. HCV може бити и узрок а и последица обољења бубрега. Као узрок оболјенја можемо говорити о директној инфекцији ћелијског паренхима бубрега јер они на себи имају експримиране CD 81 и SR-B1 рецепторе за HCV што доводи до гломерулонефритиса, због екстрахепатичких манифестација и стварања имунских комплекса доводећи до системских васкулитиса. А може бити и последица ТБИ, због повећаног обољевања од различитих инфекција због смањеног имунског система у ТБИ, због честих хемодијализа.

Већина истраживања се слађу да је трајање дијализе уско повезано са позитивном стопом анти-HCV (Jasuja i sar., 2009). У нашем истраживању закључено је да дужина дијализног статуса није значајно утицала на ниво присутних HCV RNK тј. виремију као ни на количину анти-HCV антитијела. У овом истраживању јњ утврђено да је виремија у позитивној корелацији са количином анти-HCV антитијела док висока виремија, она преко 8×10^6 IU/ml, није у корелацији са титром антитијела, тј. да са даљним повећањем виремије изнад 8×10^6 IU/ml не расте концентрација антитијела. Такође, титар антитиела није значајно зависио од генотипа вируса. Велики број студија је испитивао вирусну кинетику HCV-а прије, током и након стандардне 4-сатне сесије хемодијализе. Неке студије су откриле значајно смањење у оптерећењу HCV вирусом током ХД сесије са повратком на основне нивое након 48 сати, прије сљедеће дијализе (Furusyo i sar., 2000; Badalamenti i sar., 2003). Литературни подаци говоре да HCV оптерећење код ХД пацијената обично је ниско. Ипак, у неколико студија забиљежена су слична или већа оптерећења у поређењу са неуремичним пацијентима (Sterling i sar., 1999; Cotler i sar., 2002; Azevedo i sar., 2007), као и функција HCV-RNK и наизмјенична виремија (Fabrizio i sar., 2000). Два проспективна теста су показала смањење у HCV RNK нивоима, па чак и елиминацију вируса у одређеним тренуцима код ХД пацијената, али не и код неуремичних контролних субјеката (Furusyo i sar., 2000; Okuda i sar., 2004). Главни механизми за објашњавање интрадијалитичке редукције HCV-а су сљедећи: пролазак вируса кроз мембрану у дијализат или ултрафилтрат (Noiri i sar., 2001), адсорпција вируса или вирусних партикула од стране дијализне мембране (Hayashi i sar., 1997; Angelini i sar., 2002), редукција HCV-а путем фактора посредованих од стране домаћина (Badalamenti i sar., 2003). Дистрибуција HCV генотипова је била слична онима који су пријавили и други аутори за блиске

географске регије, да је HCV генотип 1 и 3 одговоран за већину инфекција, с тим што у нашој студији имамо у значајном проценту заступљен и генотип 4. У нашој студији добијена је јака позитивна корелација између измјерених вредности виремије и генотипа вируса. Виремија је била висока код пацијената са генотипом 1 и 4 у односу на генотип 3.

У овој студији смо показали смањени ниво AST и LDH код ESRD HCV⁺ пацијената у поређењу са HCV⁺ пацијентима. Виша системска вриједност IL-6 детектована је код ESRD HCV⁺ пацијената у поређењу са HCV⁺ пацијентима док нису уочене битније разлике у концентрацијама IL-1 β , IL-4, IL-23 и анти-HCV антителијела међу дефинисаним групама. По први пут смо показали да је Galektin-3 био знатно повишен у серумима ESRD HCV⁺ пацијената у поређењу са HCV⁺ пацијентима. ESRD HCV⁺ пацијенти имали су знатно повишене Gal-3/IL-1, Gal-3/IL-23 и Gal-3/IL-4 омјере у поређењу са HCV⁺ пацијентима. Запазили смо умјерену негативну корелацију између Galektina-3 и AST, као и између Galektina-3 и ALT код ESRD HCV⁺ пацијената.

Инфекција хепатитис Це вирусом један је од највећих узрока обољења јетре. (Bantel и Schulze-Osthoff, 2003). Код више од половине заражених пацијената долази до хроничне HCV инфекције и постоји висок ризик од развоја хепатичне фиброзе, цирозе и хепатоцелуларног карцинома (Hajarizadeh и сар., 2013). Хронични HCV је обично асимптоматски и углавном се детектује повећаним нивоом серумских аминотрансфераза као и позитивним тестом на HCV антителијела (Kaul и сар., 2002).

Да би предвидјели или евалуирали ниво оштећења јетре, многе студије су показале значај мјерења AST и ALT током HCV инфекције. И заиста, постоје нека размишљања да AST и ALT нису корисни маркери скрининг тетса за оштећење хепатоцита. Неке студије сугеришу на то да су опадања AST и ALT посљедица редуковања вирусних оптерећења током дијализе Tseng GY (Tseng и сар., 2008; Badalamenti и сар., 2003). Друге студије су откриле да је серумски ниво фактора раста хепатоцита знатно повишен након сесије хемодијализе и да директно стимулише митогенезу хепатоцита и регенерације јетре, стога умањујући оштећење јетре а самим тим и серумски AST и ALT (Rampino и сар., 1999).

Трећа теорија је спекулисала да алтерација AST и ALT зависи од системског повећања IFN- α , који расте непосредно након хемодијализе и смањује виремију и ниво AST и ALT у серумима (Badalamenti и сар, 2003; Tompkins, 1999).

Све ове студије указују на значај времена прикупљања узорка. На основу резултата, серумски AST и ALT зависе од времена прикупљања крви. У нашој студији, узорци крви ESRD и HCV⁺ пацијената као и ESRD пацијената били су прикупљени прије дијализе, тако да временски фактор није могао утицати на ниво AST и ALT.

Открили смо смањене серумске нивое AST, LDH и ALT код ESRD HCV⁺ пацијената у поређењу са HCV⁺ групом. Ови резултати могу указати на блаже оштећење јетре ESRD HCV⁺ пацијената у поређењу са HCV⁺ пацијентима. Када је у питању ензим гама глутамил трансфераза (GGT) значајно више вриједности уочене су у групи испитаника са HCV⁺+ХБИ у односу на контролну групу испитаника, док се вредности нису разликовале у односу на ХБИ групу пацијената.

Наши резултати су у складу са већином радова који су проучавали оштећење јетре, што указује на то да је углавном серумски ниво AST у корелацији са маркерима хепатичне инфламације и фиброзом и стога може бити објективан маркер за евалуацију оштећења јетре (Assy N, 2000).

Многе студије су показале да ESRD прати имунолошка дисрегулација промјеном ефекторних функција урођеног и стеченог имунитета што повећава осјетљивост на инфекције (Vacher-Coropat и сар., 2008; Knerr и сар, 2005; Ruiz и сар., 1990). Уремични токсини и оксидативни радикали се производе као последица отказивања бубрега и превасходно директно утичу на NK ћелије и CD8⁺ ћелије редуковањем изражавања NKG2D активационог рецептора (Peraldi и сар., 2009). Функције антиген-презентујућих ћелија, попут дендритских ћелија и макрофага, такође су погоршане, стога утичући на њихову интеракцију са Т ћелијама (Eleftheriadis и сар., 2007). Представљени резултати имплицирају да смањена функција имунског система код ESRD пацијената доводи до редукованог елиминсања ћелија заражених вирусом.

Наш сљедећи циљ било је испитивање серумског нивоа цитокина. Резултати су показали да није било веће разлике у серумској концентрацији IL-1 β и IL-23 између ESRD HCV⁺ пацијената. Пошто си IL-1 β и IL-23 проинфламаторни цитокини произведени од стране ћелија урођеног имунитета (Dong, 2008), вјерујемо да нема битне алтерације у урошеном анти- HCV имунолошком одговору код ESRD HCV⁺ пацијената су порешењу са HCV⁺ пацијентима.

