

# Stanična imunost tijekom liječenja kroničnog hepatitisa C

---

Kurelac, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2012

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:229689>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Kurelac, Ivan (2012) *Stanična imunost tijekom liječenja kroničnog hepatitisa C [Cellular immune response during therapy of chronic HCV virus infection]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1807>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Ivan Kurelac**

**Stanična imunost tijekom liječenja  
kroničnog hepatitisa C**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena u Klinici za infektivne bolesti “ Dr. Fran Mihaljević”  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Adrijana Vince

Zahvaljujem se prvenstveno mojem mentoru prof. dr. sc. Adriani Vince na ustrajnosti i savjetima prilikom realizacije ovog rada.

Zahvaljujem se i dr. sc. Snježani Židovec Lepej, u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i celularnu imunost Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu, i njenim suradnicima.

Zahvalan sam i prof. dr. sc. Bruni Baršiću na statističkoj obradi rezultata.

Na kraju, zahvaljujem se i svim osobama u Klinici za infektivne bolesti u Zagrebu koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada.

# SADRŽAJ

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. Uvod</b>                                                                                                                                       | 1  |
| 1.1. Prirodni tijek bolesti                                                                                                                          | 1  |
| 1.2. Imunoreakcija na HCV                                                                                                                            | 3  |
| 1.3. Imunološki odgovor u akutnoj HCV infekciji                                                                                                      | 5  |
| 1.3.1. Urođena imunost                                                                                                                               | 5  |
| 1.3.2. Stečeni imunološki odgovor                                                                                                                    | 6  |
| 1.4. Prelazak HCV infekcije u kronicitet                                                                                                             | 9  |
| 1.4.1 Imunološki bijeg                                                                                                                               | 9  |
| 1.4.2. Iscrpljenost imunološkog odgovora/anergija                                                                                                    | 10 |
| 1.4.3. Brzina virusne replikacije i stvaranje mutanti                                                                                                | 10 |
| 1.4.4. T regulatorne stanice                                                                                                                         | 11 |
| 1.5. Imunološki odgovor u toku antivirusne terapije                                                                                                  | 12 |
| 1.6. Kemokini u HCV infekciji                                                                                                                        | 13 |
| <b>2. Obrazloženje teme</b>                                                                                                                          | 21 |
| 2.1. Hipoteze                                                                                                                                        | 21 |
| 2.2. Specifični ciljevi istraživanja                                                                                                                 | 21 |
| 2.3. Očekivani znanstveni doprinos                                                                                                                   | 21 |
| <b>3. Materijali i metode istraživanja</b>                                                                                                           | 22 |
| 3.1. Plan istraživanja                                                                                                                               | 22 |
| 3.2. Ispitanici                                                                                                                                      | 23 |
| 3.3. Metode                                                                                                                                          | 24 |
| 3.3.1. Terapijski protokol                                                                                                                           | 24 |
| 3.3.2. Kontrolni pregled i biološki uzorci                                                                                                           | 25 |
| 3.3.3. Eksperimentalne metode                                                                                                                        | 26 |
| 3.3.4. Reagensi                                                                                                                                      | 27 |
| 3.3.5. Aparaturne pretrage                                                                                                                           | 28 |
| 3.3.6. Patohistološka analiza                                                                                                                        | 28 |
| 3.4. Analiza rezultata i statistička obrada                                                                                                          | 30 |
| <b>4. Rezultati</b>                                                                                                                                  | 31 |
| 4.1. Bazične karakteristike bolesnika uključenih u studiju                                                                                           | 31 |
| 4.2. Virusološki odgovor u liječenih bolesnika                                                                                                       | 34 |
| 4.3. Povezanost koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 sa dobi, visinom HCV viremije, HAI indeksom                                            | 38 |
| 4.4. Koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u odnosu na SVR ili non-SVR                                                                       | 43 |
| 4.5. Profil kretanja koncentracija CXCL9, CXCL10 i CXCL10 u toku terapije kronične HCV infekcije pegiliranim interferonom i ribavirinom              | 45 |
| 4.6. Multivarijatna analiza parametara povezanih s koncentracijom kemokina CXCL9 i CXCL10, na ishod liječenja pegiliranim interferonom i ribavirinom | 47 |
| 4.7. Stratifikacija vrijednosti kemokina sa stanovišta brzog (RVR) i ranog (EVR) odgovora                                                            | 49 |
| 4.8. Koncentracije kemokina u odnosu na stadij fibroze                                                                                               | 54 |
| 4.9. Frekvencije HCV NS specifičnih CD8+ limfocita prije i za vrijeme terapije HCV infekcije                                                         | 56 |