Поред значаја ћелијског имунолошког одговора у HCV инфекцији, хуморални имунитет је такође битан у борби против вирусних (Burton, 2002). Опште је познато да

је IL-4 један од кључних цитокина за развој хуморалног имунолошког одговора (Chen и сар., 2000). Наши резултати су показали да нема разлике у концентрацији IL-4 у серуму ESRD HCV⁺ и HCV⁺ пацијената. Штавише, исмо пронашли разлику у серумској концентрацији анти- HCV антитијела између ESRD HCV⁺ пацијената и HCV пацијената. Ова открића су у складу са резултатима друге студије који су открили да нема разлика у серумском нивоу IgG, IgM и IgA код ESRD пацијената у поређењу са здравим контролним субјектима, што указује на то ESRD није утицао на хуморалну страну антивирусног имунолошког одговора. Неке студије су ипак показале да обољење бубрега утиче на компоненте ћелијског имунолошког одговора (Eleftheriadis и сар., 2007), а ипак нисмо пронашли разлику у системским нивоима цитокина укључених у ћелијски имунолошки одговор између ESRD HCV⁺ и HCV⁺ пацијената. Пошто нисмо пронашли алтерације у параметрима ћелијског и хуморалног имунолошког одговора, вјерујемо да су неки други механизми одговорни за мање оштећење јетре.

Да би открили могући механизам за смањено оштећење јетре код ESRD пацијената, измјерили смо системски ниво IL-6 код ESRD HCV⁺ и HCV⁺ пацијената. IL-6 је плејотропни цитокин произведен од стране стромалних ћелија и имунолошког система током инфламације (Hunter и Jones, 2015). IL-6 је познат као хепатопротективни цитокин битан за стимулацију пролиферације хепатоцита као и непаренхималних ћелија у јетри (Vöhm и сар, 2010).

Према претходним подацима, постоји неколико путева које IL-6 активира у јетри. Током урођеног имунолошког одговора, Купфер ћелије производе IL-6 који игра главну улогу у индуковању производње протеина у јетри у акутној фази (Gao, 2012). Као додатак томе, након везивања за свој рецептор, IL-6 путем JAK1/STAT3 сигнализационих путева и MAP киназе изазива изражавање многих заштитних гена у хепатоцитима, стога стимулишући пролиферацију хепатоцита и њихово преживљавање (Taub, 2004; Teoh и сар., 2006.).

Улога IL-6 у биологији HCV инфекција још увијек није разјешњена. Иако постоје резултати који показују да, у зависности од врсте обољења, IL-6 може дјеловати као проинфламаторни или антиинфламаторни цитокин (Scheller и сар., 2011), ми сматрамо да IL-6 има протективну улогу код ESRD HCV⁺ пацијената. Наиме, открили смо знатно виши системски ниво IL-6 код ESRD HCV⁺ пацијената у поређењу са HCV⁺ пацијентима. Као додатак томе, примијетили смо виши серумски ниво IL-6 код ESRD

пацијената у поређењу са групом здравих контролних субјеката, што указује на то да је повећање IL-6 код ESRD HCV⁺ пацијената вјероватно последица отказивања бубрега. Штавише, IL-6/IL-1 β омјер био је знатно виши код ESRD пацијената у поређењу са HCV⁺ пацијентима. У складу са претходно описаним механизмима дјеловања, вјерујемо да повишени системски ниво IL-6 код ESRD HCV⁺ штити јетру од вирусне деструкције смањујући потом системски AST и ALT и такође стимулише регенерацију јетре. Штавише, повећани IL-6/IL-1 β омјер код ESRD HCV⁺ пацијената указао је на то да је хепатопротективна улога IL-6 надвладава проинфламаторну улогу IL-1 код ових пацијената.

Како су претходне студије откриле потенцијалне механизме Gal-3 као антиинфламаторног маркера и маркера заштите ткива, било је важно проучити то код коморбидности ESRD HCV инфекција. Открили смо повишено ниво Gal-3 у групи ESRD HCV⁺ пацијената, као и код ESRD пацијената. Штавише, ESRD HCV⁺ пацијенти имали су знатно повишене омјере Gal-3/IL-1 (слика 3B), Gal-3/IL-23 (слика 3C) и Gal-3/IL-4 (слика 3D) у поређењу са HCV⁺ пацијентима. Такоше смо покушали одредити потенцијалне корелације између серумских нивоа Gal-3 и маркера оштећења јетре, попут ALT и AST. Показали смо негативну корелацију између Galektina-3 и AST и ALT, наиме код ESRD HCV⁺ пацијената (слике 4A и 4B).

Опште је познато да се, током оксидативног стреса, реактивне врсте кисеоника, као и други токсични производи, акумулишу у ћелији и индукују стварање коначних производа напредне гликације (AGE) (Krahe и Wanner, 2002). AGE, липиди и који постају гликолизирани као резултат излагања оксидативним радикалима производе се у различитим обољењима као што је дијабетес, атеросклероза, хронично обољење бубрега и везују се за рецептор (RAGE) стимулишући оксидативни стрес у ћелији и локалну инфламацију (Goldin и сар., 2006). Gal-3 инхибира AGE-RAGE пут конкурентним инхибирањем везивања AGE за RAGE или блокирањем изражавања RAGE гене, а самим тим сузбија RAGE-индуковану инфламацију у ткиву (Nomoto и сар., 2006). Други могући механизам дјеловања Gal-3 је директно инхибирањем имунског одговора инхибирањем интеракције између Т ћелија и антиген-презентујућих ћелија (Chen и сар, 2009).

Током HCV инфекције, вирусно кодирани структурни као и сеструктурни протеини индукују апоптозу хепатоцита и сљедујуће оштећење јетре (Lim и сар, 2014). Антиапоптотска улога Gal-3 добро је утврђена. Показано је да Gal-3 штити интегритет

митохондријалне мембране, инхибира оштећење цитохрома С и стога чува ћелије од програмиране смрти (Moon и сар., 2001). Заштитна улога је карактеристика интраћелијског Gal-3. Скорашња студија описала је узимање екстраћелијског Gal-3 и акумулацију у цитоплазми (Bartiste и сар, 2007). Узимајући у обзир, Gal-3 би могао проћи мембрану хепатоцита и стабилизovati митохондријалну мембрану, стога инхибирајући активацију каспазе и спречавајући апоптозу и оштећњ јетре.

На основу ових теорија, сматрамо да Gal-3 дјелује хепатопротективно код ESRD HCV⁺ пацијената на најмање два начина: путем инхибирања локалне инфламације и сљедујуће деструкције хепатоцита и путем умањивања апоптозе. Ови феномени се осликавају у ниском серумском нивоу AST и ALT и његовој корелацији између Galektina-3 и AST и ALT, датим редослиједом.

Испитиване серумске концентрације IL-33 и ST2 у све четири групе наших пацијената имале су приближно једнаке вриједности, с тим што су оба параметра имале нешто височије вриједности у HCV⁺+ХБИ групи и код пацијената у групи ХБИ. Пацијенти HCV⁺+ХБИ у односу на HCV⁺ групе испитаника имали су височије концентрације када је у питању однос ST2/IL-1, ST2/IL-4 као и однос ST2/IL-23.

Хуморални имунски одговор има значајну улогу у одбрани од HCV првенствено у акутној инфекцији гдје спречава настанак инфекције синтезом неутралишућих антитијела, али у хроничној инфекцији има мањи значај јер антитијела немају утицај на вирус који је већ ушао у ћелију. То може имати и штетан утицај због повећања продукције антитијела и стварања имунских комплекса што доводи до системског васкулитиса. Серолошки налаз анти HCV антитијела је значајан за дијагностику али нам не говори о активности вируса. НК ћелије могу бити извор и других цитокина нпр. IFN гама које боље могу утицати на стимулацију и других ћелија имунског система макрофага и дендритских ћелија да испоље своје ефекторске функције, као и на стимулацију СТ лимфоцита.

У зависности од стимулације активираних CD4 лимфоцита од стране цитокина продуктованих ћелијама урођене имуности и начина препознавања антигена. CD4 Т лимфоцити поларизују у правцу Th1, Th2, Th17 или Т регулаторних ћелија. Који од ових линија ће бити стимулирани тако ће се продуковати и одређени цитокини који ће усмјеравати имунски одговор у правцу целуларног или хуморалног, урођеног или стеченог.

NKG2D рецептори су смањени код ових пацијената. Предпоставља се да повећан ниво уремијских токсина (бета-2 микроглобулина и ROS, реактивни облици кисеоника) дјелују инхибиторно на стимулацију, изражавање ових рецептора. Доказано је да информациона RNK за синтезу NKG2D постоји, али да је проблем на нивоу транслације. Искључено је некадашње мишљење да то могу радити IL15 трансф. Фактор раста. Смањење NKG2D тј. Смањена активација NK ћелија доводи до повећања осјетљивости према инфекцијама и слабљењу имунског одговора.

Смањена пролиферација Т лимфоцита се приписује погоршаној функцији APC, зато што активација Т лимфоцита у великој мјери зависи од TLR, а уочено је слабије изражавање ових рецептора код ТБИ због дејства уремијских токсина. С обзиром да су пацијенти у ТБИ у једној генералној имуносупресији очекујемо да слабији имунски одговор не може ни елиминисати вирус, као и због смањене филтрације бубрега вирус се дуже задржава у организму док би сам поступак дијализе смањивао нивое вируса који би се враћали на почетне вредности у наредних 48 сати.

Многе студије су показале да ТБИ у старту има повећане вредности цитокина прије свега проинфламаторних али оне као такве нису доказ појачаног имунског одговора већ су последица смањене филтрације кроз бубреге и зато се дуже задржавају у циркулацији. Да би избјегли ове лажно позитивне резултате ми смо се фокусирали на односе системских вредности контрарегулаторних цитокина и поредили нпр. проинфламаторне: антиинфламаторне. Блажа инфекција се односи на мање оштећење јетре због смањења имунског одговора ако већ знамо да појачан имунски одговор у акутним инфекцијама доводећи до већег оштећења јетре, али то не значи да вирус нема склоност ка настанку обољења кардиовескуларног система и других екстрахепатичних промјена, јер и поред благог оштећења пацијенти имају повећану стопу смртности.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Циљ ове студије је била процјена озбиљности обољења код ESRD HCV⁺ пацијената. Анализирали смо серумски ниво AST, ALT, LDH, GGT као и серумске концентрације TNF, TGF- β , ST2, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-23 и IL-33, анти-HCV антителијела и Galektin-3. У складу са постављеним циљевима резултати ове студије су показали следеће:

1. HCV RNK је детектована у високом проценту испитиваних анти HCV позитивних пацијената, што указује на активност инфекције код ових пацијената.

2. Постоји позитивна корелација између генотипа и виремије, као и између виремије и количине антителијела, али не постоји између генотипа и количине антителијела.

3. Забележили смо да ESRD HCV⁺ пацијенти имају мање оштећену јетру на основу нижег серумског нивоа маркера AST, ALT и LDH. Такође показујемо да се серумски нивои проинфламаторних цитокина IL-1 β и IL-23, као и IL-4, не разликују међу дефинисаним групама. Ипак ниво, хепатопротективног IL-6 и IL6/IL-1 омјера био је виши у серуму ESRD HCV⁺ пацијената. Такође смо забележили повишени серумски ниво Galektina-3 и Gal-3/IL-1, Gal-3/IL-23 и Gal-3/IL-4 омјера и умјерену негативну корелацију између Galektina-3 и AST и између Galektina-3 и ALT.

4. Присуство повишених системских нивоа IL-6 и Gal-3 код ESRD HCV⁺ пацијената може бити покушај неутралисања или ограничавања текућих про-инфламаторних процеса и низводно регулише хроничне инфламације, што сугерише на нове аспекте HCV инфекције код ESRD пацијената.

5. Наша открића откривају потенцијалну хепатопротективну улогу за Galektin-3 током HCV инфекције код ESRD пацијената.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

ALT	аланин-аминотрансфераза
AST	аспарат-аминотрансфераза
BD	(Becton Dickinson Company –BD)
CTL	цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T Lymphocytes)
ДАА	(engl. direct acting antivirals)
DNA	(енгл. Deoxyribonucleicacid)
RBC	број еритроцита
EDTA	(етилен-диамино-тетрасирћетна киселина)
ELISA	(енгл. EnzymeLinkedImmunosorbentAssay)
ELFA	(енгл. Enzyme Linked Fluorescent Assay)
ESRD	фази бубрежна болест у завршној
eGFR	Estimated glomerlar fiktration rate
GCP	(енгл. GoodClinicallPractice).
GGT	гама-глутамилтрансфераза
GLDH	глутамат дехидрогеназе
HCV	Хепатитис С вирус
HCL	хлороводонична киселина
HVR	хиперваријабилни регион
IL	интерлеукин (енгл. Interleukins)
INR	(engl. International normalized ratio)
IFN-γ	интерферон гама(енгл. Interferon-gama)
IFN	интерферон (енгл. Interferon)
IkBa	инхибитор транскрипционог фактораNK- κ B- α (енгл. Nuclearfactorof kappalightpolypeptidegeneenhancerinB-cellsinhibitor,alpha)
ICSH	(Internacional Council for Standardiyation in Haematology).
iNKT	инваријантнеNKТхелије(енгл. InvariantnaturalkillerT)
IMCs	незрелемијелоиднећелије(енгл. Immaturemyeloidcells)
IFCC	(енгл. International Federation for Clinical Chemistry and laboratory Medicine)
KDIGO	(engl. Kidney Disease: Improving Global Outcomes)
LDH	лактат-дехидрогеназа
MHD	(engl. maintenance hemodialysis)
MUP	(енгл. Methyl-umbelliferyl fosfat)
NADH	никотин-амид динуклеотид
NF-κB	нуклеарнифакторраста(енгл. Nuclearfactorkappa-light-chain-enhancer of activatedBcells)

NGF	(енгл. Nervegrowth factor),
NK ћелије	урођенеубилачкећелије(енгл. NaturalKillerCells)
NKG2D	активационирецептор (енгл. NaturalKillerGroup 2, MemberD)
NKT	(енгл. NaturalkillerTcell)
NS	неструктурни протеин
NTR	(некодирajuћи региони)
ORF	(отворени оквир читанја)
PCR	(енгл. Polimerasis complex.....
PI	protease inhibitors
RNK	рибонуклеинскакиселина
ROS	(енгл. Reactive Oхуgen Species)
RT- PCR	(реверзна транскриптаза PCR)
RFV	референтна вредност
STAT	(енгл. SignalTransducerandActivationof transcription)
SPR	Solid Phase Receptacle
ТБИ	терминална бубрежна инсуфицијенција
TK	тимидин киназа
Th ћелије	помагачкиТлимфоцити (енгл. Thelpercells)
TLR	(енгл. Tolllikereceptor)
TIR	(енгл. Toll-IL-1рецептор)
Treg	регулаторни Тлимфоцити
TNF	факторнекрозетумора(енгл. Tumornecrosisfactor)
TGF-β	трансформишућифакторрастабета(енгл. Transforminggrowth factor beta)
TV	тест вредност
RFV	референтна вредност
WBC	број леукоцита

8. LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Seventh edition, Elsevier 2012;225-243.
2. Afdhal N, Reddy KR, Nelson DR, Lawitz E, Gordon SC, Schiff E, Nahass R, Ghalib R, Gitlin N, Herring R, Lalezari J, Younes ZH, Pockros PJ, Di Bisceglie AM, Arora S, Subramanian GM, Zhu Y, Dvory-Sobol H, Yang JC, Pang PS, Symonds WT, McHutchison JG, Muir AJ, Sulkowski M, Kwo P. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2014;370:1483-1493.
3. Agarwal SK, Dash SC, Gupta S, Pandey RM. Hepatitis C virus infection in haemodialysis: the 'no-isolation' policy should not be generalized. *Nephron Clin Pract.* 2009; 111:133-140.
4. Ahmad N, Gabius HJ, André S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R et al. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem.* 2004;279:10841-7.
5. Alavian SM. A shield against a monster: Hepatitis C in hemodialysis patients. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:641–646.
6. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13:2436-2441.
7. Ando M, Lundkvist I, Bergstrom J, Lindholm B: Enhanced scavenger receptor expression in monocyte-macrophages in dialysis patients. *Kidney Int.* 1996;49:773–780.
8. Ando M, Gafvels M, Bergstrom J, Lindholm B, Lundkvist I: Uremic serum enhances scavenger receptor expression and activity in the human monocytic cell line U937. *Kidney Int.* 1997;51:785–792.
9. Angelini C, Badalamenti S, Lunghi G, Sampietro M, Finazzi S, Ponticelli C, Graziani G. Evidence against hepatitis C virus trapping in dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:317–318.
10. Assy N, Minuk GY. Serum aspartate but not alanine aminotransferase levels help to predict the histological features of chronic hepatitis C viral infections in adults. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:1545-50.....
11. Azevedo HA, Villela-Nogueira CA, Perez RM, Segadas-Soares JA, Takahashi C, Gaburo N, Pessoa I, Coelho HS. Similar HCV viral load levels and genotype