|                                             |           |
|---------------------------------------------|-----------|
| <b>5. Rasprava</b>                          | <b>59</b> |
| <b>6. Zaključci</b>                         | <b>66</b> |
| <b>7. Sažetak</b>                           | <b>68</b> |
| <b>8. Summary</b>                           | <b>70</b> |
| <b>9. Literatura</b>                        | <b>72</b> |
| <b>10. Životopis</b>                        | <b>82</b> |
| <b>11. Popis slika, tablica i grafikona</b> | <b>87</b> |

## POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA

|            |                                                                                              |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| ALT        | alanin aminotransferaza                                                                      |
| Anti-HCV   | protutijela na HCV                                                                           |
| APC        | antigen prezentirajuća stanica                                                               |
| AST        | aspartat aminotransferaza                                                                    |
| AUC        | engl. area under the curve                                                                   |
| CCR        | grupa kemokinskih receptora                                                                  |
| CCRdelta32 | mutacija na CCR kemokinskom receptoru                                                        |
| CD4        | engl. cluster of differentiation4, glikoprotein na povišeni T pomoćničkih stanica            |
| CD8        | engl. cluster of differentiation 8, glikoprotein na povišini citotoksičnih T ly i NK stanica |
| CD30       | membranski protein, TNF receptor                                                             |
| CINGVCWTV  | specifični peptid NS3 proteina HCV                                                           |
| Core       | jezgra                                                                                       |
| CTL        | citotoksični T limfocit                                                                      |
| CXCR       | grupa kemokinskih receptora                                                                  |
| CXCL9      | kemokin ( MIG)                                                                               |
| CXCL10     | kemokin (IP-10)                                                                              |
| CXCL11     | kemokin (I-TAC)                                                                              |
| DAA        | direktni antivirusni lijekovi u liječenju HCV infekcije                                      |
| DC         | dendritičke stanice                                                                          |
| DC2        | plazmacitoidne dendritičke stanice                                                           |
| d.f.       | stupnjevi slobode                                                                            |
| E          | eng. envelope                                                                                |
| ETVR       | virusološki odgovor na kraju liječenja (eng. end of treatment viral response)                |
| EVR        | virusološki odgovor nakon 12 tjedana liječenja                                               |
| F          | fibroza (po Knodell Ishakom indeksu)                                                         |
| HAI index  | eng. hepatitis activity index, patohistološki indeks upalne aktivnosti po Knodel-Ischaku     |
| HCV RNA    | ribonukleinska kiselina HCV virusa                                                           |
| HCV        | virus hepatitisa C                                                                           |
| IL         | interleukin                                                                                  |
| IL-28B     | interleukin 28B                                                                              |
| INF        | interferon                                                                                   |
| IPS-1      | mitohondrijski antivirusni signalizirajući protein                                           |
| IRF3       | engl.interferon regulatory factor3                                                           |
| IRES       | engl. internal ribosome entry site                                                           |
| ISG        | interferonom stimulirani geni                                                                |
| IU/ml      | internacionalne jedinice po mililitru                                                        |
| ISGF3      | interferon regulatory factor 9 (IRF9), aktivator transkripcije                               |
| Jak        | janus kinaza                                                                                 |
| Kg         | kilogram                                                                                     |
| K3EDTA     | antikoagulant, poliamino karboksilna kiselina                                                |
| KHC        | kronični hepatitis C                                                                         |
| Mcg        | mikrogram                                                                                    |
| MCP-1      | monocyte kemoatraktant protein-1                                                             |
| mg         | miligram                                                                                     |
| MF         | makrofag                                                                                     |
| MHC        | engl. major histocompatibility complex                                                       |