-
- distribution among end-stage renal disease patients on hemodialysis and HCV-infected patients with normal renal function. *J Nephrol.* 2007;20:609–616.
12. Babaei M, Dashti N, Lamei N, Abdi K, Nazari F, Abbasian S, Gerayeshnejad S. Evaluation of plasma concentrations of homocysteine, IL-6, TNF-alpha, hs-CRP, and total antioxidant capacity in patients with end-stage renal failure. *Acta Med Iran.* 2014;52:893-898.
 13. Badalamenti S, Catania A, Lunghi G, Covini G, Bredi E, Brancaccio D, Salvadori M, Como G, Ponticelli C, Graziani G. Changes in viremia and circulating interferon- alpha during hemodialysis in hepatitis C virus-positive patients: only coincidental phenomena? *Am J Kidney Dis* 2003;42:143-150.
 14. Bantel H, Schulze-Osthoff K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ.* 2003; 10 Suppl 1:S48-58.
 15. Barril G, Castillo I, Arenas MD, Espinosa M, Garcia-Valdecasas J, Garcia-Fernández N, González-Parra E, Alcazar JM, Sánchez C, Diez-Baylón JC, et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:2288–2292.
 16. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11:482–496.
 17. Bartenschlager R, Cosset FL, Lohmann V. Hepatitis C virus replication cycle. *J. Hepatol.* 2010; 53:583–585.
 18. Baptiste TA, James A, Saria M, Ochieng J. Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: implications in the extracellular functions of the lectin. *Exp Cell Res.* 2007;313:652-664.....
 19. Betjes MG. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:255-265.
 20. Bianco A, Bova F, Nobile CG, Pileggi C, Pavia M. Healthcare workers and prevention of hepatitis C virus transmission: exploring knowledge, attitudes and evidence-based practices in hemodialysis units in Italy. *BMC Infect Dis.* 2013;13:76.
 21. Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevaliez S, Portal C, Razer A, Lefrère JJ, Pawlotsky JM, De Micco P, Laperche S. Improvement of hepatitis C virus(HCV) genotype determination with the new version of the INNO-LiPA HCV assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1140-1145.
 22. Božić M, Fabri M, Nožić D, Bojović K, Milošević I, Terapija hroničnog hepatitisa C : Peginterferon alfa – 2a(Pegasys) + Ribavirin (Copegus) – rani virusološki odgovor. *Acta infectologica Iugoslavica.* 2003;8:41-48.

23. Böhm F, Köhler UA, Speicher T, Werner S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med.* 2010;2:294-305.
24. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, et al. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun.* 2007; 75:5148-5157.
25. Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH, Miller RH, and The Copenhagen Dialysis HCV Study Group. High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. *J Infect Dis* 1993;168:1343-1348.
26. Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:706-713.
27. Carreño V, Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA. New perspectives in occult hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2012;18:2887–2894.
28. Carrere-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, Belouzard S, Penin F, Dubuisson J. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem* 2004; 279:41384-41392.
29. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hepatitis C virus transmission at an outpatient hemodialysis unit--New York, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58:189–194.
30. Chan C, Wang Y, Chow PK, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. Altered binding site selection of p53 transcription cassettes by hepatitis B virus X protein. *Mol Cell Biol.* 2013; 33:485-497.
31. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2003;7:89-105.
32. Chatenoud L, Dugas B, Beaurain G, Touam M, Drueke T, Vasquez A, Galanaud B et al. Presence of preactivated T cells in hemodialyzed patients: their possible role in altered immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:7457-7461
33. Chavaliez C. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:116-121.
34. Chen CC, Yang SY, Liu CJ, Lin CL, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Chen PJ, Chen CJ, Yu MW. Association of cytokine and DNA repair gene polymorphisms with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Epidemiol.* 2005; 34:1310-1318.

35. Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A et al. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature*. 2000; 407:916-920.
36. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:14496-501.
37. Chmielewski M, Bryl E, Marzec L, Aleksandrowicz E, Witkowski JM, Rutkowski B: Expression of scavenger receptor CD36 in chronic renal failure patients. *Artif Organs*. 2005;29:608–614.
38. Chonchol M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. *Semin Dial*. 2006;19:291-296.
39. Conry-Cantilena C. Hepatitis C virus diagnostics: Technology, clinical applications and impacts. *Trends Biotechnol*. 1997;15:71-76.
40. Cotler SJ, Diaz G, Gundlapalli S, Jakate S, Chawla A, Mital D, Jensik S, Jensen DM. Characteristics of hepatitis C in renal transplant candidates. *J Clin Gastroenterol*. 2002;35:191–195.
41. Courouce AM. Development of screening, confirmation tests for antibodies to hepatitis C virus. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*. 1998;62:64-75.
42. Covic A, Abramowicz D, Bruchfeld A, Leroux-Roels G, Samuel D, van Biesen W, Zoccali C, Zoulim F, Vanholder R. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) hepatitis C guidelines: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:719–727.
43. Da Silva NM, Germano FN, Mendoza-Sassi RA, Seuánez HN, Soares MA, de Martinez AM. Evidence of association between hepatitis C virus genotype 2b and nosocomial transmissions in hemodialysis centers from southern Brazil. *Virology*. 2013;29:10:167.
44. De Jesus Rodrigues de Freitas M, Fecury AA, de Almeida MK, Freitas AS, de Souza Guimarães V, da Silva AM, da Costa YF et al. Prevalence of hepatitis C virus infection and genotypes in patient with chronic kidney disease undergoing hemodialysis. *J Med Virol*. 2013;85:1741-17455.
45. Delarocque-Astagneau E, Baffoy N, Thiers V, Simon N, de Valk H, Laperche S, Couroucé AM, Astagneau P, Buisson C, Desenclos JC. Outbreak of hepatitis C virus infection in a hemodialysis unit: potential transmission by the hemodialysis machine. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002;23:328–334.

46. Delić D, Nikolić P, Božić M. Virusni hepatitisi, *Zavod za udžbenike i nastavna sredstva*. Beograd. 1998;148-183.
47. Delić D, Simonović J, Švrtlih N, Korać M, Urošević A, et al. Epidemiološke karakteristike hepatitis C infekcije u Srbiji, *Medicinska istraživanja*, 2008;(42) /sveska 2/
48. Descamps-Latcha, B. The immune system in end-stage renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1993;2:883-891.
49. Desmedt V, Desmedt S, Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Galectin-3 in Renal Pathology: More Than Just an Innocent Bystander. *Am J Nephrol.* 2016;43:305-317.
50. Deutsch M, Hadziyannis SJ, Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update. *J Viral Hepat.* 2008;15:2-11.
51. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:337-348.
52. Dunford L, Carr MJ, Dean J, Waters A, Nguyen LT, Ta Thi TH, Thi LA, Do HD, Thi TT, Nguyen HT, et al. Hepatitis C virus in Vietnam: high prevalence of infection in dialysis and multi-transfused patients involving diverse and novel virus variants. *PLoS One.* 2012;7:e41266.
53. El-Amin HH, Osman EM, Mekki MO, Abdelraheem MB, Ismail MO, Yousif ME, Abass AM, El-haj HS, Ammar HK. Hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Sudan: two centers' report. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2007;18:101–106.
54. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I. Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients. *Semin Dial* 2007;20:440-451.
55. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Leivaditis K, Antoniadi G, Stefanidis I. Infections in hemodialysis: a concise review. Part II: blood transmitted viral infections. *Hippokratia.* 2011;15:120-126.
56. European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;60:392–420.
57. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Brezina M, Cole MJ, Gerosa S, Vinson S, Mousa M, Gittnick G. Acquisition of hepatitis C virus in hemodialysis patients: a prospective study by branched DNA signal amplification assay. *Am J Kidney Dis* 1998;31:647-654.
58. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Brezina M, Cole MJ, Vinson S, Mousa M, Gitnick G. Biological dynamics of viral load in hemodialysis patients with hepatitis C virus. *Am J Kidney Dis.* 2000;35:122–129.