|           |                                                                                                            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MIP-1alfa | engl. macrophage inflammatory protein                                                                      |
| MU        | milioni jedinica                                                                                           |
| N         | neutrofili                                                                                                 |
| NK        | Engl. natural killer limfocit, tip citotoksičnog limfocita                                                 |
| NKT       | Engl. natural killer T limfocit                                                                            |
| NPP       | negativna prediktivna vrijednost                                                                           |
| Non-EVR   | odustvo ranog odgovora na terapiju pegiliranim interferonom i ribavirinom (12tj)                           |
| Non-ETVRT | odustvo odgovora na završetku terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom                              |
| Non-RVR   | odustvo brzog odgovora na terapiju pegiliranim interferonom i ribavirinom (4tj)                            |
| Non-SVR   | odustvo trajnog odgovora na terapiju, neuspjeh terapije nakon 24 tj od završetka th.                       |
| NS        | nestrukturalni protein HCV virusa                                                                          |
| OAS       | oligoadenilat sintetaza                                                                                    |
| OR        | engl.odds ratio                                                                                            |
| ORF       | engl. open reading frame                                                                                   |
| p         | razina statističke značajnosti                                                                             |
| p.p.      | portalni prostor                                                                                           |
| PCR       | lančana reakcija polimerazom                                                                               |
| PD-1      | engl. programmed death 1, membranski protein                                                               |
| PEG       | polietilen glicol                                                                                          |
| PEG INF   | pegilirani interferon alfa2                                                                                |
| PPV       | pozitivna prediktivna vrijednost                                                                           |
| PKR       | protein kinaza R                                                                                           |
| Rib       | ribavirin                                                                                                  |
| RIG-I     | receptor za nukleinske kiseline virusa koji trigerira imuni odgovor                                        |
| RNA       | ribonukleinska kiselina                                                                                    |
| ROC curve | engl. reciver operating characteristics curve                                                              |
| RVR       | virusološki odgovor nakon 4 tjedna terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom                         |
| s.c.      | subkutano                                                                                                  |
| SD        | standardna devijacija                                                                                      |
| SOCS-3    | supresor citokinske signalizacije                                                                          |
| STAT      | engl. signal transducer and activator of transcription (signalni put jak-stat)                             |
| SVR       | trajni odgovor, virusološki odgovor 6 mjeseci nakon završetka liječenja (engl. sustained viral respononse) |
| TBK       | engl. TANK binding kinase                                                                                  |
| Th 1      | profil kemokinske sekrecije 1                                                                              |
| Th 2      | profil kemokinske sekrecije 2                                                                              |
| TGF beta  | engl.transforming growth factor beta                                                                       |
| TNF alfa  | engl. tumor necrosis factor alfa                                                                           |
| TLR       | engl.tool like receptors                                                                                   |
| TRIF      | engl. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β                                                  |
| XCR       | grupa kemokinskih receptora                                                                                |
| %         | postotak                                                                                                   |
| <         | manje                                                                                                      |
| >         | više                                                                                                       |

## **1. UVOD**

Hepatitis C virusna infekcija i s njom povezane bolesti jetre predstavljaju vrlo značajan javnozdravstveni problem s više od 170 milijuna oboljelih u svijetu (1). Potpunije poznavanje imunologije kronične HCV infekcije, razvoj novih antivirusnih lijekova te individualiziranje terapije na osnovi boljeg poznavanja prediktora virusnog odgovora, bitne su točke na putu za izlječenje čim većeg broja bolesnika i sprečavanja komplikacija bolesti. T stanični odgovor na HCV infekciju posredovan djelovanjem kemokina atraktivna je tema kako u razumijevanju prediktora perzistiranja infekcije tako i kod terapijskih razmišljanja.

### **1.1. Prirodni tijek bolesti**

Prirodni tijek bolesti je dihotoman. Hepatitis C virus (HCV) dovodi do perzistentne infekcije i uzrokuje kroničnu bolest jetre u većine inficiranih bolesnika (2). Nakon akutne faze koja je obično subklinička spontana rezolucija HCV infekcije događa se u samo 20 do 30% oboljelih (3).

Snažan HCV specifični CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T stanični odgovor usmjeren na multiple HCV epitope potreban je za spontanu eliminaciju virusa u akutnoj fazi, ali virus posjeduje različite mogućnosti da izbjegne obrambene mehanizme domaćina i da bolest progredira u kronični hepatitis (4).

Kao posljedica kronične upale čiji je rezultat stalno prisutan proces inflamacije, regeneracije i fibroze u mnogim slučajevima konačno dolazi do razvoja ciroze i hepatocelularnog karcinoma. Smatra se da će 20% kronično HCV inficiranih bolesnika razviti cirozu jetre u periodu od 20 godina nakon infekcije (5). U 1 do 3 % bolesnika s cirozom godišnje razviti će se hepatocelularni karcinom (6). Brzina razvoja ciroze doduše vrlo je varijabilna i ovisi o faktorima domaćina i virusa, kao što su dob, tjelesna težina, druge konkomitantne bolesti.

S druge strane značajan dio bolesnika s HCV infekcijom koji ne uspijeva eradicirati virus ima blagu bolest sa vrlo sporom progresijom i bez razvoja teških sekvela. Stoga je od vitalnog interesa proučavanje zbivanja iz celularne imunosti domaćina koja može biti odgovorna za tako različit ishod bolesti.

Podaci o imunološkom odgovoru tokom kronične faze infekcije kojima

raspoložemo nisu potpuni. I dok s jedne strane svjedočimo izrazito ubrzanom toku kroničnog hepatitisa kod imunosuprimiranih bolesnika, npr bolesnika s HIV infekcijom, istraživanja ukazuju da je baš perpetuiranje jakog, ali prema HCV antigenima nespecifičnog staničnog odgovora preduvjet razvoja visokog stupnja histološke aktivnosti i fibroze.

Tip i opseg imunološkog odgovora generiran antigenim stimulusom određen je kompleksnom mrežom interakcija između jetrenih antigen prezentirajućih stanica, limfocita unutar jetre i imunih stanica koje bivaju privučene u jetru (7). Pojednostavljena mjerenja kvantiteta upalne reakcije ne pokazuju dobru korelaciju s ishodom bolesti jer zanemaruju ulogu HCV specifičnih staničnih odgovora unutar jetrenog parenhima, a oni su bitni u rezoluciji infekcije uz minimaliziranje štete na okolnim stanicama (8).

Recentne publikacije pokazuju značaj kemokina i njihovih receptora kao ključnih faktora za privlačenje leukocita u područje infekcije, kretanje leukocita iz sinusoidalnih prostora prema hepatocitima, te njihovu povezanost s procesom regeneracije, fibroze i maligne transformacije (9,10,11,12,13).

Klasične citotoksične T stanice (CTL) mogu primarno oštetiti jetru u kroničnoj HCV infekciji, ali neke subpopulacije tih stanica mogu imati protektivnu ulogu (14).

CD4+ T stanični odgovor ima protektivni učinak na jetrenu leziju i mogao bi biti značajan za eliminaciju virusa tokom terapije bazirane na pegiliranom interferonu i ribavirinu. Daljnja istraživanja imunološkog odgovora u toku terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom, mogla bi ukazati na moguće razlike između osoba s dobrim i lošim odgovorom. To bi moglo otvoriti nova mjesta za potencijalne terapijske intervencije, u smislu blokade ili stimulacije određenih stepenica imunološkog odgovora (14).

Terapija pegiliranim interferonom i ribavirinom u trajanju od 24 do 48 tjedana ovisno o genotipu virusa i viremiji sadašnji je standard u terapiji kronične HCV infekcije.

Trajni virološki odgovor (sustained viral response, SVR) definira se odsutnošću virusa u krvi 6 mjeseci nakon završetka terapije i on iznosi oko 50% za genotip 1 te 80% za genotip 2 i 3.

Brzi virusni odgovor (rapid viral response, RVR) određuje se nakon 4 tjedna terapije i može biti prediktor potrebnog trajanja terapije.

Uspjeh terapije ocjenjuje se potom nakon 12 tjedana terapije. Pad HCV viremije za bar dva logaritma od početnih vrijednosti smatra se uspješnim ranim odgovorom (early viral response, EVR).

Zatim se prati pad viremije na kraju terapije tj nakon 48 tjedana (ETR=End treatment response), te nakon 6 mjeseci od prekida terapije (SVR= Sustained viral response) Unatoč provođenju liječenja pegiliranim interferonom i ribavirinom samo 42 do 52% s HCV genotipom 1 ima trajno povoljan odgovor odnosno eliminaciju virusa (15,16,17).