59. Fabrizi F, Lunghi G, Finazzi S, Colucci P, Pagano A, Ponticelli C, Locatelli F. Decreased serum aminotransferase activity in patients with chronic renal failure: impact on the detection of viral hepatitis. *Am J Kidney Dis.* 2001;38:1009-1015.
60. Fabrizi F, Martin P. Health care-associated transmission of hepatitis B and C viruses in hemodialysis units. *Clin Liver Dis* 2010;14:49-60.
61. Fabrizi F, Fred Poordad and Paul Martin. Hepatitis C Infection and the Patient With End-Stage Renal Disease. *Hepatology.* 2002;36:3-10.
62. Fernandez-Fresnedo G, Ramos MA, Gonzalez-Pardo MC, de Francisco AL, Lopez-Hoyos M, Arias M: B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15: 502–510.
63. Fuertes, M.B., Woo, S.R., Burnett, B., Fu, Y.X., and Gajewski, T.F. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol.* 2013;34:67–73....
64. Furusyo N, Hayashi J, Ariyama I, Sawayama Y, Etoh Y, Shigematsu M, Kashiwagi S. Maintenance hemodialysis decreases serum hepatitis C virus (HCV) RNA levels in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:490–496.
65. Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27 Suppl 2:89-93.
66. Gerlich WH, Thomsen R. Terminology, structure, and laboratory diagnosis of hepatitis viruses. In: McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzetto M, Rodes J, eds. *Oxford textbook of clinical hepatology.* Oxford UP, 1991:537.
67. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.* 2009;49:1335–1374.
68. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat.* 1999;6:35-47.
69. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, Hoegh AM, Bukh J. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: Role of CD81 and scavenger receptor class b type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* 2009;49:364-377.
70. Gupta E, Bajpai M, Aashish Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci.* 2014;8:19–25.
71. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114:597-605.

72. Hadziyannis SJ. Prognostic factors determining the outcome of treatment in chronic hepatitis C. *Acta Gastroenterol Belg.* 2000;63:207-209.
73. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:553-562.
74. Hayashi H, Okuda K, Yokosuka O, Kobayashi S, Yokozeki K, Ohtake Y, Irie Y. Adsorption of hepatitis C virus particles onto the dialyzer membrane. *Artif Organs.* 1997;21:1056–1059.
75. Haroun MK, Jaar BG, Hoffman SC, Comstock GW, Klag MJ, Coresh J. Risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2934-2941.
76. Hernandez MR, Galan AM, Cases A, Lopez-Pedret J, Pereira A, Tonda R, Bozzo J, Escolar G, Ordinas A: Biocompatibility of cellulosic and synthetic membranes assessed by leukocyte activation. *Am J Nephrol.* 2004;24: 235–241.
77. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Shimotohno K, Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;175:220-228.
78. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11:e0158765.
79. Honegger JR, Zhou Y, Walker CM. Will there be a vaccine to prevent HCV infection? *Semin Liver Dis* 2014;34:79-88.
80. Wang H, Tai AW. Mechanisms of Cellular Membrane Reorganization to Support Hepatitis C Virus Replication. *Viruses.* 2016;8:142.
81. Hoshida Y, Fuchs BC, Bardeesy N, Baumert TF, Chung RT. Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2014;61:S79-90.
82. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo Q.L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology.* 1991;14:381-388.
83. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015; 16:448-457.
84. Ishiguro S, Inoue M, Tanaka Y, Mizokami M, Iwasaki M, and Tsugane S. Impact of viral load of hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based cohort study (JPHC Study). *Cancer Lett.* 2011;300:173–179.

85. Jasuja S, Gupta AK, Choudhary R, Kher V, Agarwal DK, Misra A, Agarwal M, Sarin A, Mishra MK, Raina V. Prevalence and association of hepatitis C viremia in hemodialysis patients at a tertiary care hospital. *Indian J Nephrol* 2009;19:62-68.
86. Jawetz, Melnick, Adelberg's. *Medical Microbiology*. In: Geo FB, Karen, CC, Janet S. B, Stephen AM. 23rd Int. edition Pp.466-486 McGraw Hill publisher. 2004.....
87. Jesse Civan MD, Hie-Won Hann MD. Hepatitis C Virus Mediated Hepatocellular Carcinoma: A Focused Review for a Time of Changing Therapeutic Options. *N A J Med Sci*. 2014;7:8-16.
88. Joo M, Hahn Y.S, Kwon M, Sadikot R.T, Blackwell T.S, and Christman J.W. Hepatitis C virus core protein suppresses NF- κ B activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with IkappaB kinase beta. *J Virol*. 2005;79:7648–7657.....
89. Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol*. 2007;81:8374–8383.
90. Jovanović T, Marković Lj. *Virusologija, Medicinski fakultet*. Valjevo print, Beograd. 2008;264:943-949.
91. Kalantar-Zadeh K, Kilpatrick RD, McAllister CJ, Miller LG, Daar ES, Gjertson DW, Kopple JD, Greenland S. Hepatitis C virus and death risk in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1584–1593.
92. Karino Y, Toyota J, Ikeda K, Suzuki F, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hernandez D, Yu F, McPhee F, Kumada H. Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol*. 2013;58:646-654.
93. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med*. 2006;45:183-91.
94. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 2005;5:129–151.
95. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of immune Dysfunction in End-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:1526-1533.
96. Kaul V, FriedenberG FK, Braitman LE, Anis U, Zaeri N, Fazili J, Herrine SK, Rothstein HD. Development and validation of a model to diagnose cirrhosis in patients with hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:2623-2628.
97. Knerr K, Fu"th R, Hensen P, Mohne W, Heinig A, Keophas W, Scherbaum W A, and Martin S. Chronic inflammation and hemodialysis reduce immune competence

-
- peripheral blood leucocytes in end-stage renal failure patients. *Cytokine* 2005;30:132-138.
98. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2008;(109):S1–99.
 99. Kim KW, Chung BH, Jeon EJ, Kim BM, Choi BS, Park CW, Kim YS, Cho SG, Cho ML, Yang CW. B cell-associated immune profiles in patients with end-stage renal disease (ESRD) *Exp Mol Med.* 2012;44:465–472.
 100. Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, Peterson RA, Weihs KL, Alleyne S, Cruz I, Yanovski JA, Veis JH: Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1998;54: 236–244.
 101. Khan A.G, Whidby J, Miller M.T, Scarborough H, Zatorski A.V, Cygan A, Price AA, Yost SA, Bohannon CD, Jacob J, Grakoui A, Marcotigiano J. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature.* 2014;509:381–384.
 102. Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis.* 1999;19:157-169.
 103. Krane V, Wanner C. The metabolic burden of diabetes and dyslipidaemia in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 11:23-7.
 104. Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Boil.* 2009;510:33-53.
 105. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol. Infect* 2011;17:107–115.
 106. Lazarević I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. *WorldJ . Gastroenterol.* 2014;20:653-7664.
 107. Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, Schultz M, Davis MN, Kayali Z, Reddy KR, Jacobson IM, Kowdley KV, Nyberg L, Subramanian GM, Hyland RH, Arterburn S, Jiang D, McNally J, Brainard D, Symonds WT, McHutchison JG, Sheikh AM, Younossi Z, Gane EJ. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2013; 368:1878-1887.
 108. Lee M.H, Yang H.I, Lu S.N, Jen C.L, Yeh S.H, Liu C.J, Chen PJ, You SL, Wang LY, Chen WJ, Chen CJ. Hepatitis C virus seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: long-term predictors from a community-based cohort study. *J Clin Oncol.* 2010;28:4587–4593.
 109. Lenz O, Verbinnen T, Fevery B, Tambuyzer L, Vijgen L, Peeters M, Buelens A, Ceulemans H, Beumont M, Picchio G, De Meyer S. Virology analyses of HCV isolates
-