Opisani su brojni faktori vezani za virus (visina viremije, genotip, razvoj virusnih kvazispecijesa), domaćina (dob, spol, stadij fibroze, imunološki status, adipozitet, metabolički sindrom) i utjecaj okoline (alkohol, koinfekcija s HBV i HIV, lijekovi) koji utječu na ishod terapije. Rana virusna kinetika odnosno brzi pad viremije na početku terapije pokazao se dobar prognostički pokazatelj uspjeha liječenja, što se često koristi u odluci o nastavljaju ili prekidu liječenja (18).

Ipak je nedovoljno jasno zašto jedna grupa liječenih bolesnika ima dobar odgovor na terapiju, a druga nema. Faktori domaćina kao što su dob i stadij fibroze vrlo su predikivni za ishod liječenja, no samo su indirektni pokazatelji zbivanja u celularnom imunitetu koji ima ključnu ulogu u rješavanju infekcije ili njenom daljnjem perzistiranju (19).

Istraživanja imunološkog odgovora u toku antivirusne terapije otežava potreba analize zbivanja unutar jetrenog parenhima bolesnika u toku terapije i slablja dostupnost animalnih eksperimentalnih modela za takvo praćenje.

## **1.2. Imunoreakcija na HCV**

HCV je RNA virus koji pripada u hepaciviruse unutar obitelji Flaviviridae (20). Unutar te obitelji nalazi se još i virus žute groznice koji također uzrokuje hepatitis, ali nikad kroničnu infekciju. HCV je hepatotropan virus koji uzrokuje progresivno oštećenje jetre, a inficira samo ljude i čimpanze. HCV ima šest genotipova i više od 50 subtipova (21).

Virus HCV ima jednolančanu RNA sa genomom od 9600 nukleotida. ORF sadrži zapis za poliprotein od 3000 aminokiselina koji se procesira u bar deset

proteina; 3 strukturalna proteina su core (koji tvori virusnu nukleokapsidu) i E1 i E2 glikoproteini ovojnice. Sedam je nestrukturalnih proteina (NS) koji imaju bitnu funkciju u replikaciji virusa. NS3 sadrži proteaze, RNA helikaze, nukleozide i trifosfataze koje su bitne za replikaciju virusa dok NS5 predstavlja RNA polimerazu koja je bitni enzim za transkripciju i replikaciju virusa (22,23,24). Stoga je inhibicija NS3 i NS5 funkcije ciljno mjesto potencijalnih antivirusnih terapija.

HCV virus replicira se prvenstveno unutar hepatocita, a može inficirati i B limfocite, dentritičke stanice (DC), i ostale periferne mononuklearne stanice. Vezanje za B stanice može potaknuti klonulanu proliferaciju povezanu s krioglobulinemijom (25,26).

Nakon ekspozicije HCV virusu imunološke stanice sakupljaju se u jetri u pokušaju kontrole virusne replikacije, pa ipak u većini slučajeva uspostavlja se kronična infekcija. U ovoj fazi imunološki odgovori imaju istovremeno i koristan i štetan učinak na domaćina. Snažno antivirusno djelovanje svakako je potrebno u kontroli infekcije što se vidi po egzacerbaciji toka hepatitisa C u osoba koje primaju imunosupresivne ili citotoksične lijekove, ili u osoba imunosuprimiranih HIV infekcijom. S druge strane imunološke stanice okupljene u jetri mogu doprinjeti razvoju nekroinflatornog oštećenja i progresije prema fibrozi (13,27). Kao odgovor na kontinuiranu upalu u jetri se odigravaju procesi remodeliranja, proliferacije hepatocita i žučnih vodova i stvaranja fibrotičkih septi. Posljedica je razaranje normalne arhitekture jetre uz pogoršanje fiziološkog toka krvi kroz jetru, te uz razvoj njene metaboličke i imunološke disfunkcije.