-
- from genotype 1-infected patients treated with simeprevir plus peginterferon/ribavirin in Phase IIb/III studies. *J Hepatol* 2015;62:1008-1014.
110. Li Cavoli G, Zagarrigo C, Schillaci O, Servillo F, Tralongo A, Coglitore M, Spadaro F, Scimeca C, Li Destri N, Rotolo U. Hepatitis C virus core antigen test in monitoring of dialysis patients. *Hepat Res Treat*. 2012;2012:832021.
111. Lim EJ, El Khobar K, Chin R, Earnest-Silveira L, Angus PW, Bock CT, Nachbur U, Silke J et Torresi J. Hepatitis C virus-induced hepatocyte cell death and protection by inhibition of apoptosis. *J Gen Virol*. 2014;95:2204-2215.
112. Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol*. 1994;68:5063-5073.
113. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005;436:933–938.
114. Liu M, Ding H, Zhao P, Qin ZL, Gao J, Cao MM, Luan J, Wu WB, Qi ZT: RNA interference effectively inhibits mRNA accumulation and protein expression of hepatitis C virus core and E2 genes in human cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70:2049-2055.
115. Liu ML, Xu G, Xue SR, Zhong XC, Chen GX, Chen ZJ. Plasma levels of Th1/Th2 type cytokine are associated with change of prolactin and GH/IGF-I in hemodialysis patients. *Int J Artif Organs*. 2008;31:303-8
116. Lohmann V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:167–198.
117. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380:2095-2128.
118. Luedde T. and Schwabe R.F. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8:108–118.
119. Marinaki S, Boletis JN, Sakellariou S, Delladetsima IK. Hepatitis C in hemodialysis patients. *World J Hepatol*. 2015;7:548–558.
120. Mc Lauchlan J. Propertis of hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000;7:2-14.
121. Meier V, Ramadori G. Hepatitis C virus virology and new treatment targets. *Expert Review Antiviral Infect Ther*. 2009;7:329-350.

122. Miyasaka Y, Enomoto N, Kurosaki M, Sakamoto N, Kanazawa N, Kohashi T, Ueda E, Maekawa S, Watanabe H, Izumi N, Sato C, Watanabe M. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits tumornecrosis factor-alpha-mediated apoptosis in Huh 7 cells. *J Infect Dis.* 2003;188:1537-1544.
123. Moini M, Ziyaeyan M, Aghaei S, Sagheb MM, Taghavi SA, Moeini M, Jamalidoust M, Hamidpour L. Hepatitis C virus (HCV) Infection Rate among Seronegative Hemodialysis Patients Screened by Two Methods; HCV Core Antigen and Polymerase Chain Reaction. *Hepat Mon.* 2013;13:e9147.
124. Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim HR. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis. *Am J Pathol.* 2001;159:1055-60.
125. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T et al. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 2001;61:4365-4370.
126. Moschen AR., Fritz T, Clouston AD, Rebhan I, Bauhofer O, Barrie HD et al. IL-32: A new proinflammatory cytokine involved in HCV-related liver inflammation and fibrosis. *Hepatology.* 2011;53:1819–1829
127. Nadarajah R, Khan GY, Miller SA, Brooks GF. Evaluation of a new-generation line-probe assay that detects 5' untranslated and core regions to genotype and subtype hepatitis C virus. *Am J Clin Pathol.* 2007;128:300-304.
128. Natov SN1, Pereira BJ. Hepatitis C virus in chronic dialysis patients. *Minerva Urol Nefrol.* 2005;57:175-197.
129. Naugler W.E, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy A.M, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 2007;317:121–124.
130. Nešković G, Jovanović-Ćupić S, Živković J, Spasojević-Tišma VD. Molekularna biologija hepatitis C virusa. *Acta infectologica Iugoslavica.* 2003;8:5-11.
131. Noiri E, Nakao A, Oya A, Fujita T, Kimura S. Hepatitis C virus in blood and dialysate in hemodialysis. *Am J Kidney Dis.* 2001;37:38–42.
132. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Fujimoto M, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol.* 2006;210:469-477.
133. Nožić D. Imunopatogeneza hronične hepatitis C virusne infekcije . *Acta infectologica Iugoslavica.* 2003;8:25-29.

134. Ojo A. Addressing the global burden of chronic kidney disease through clinical and translational research. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2014; 125:229-243.
135. Okuda K, Hayashi J, Yokozeki K, Irie Y. Destruction of hepatitis C virus particles by hemodialysis. *Lancet* 1996;347:909-910.
136. Okuda K, Hayashi H, Kobayashi S, Irie Y. Mode of hepatitis C infection not associated with blood transfusions among chronic hemodialysis patients. *J Hepatol* 1995;23:28-31.
137. Okuda K, Yokosuka O. Natural history of chronic hepatitis C in patients on hemodialysis: case control study with 4-23 years of follow-up. *World J Gastroenterol.* 2004;10:2209–2212.
138. Ozer Etik D, Ocal S, Boyacioglu AS. Hepatitis C infection in hemodialysis patients: A review. *World J Hepatol.* 2015;7:885-895.
139. Pahl MV, Gollapudi S, Sepassi L, Gollapudi P, Elahimehr R, Vaziri ND. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:205–212.
140. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, Stenvinkel P: Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.*2003;41:1212–1218.
141. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moadpour D et Pawlotsky JM. Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology* 2004;39:5-19.
142. Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N, Metivier F, Randoux C, Kossari N, Guérin A, Geffroy S, Delavaud G, Marin-Esteban V, Glotz D, Charron D, Toubert A.. Oxidative Stress Mediates a Reduced Expression of the Activating Receptor NKG2D in NK Cells from End-Stage Renal Disease Patients. *J Immunol* 2009;182:1696-1705.
143. Perez RM, Ferraz ML, Figueiredo MS, Contado D, Koide S, Ferreira AP, Cendoroglo Neto M, Medina Pestana JO, Silva AE. Unexpected distribution of hepatitis C virus genotypes in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. *J Med Virol* 2003;69:489-494.
144. Pesanti EL. Immunologic defects and vaccination in patients with chronic renal failure. *Infect Dis Clin North Am.*200;15:813-832.
145. Pikarsky E, Porat R.M, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004;431:461–466.
146. Pockros PJ, Reddy KR, Mantry PS, Cohen E, Bennett M, Sulkowski MS, Bernstein D, Podsadecki T, Cohen D, Shulman NS, Wang D, Khatri A, Abunimeh M, Lawitz E. L01:

-
- Safety of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir Plus Dasabuvir for Treating Hcv Gt1 Infection in Patients with Severe Renal Impairment or End- Stage Renal Disease: The Ruby-I Study. *J hepatol.* 2015; 62: S257-S257.
147. Pozzetto B, Memmi M, Garraud O, Roblin X, Berthelot P. Health care-associated hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2014;20:17265-17278.
148. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N et al. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28:451-462.
149. Rahnavardi M, Hosseini Moghaddam SM, Alavian SM. Hepatitis C in hemodialysis patients: current global magnitude, natural history, diagnostic difficulties, and preventive measures. *Am J Nephrol.* 2008;28:628–640.
150. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol.* 2009;50:1142–1154.
151. Rampino T, Arbustini E, Gregorini M, Guallini P, Libetta C, Maggio M, Ranghino A, Silini E, Soccio G, Dal Calton A . Hemodialysis prevents liver disease caused by hepatitis C virus: role of hepatocyte growth factor. *Kidney Int.* 1999; 56:2286-2291.
152. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;242:55-84.
153. Ringoir S. An update on uremic toxins. *Kidney Int Suppl.* 1997;62:S2-S4.
154. Rinonce HT, Yano Y, Utsumi T, Heriyanto DS, Anggorowati N, Widasari Di, Lusida MI, Soetjipo, Prasanto H, Hotta H, Hayashi Y. Hepatitis B and C virus infection among hemodialysis patients in Yogyakarta, Indonesia: Prevalence and molecular evidence for nosocomial transmission. *J Med Virol.* 2013;85:1348-1361.
155. Rosen HR. "Clinical practice. Chronic hepatitis C infection". *The New England Journal of Medicine.* 2011;364:2429–2438.
156. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Male P.J, Mentha G, Spahr L, Zarski JP, Borisch B, Hadengue A, Negro F. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol.* 2000;33:106–115.
157. Ruiz P, Gomez F and Schreiber A D. Impaired function of macrophage Fc receptor in end-stage renal disease. *N Engl J Med.* 1990;322:717-722.
158. Satomura A, Endo M, Ohi H, Sudo S, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M, Fujita T: Significant elevations in serum mannose-binding lectin levels in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 2002;92:702–704.
-

159. Satomura A, Endo M, Fujita T, Ohi H, Ohsawa I, Fuke Y, Matsumoto K, Sudo S, Matsushita M, Fujita T: Serum mannose-binding lectin levels in maintenance hemodialysis patients: impact on all-cause mortality. *Nephron Clin Pract.* 2006;102: 93–99.
160. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013;19:837–849.
161. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813:878-88.
162. Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung RT, Walker BD. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 2005;175:3603-3613.
163. Selcuk H, Kanbay M, Korkmaz M, Gur G, Akcay A, Arslan H, Ozdemir N, Yilmaz U, Boyacioglu S. Distribution of HCV genotypes in patients with end-stage renal disease according to type of dialysis treatment. *Dig Dis Sci* 2006;51:1420-1425.
164. Sester U, Sester M, Hauk M, Kaul H, Kohler H and Grindt M. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1217-1223.
165. Shapel H, Haeney M, Misbah S and Snowden N. *Essentials of Clinical immunology, Gastrointestinal and Liver Diseases.* WileyBlackwell. Sixtin edition. 2014; 281-282.
166. Shuklla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequence and sequence of individual gene products for the clasification of hepatitis C viruses. *Arch Virol* 1995;140:1747-1761.
167. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005;42:962-973.
168. Simmonds P, Holmes E. C, Cha T.-A, Chan S.-W, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap P. L, Kolberg J and Urdea M. S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol.* 1993;74:2391-2399.
169. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol.* 1994;75:1053-1061.
170. Simmonds P. Varibaility of hepatitis C virus. *Hepatology.* 1995;21:570-583.

171. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol* 2004;85:3173-3188.
172. Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel A.H, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 2007;3:e103.
173. Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filho R, Lindholm B: Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6? *Kidney Int Suppl.* 2002; 80:103–108.
174. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M: IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005;67: 1216–1233.
175. Sterling RK, Sanyal AJ, Luketic VA, Stravitz RT, King AL, Post AB, Mills AS, Contos MJ, Shiffman ML. Chronic hepatitis C infection in patients with end stage renal disease: characterization of liver histology and viral load in patients awaiting renal transplantation. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:3576–3582.
176. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2259-2266.
177. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1437-1448.
178. Sung WK, Zheng H, Li S, Chen R, Liu X, Li Y et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44:765-769.
179. Surendra Kumar P, Venu G, Mandhusudhana Rao A, Balakrishnan T, Sofia Rani A, Subba Rao TM. Prevalence and Risk Factors of Hepatitis C among Maintenance Hemodialysis Patients at a Tertiary-Care Hospital in Coimbatore, India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2011;5:725-728.
180. Sharma SD. Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res.* 2010;131:17-34.
181. Sypsa V, Psychogiou M, Katsoulidou A, Skoutelis G, Moutafis S, Hadjiconstantinou V, Kakavas J, Kalapothaki V, Boletis J, Hatzakis A. Incidence and patterns of hepatitis C virus seroconversion in a cohort of hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005;45:334–343.
182. Tacke R.S, Tosello-Trampont A, Nguyen V, Mullins D.W, Hahn Y.S. Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes

-
- /macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway. *J Biol Chem.* 2011;286:10847–10855.
183. Tanaka T, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Yagi S, Tanaka S, Hasegawa A, Ohta Y, Hattori N, Kohara M. Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virus. *Hepatology.* 1994;19:1347-1353.
184. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:836-847.
185. Teoh N, Field J, Farrell G. Interleukin-6 is a key mediator of the hepatoprotective and pro-proliferative effects of ischaemic preconditioning in mice. *J Hepatol.* 2006; 45:20-27.
186. Teoh NC, Farrell GC, Chan HL. Individualisation of antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25:1206-1216.
187. Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, et al. Flaviviridae. In Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV.* 2005;979-996.
188. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:15661-15668.
189. Thimme R, Chang KM, Pemberton J, Sette A, Chisari FV. Degenerate immunogenicity of an HLA-A2-restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51. *J Virol.* 2001;75:3984-3987.
190. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2003;77:68-76.
191. Tompkins WA. Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19:817-828.
192. Treitel M, Marbury T, Preston RA, Triantafyllou I, Feely W, O'Mara E, Kasserra C, Gupta S, Hughes EA. Single-dose pharmacokinetics of boceprevir in subjects with impaired hepatic or renal function. *Clin Pharmacokinet.* 2012;51:619–628.
193. Tseng, C.T. and Klimpel, G.R. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med.* 2002;195:43–49.
194. Tseng GY, Lin HJ, Fang CT, Cheng YT, Huang CH, Tseng GC, Wang PC, Hung TL, Deng YC, Tsai CC, Yang Ky. Hemodialysis reduces the viral load in uremic patients with chronic hepatitis B infection. *Ren Fail.* 2008; 30:1000-1005.

195. Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Yasuji A, Koida I, Saitoh S, Hashimoto M, Iwasaki S, Kobayashi M, Hiromitsu K. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1994;19:1088-1094.
196. Wasley A, Alter MJ, Epidemiology of Hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*. 2000;20:1-16.
197. Yu JC, Wang Y, He CL, Wang MR, Wang YM. Management of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *World J Hepatol*. 2014;6:419–425.
198. Ulu M, Alacacioglu A, Yuksel E, Pamukk BO, Bozkaya G, Ari A, Yuksel A, Sop G, Alacacioglu I. Prognostic significance of serum galectin-3 levels in patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. *Saudi J Gastroenterol*. 2015;21:47-50.
199. Vacher-Coponat H, Brunet C, Lyonnet L, Bonnet E, Loundou A, Sampol J, Moal V, Dussol B, Brunet P, Berland Y, Dignat-George F, Paul P. . Natural killer cell alterations correlate with loss of renal function and dialysis duration in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:1406-1414.
200. Vanholder R, Van Loo A, Dhondt A M, Glorieux G, De Smet R and Ringoar S. Second symposium on uraemic toxicity. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10:414-418.
201. Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr*. 2012;22:149-156.
202. Viguiier M, Advedissian T, Delacour D, Poirier F, Deshayes F. Galectins in epithelial functions. *Tissue Barriers*. 2014; 2:e29103.
203. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:223–235.
204. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:87–112.
205. Žerjav Sonja B. Virusološka dijagnostika hepatitisa C. *Acta infectologica Yugoslavica*. 2003;1:13-17.
206. Zopf S, Kremer AE, Neurath MF, Sieber J. Advances in hepatitis C therapy: What is the current state-what comes next? *World J hepatol* 2016;8:139-147.

9. ПРИЛОГ

9.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Редни број:
РБ

Идентификациони број:
ИБР

Тип документације: Монографска публикација
ТД

Типзаписа: Текстуални штампани материјал
ТЗ

Врста рада: Докторска дисертација
ВР

Аутор: Др Ружица В. Лукић
АУ

Ментор/коментор Проф. Др Иван П. Јовановић

Наслов рада: Хепатитис С вирусна инфекција и
антиимунски вирусно одговор код пацијената
са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом

Језик публикације: Српски (ћирилица)
ЈП

Абстракт:

АБ

Земља публикавања: Србија

ЗП

Уже географско подручје: Србија

УГП

Година: 2014.