Epidemiološka su istraživanja pokazala da više od 80% osoba s akutnom HCV infekcijom ne uspijeva eradicirati virus što dovodi do uspostavljanja kronične infekcije (28,29). Efektorski mehanizmi urođene i stečene (celularne i humoralne) imunosti imaju važnu ulogu u eliminaciji odnosno perzistenciji HCV-a te značajno pridonose opsegu oštećenja jetre u smislu kolateralne štete (30). Razvoj tehnike MHC-multimera omogućio nam je, po prvi puta, direktnu ex vivo kvantifikaciju kao i fenotipsku i funkcionalnu analizu antigen-specifičnih limfocita u HCV-om zaraženih osoba.

### **1.3. Imunološki odgovor u akutnoj HCV infekciji**

HCV infekcija rezultira pojavom HCV RNA u krvi 1 do 2 tj nakon inokulacije virusa i trigerira efektorske mehanizme urođene i stečene imunosti (31).

#### **1.3.1. Urođena imunost**

Interferon alfa, beta i gama, NK (natural killer), NKT stanice i DC (dendritičke stanice) okosnica su početnog imunološkog odgovora u akutnoj infekciji.

Kao rezultat HCV infekcije dolazi do produkcije interferona alfa i beta u inficiranim hepatocitima. Interferon inducira apoptozu inficiranih hepatocita, te inhibira replikaciju virusa putem PKR i OAS. Interferon također pojačava ekspresiju HCV antigena na površini hepatocita čineći inficirane stanice lakše uočljivim imunološkom sustavu (8).

U prvoj liniji obrane nalaze se natural killer (NK) i NKT stanice koje sačinjavaju do 30% intrahepatalnih limfocita. One uzrokuju citolizu inficiranih hepatocita, produciraju citokine kao što je interferon gama, te aktiviraju dendritičke stanice (DC) i T stanice. Neke studije pokazuju da je broj NK stanice u krvi i jetri kod kronične HCV infekcije snižen (32) i da vezanje E2 proteina HCV virusa može inhibirati NK staničnu funkciju (33,34) u smislu smanjene citotoksične aktivnosti. Dendritičke stanice služe kao antigen prezentirajuće stanice (APC) i povezuju urođene i stečene imunološke odgovore. Postoje mijeloidne i plazmacitoidne dendritičke stanice. Mijeloidne dendritičke stanice (DC1) produciraju IL2 i TNF alfa i vode naivne CD4<sup>+</sup> limfocite u smjeru Th1 fenotipa. Međutim takve stanice kod kronično HCV inficiranih bolesnika imaju smanjenu sposobnost stimuliranja T staničnog odgovora i sekrecije IL12 (također je takva pojava nađena na stanicama neinficiranih osoba stimuliranim E2 i NS3 proteinom) što je jedan od primjera virusnim proteinima izazvane imunosupresije. Plazmacitoidne dendritičke stanice (DC2) secerniraju interferon alfa i promoviraju Th2 odgovor (35,36).

### 1.3.2. Stečeni imunološki odgovor

Stečeni imunološki odgovori uključuju humoralnu i celularnu imunost.

I dok je kod mnogih virusnih infekcija razvoj neutralizirajućih protutijela obilježje izlječenja, kod HCV infekcije ona nisu presudna za savladavanje infekcije mada imaju određeni udio u tome (37).

Anti-HCV protutijela javljaju se unutar nekoliko tjedana nakon primarne HCV infekcije, makar je to ponekad varijabilno, uz mogućnost značajno kasnije pojave protutijela.

T stanice u akutnoj HCV infekciji imaju presudnu ulogu u eventualnom zaustavljanju bolesti i sprečavanju kronične HCV infekcije.

U krvi osoba koje su nakon ubodnog incidenta uspjele kontrolirati HCV i nisu zaražene, T-limfociti specifični za HCV mogu se detektirati 7-10 tjedana od izlaganja virusu. Aktivirani pomoćnički CD4+ i citotoksično-supresorski CD8+ T limfociti specifični za HCV pojavljuju se u jetri bolesnika paralelno s nastankom akutnog hepatitisa (38).

HCV specifični T limfociti odgovorni su za direktnu kontrolu replikacije virusa i njegovu eliminaciju u akutnoj fazi infekcije nekih bolesnika. CD8+ T limfociti uzrokuju apoptozu virusom zaraženih hepatocita dok CD4+ T limfociti pridonose antivirusnoj imunosti direktno i indirektno, putem citokina (39).