ГО

Издавач: Ауторски репринт

ИЗ

Место и адреса: 34000 Крагујевац, Србија

МС

Светозара Марковића 69

Физички опис рада: Дисертација има 183 страна,

ФО

7 поглавља, 4 слике, 19 графикана,

29 табела и 386 референци

Научна област:

Медицина

Научна дисциплина: Имунологија, инфекција и инфламација

ДИ

Предметна одредница/кључне речи: хепатитис С вирусна инфекција, хемодијализа, цитокини, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-33, IFN- γ и TNF- α

УДК:

Чува се:

ЧУ

У Библиотеци Факултета

Медицинских наука

у Крагујевцу

34000 Крагујевац Србија,

Светозара Марковића 69

Важна напомена:

МН

Извод:

ИД

Датумприхватањатемене одстране ННВ:

ДП

Датумодбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

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

Ментор: Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

Члан: Проф.др Маја Ђупић, редовни професор за уже научне области Микробиологија са паразитологијом, Медицински факултет, универзитета у Београду

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

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

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

9.2. KEYWORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Dr Ruzica V. Lukic

Menthor/co-mentor:

MN

Doc. dr Ivan P. Jovanovic

Title:

TI

Language of text:

LT

Serbian (Cyrillic)

Language of abstract:

Serbian/English

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication: Serbia
LP

Publication year: 2014.
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Serbia
PP Svetozara Markovica 69

Physical description: Thesis contains 183 pages, 7 chapters,
PD 4 pictures, 19 graphs, 29 tables
and 386 citations

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Immunology, infection et inflammation
SD

Subject/key words: HCV infection, haemodialysis,
cytokines, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-33,
IFN- γ и TNF- α

SKW

UDC

Holdings data: Library of Medical faculty Kragujevac
34000 Kragujevac, Serbia
Svetozara Markovica 69

Note:
N

Accepted by the Scientific Board on:

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

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

Mentor: **Prof. dr Ivan Jovanović**, Associate professor of Microbiology and Immunology, Basic of Oncology Faculty of Medicine, University of Kragujevac

Member: **Prof. dr Maja Ćupić**, Professor of Microbiology and parasitology, Faculty of Medicine, University of Belgrade

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

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

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

9.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

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

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

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

Biography

9.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Lukic R.**, Lukovic B., Gajovic N., Prljic S., Đukic S. Mechanism of intracellular chlamydiae survival. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2016;17(1):1-1
2. Ćuk M, Gajanin R, Đuričić S, Kulić M, Račić M, Marić R, Marić H, Lalović N, **Lukić R**, Kovačević M, Vasiljević M. Concordance of the results of detection of HER2 amplification in gastric adenocarcinoma using CISH and FISH methods. Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin Virchows Archive 2015;467(1):126
3. Ćuk M, Gajanin R, Kulić M, Marić R, Račić M, Marić V, Lalović N, **Lukić R**, Kovačević M, Vasiljević M, Đukić N. Prognostic impact of HER2 and EGFR status on overall survival of advanced gastric cancer patients. Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin Virchows Archive 2015;(1):126
4. Ćuk M, Gajanin R, Kulić M, Račić M, Marić R, Marić V, Lalović N, Kovačević M, Vasiljević M, **Lukić R**. Tumor budding in the intestinal-type adenocarcinoma of the stomach: Prognostic significance. Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin Virchows Archive 2015;467(1):130
5. **Ruzica Lukic¹**, Nevena Gajovic², Ivan Jovanovic², Milena Jurisevic², Zeljko Mijailovic³, Veljko Maric⁴, Predrag Canovic³, Nebojsa Arsenijevic². Potential hepatoprotective role of Galectin-3 during HCV infection in end stage renal disease patients. IN PRES
- 6.

Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја

1.?????????

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу

1. Ivanović T, Milinković M, Ivanović D, Cicmil A, Janković S, Davidović B, **Lukić R**. Učestalost sagitalnih nepravilnosti kod osmogodišnjaka. XXXI Simpozijum zdravstvenog vaspitanja u stomatologiji. Zrenjanin 19-20 juna 2015
2. Давидовић Б, Јанковић С, Ивановић М, Боковић Д, Ерић Ј, **Лукић Р**, Антић Ј, Станојевић М, Ивановић Т, Радовић И. Присуство страха код дјецe у стоматолошкој амбуланти. XXXI Симпозијум здравственог васпитања у

стоматологији. Стоматолошки Гласник Србије. (IN PRESS) (Зрењанин, 19. јун 2015.)

3. Радовић И, Давидовић Б, Јанковић С, Давидовић Л, **Лукић Р**, Давидовић В. Утицај урбанизације на стање зуба и орално здравствену просвијећеност код петнаестогодишњака у Републици Српској. XXXI Симпозијум здравственог васпитања у стоматологији. Стоматолошки Гласник Србије. (IN PRESS)(Зрењанин, 19. јун 2015.)
4. Давидовић Б, Ивановић М, Антић Ј, Дмитрук И, Радовић И, Давидовић Б, **Лукић Р**. Орално-хигијенске навике дјете са астмом. Стоматолошки Гласник Србије(IN PRESS) (Јагодина, 24-25. јун 2016.)

8.5.THELIST OF PUBLISHED PAPERS

Thepublished paperinextenso ininternationaljournals

- 1 . **Lukic R.**, Lukovic B., Gajovic N., Prljic S., Đukic S. Mechanism of intracellular chlamydiae survival. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2016;17(1):1-1
1. Ћук М, Gajanin R, Đuričić S, Kulić M, Račić M, Marić R, Marić H, Lalović N, **Lukić R**, Kovačević M, Vasiljević M. Concordance of the results of detection of HER2 amplification in gastric adenocarcinoma using CISH and FISH methods. Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin Virchows Archive 2015;467(1):126
2. Ћук М, Gajanin R, Kulić M, Marić R, Račić M, Marić V, Lalović N, **Lukić R**, Kovačević M, Vasiljević M. Đukić N. Prognostic impact of HER2 and EGFR status on overall survival of advanced gastric cancer patients. Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin Virchows Archive 2015;(1):126
3. Ћук М, Gajanin R, Kulić M, Račić M, Marić R, Marić V, Lalović N, Kovačević M, Vasiljević M. **Lukić R**. Tumor budding in the intestinal-type adenocarcinoma of the stomach: Prognostic significance. Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin Virchows Archive 2015;467(1):130

Thepublished paperinextenso innationaljournals

- 1.

The national congress presentations published as abstracts

1.

9.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. Аутор	
Имеи презиме: Ружица Лукић	
Датуми месторођења: 25.02.1976. године, Фоча, Босна и Херцеговина	
Садашње запослење: Специјалиста микробиологија са паразитологијом, субспецијалиста вирусолог, Центар за лабораторијску дијагностику одсјек за микробиологију, Универзитетска болница у Фочи, Асистент на катедри за микробиологију и имунологију, Медицински факултет у Фочи Универзитета у И.Сарајеву	
II. Докторска дисертација	
Наслов: Хепатитис С вирусна инфекција и антиимунски вирусни одговор код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом	
Број страница:	
Број слика:	
Број библиографских података:	
Установа и место где је рад израђен: Центар за лабораторијску дијагностику служба за микробиологију Универзитетске болнице у Фочи Факултет Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Центар за	
Научна област (УДК): Имунологија, инфекција и инфламација	
Ментор: Доц. Др Иван П. Јовановић	
III. Оцена и обрана	
Датум пријаве теме: .2016. године	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: .2016 године	
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Доц. Др Иван Јовановић, доцент за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, председник 2. Доц. Др Гордана Радосављевић, доцент за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, члан 3. 	

Комисија за оцену докторске дисертације:

1. Проф. Др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Доц. Др Гордана Радосављевић, доцент за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, члан
- 3.

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. Др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. Др Маја Ћупић, професор за ужу научну област Микробиологија са паразитологијом, Медицински факултет, Универзитета у Београду, члан
3. Проф. др Жељко Мијаиловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан
4. Проф. др Дејан Петровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан
5. Доц. Др Гордана Радосављевић, доцент за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, члан

Датум одбране дисертације: . године

Изјава о ауторству

ОБРАЗАЦ 1.

Потписана -----

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

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

Потписаутора

У Крагујевцу, _____

др Ружица Лукић

**ОБРАЗ
АЦ 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора — Руђица Лукић —

Број уписа _____

Студијски програм: Имунологија, инфекција и инфламација

Наслов рада _____

Ментор: Доц. др Иван Јовановић

Потписани _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу**.

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

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, _____

_____ др Руђица Лукић _____