CD4+ T stanice imaju ulogu u sekreciji antivirusnih citokina i za aktivaciju virusno specifičnih B stanica i CD8+T stanica.

Uspješna eliminacija virusa u akutnoj HCV infekciji opisana je u bolesnika s visokom frekvencijom T-limfocita specifičnih za široki repertoar HCV antigena, Th1 tipom citokinskog profila (dominantna sinteza IFN- $\gamma$ ) i karakterističnim fenotipskim i funkcionalnim obilježjima antigen-specifičnih limfocita (40).

Bez razvoja snažnog CD4+T odgovora, CD8+ stanice i protutijela ne mogu održati ritam sa brzom virusnom replikacijom te dolazi do neuspjeha u kontroli viremije (41).

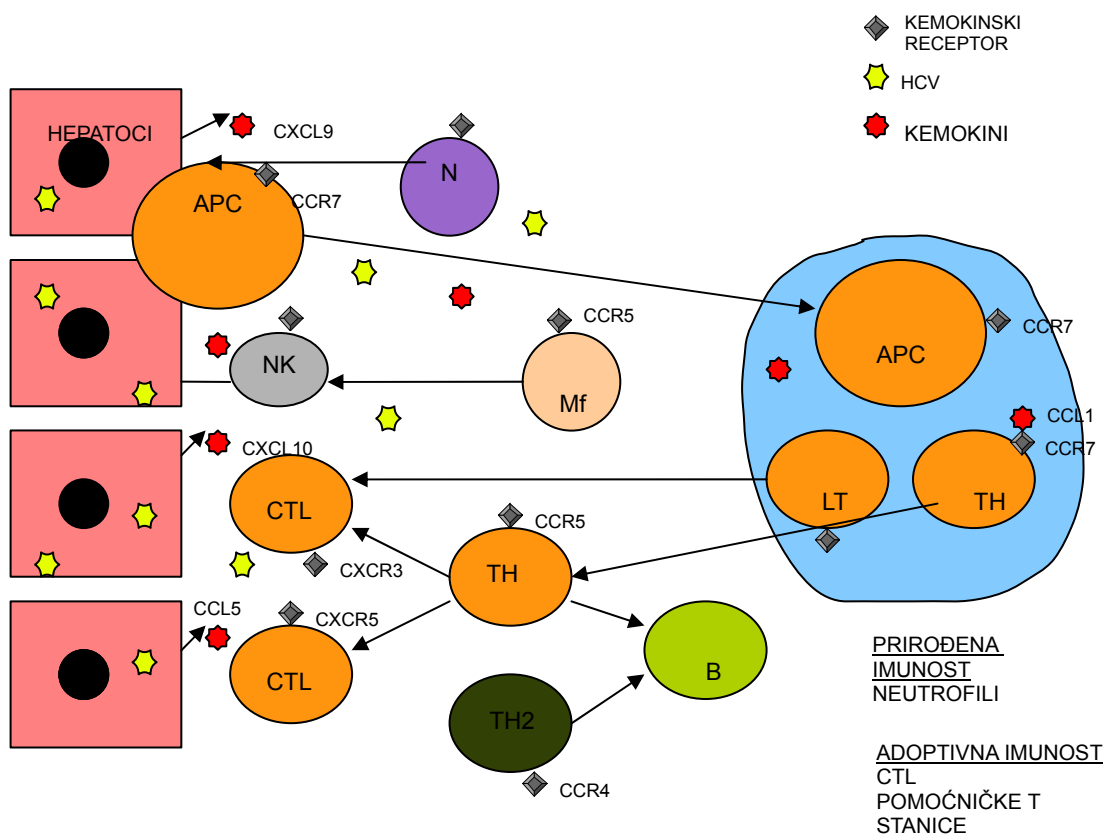
CD8+ T stanice imaju citolitičke i necitolitičke efektorske funkcije koje su uvjetovane produkcijom citokina poput interferona gama i TNF alfa. One se

glavnim efektorskim mehanizom u HCV infekciji (42). Kontroverzan je podatak da INF gama ekspresija pozitivno korelira sa stupnjem inflamacije unutar jetre ali nije u korelaciji sa stupnjem viremije (43).

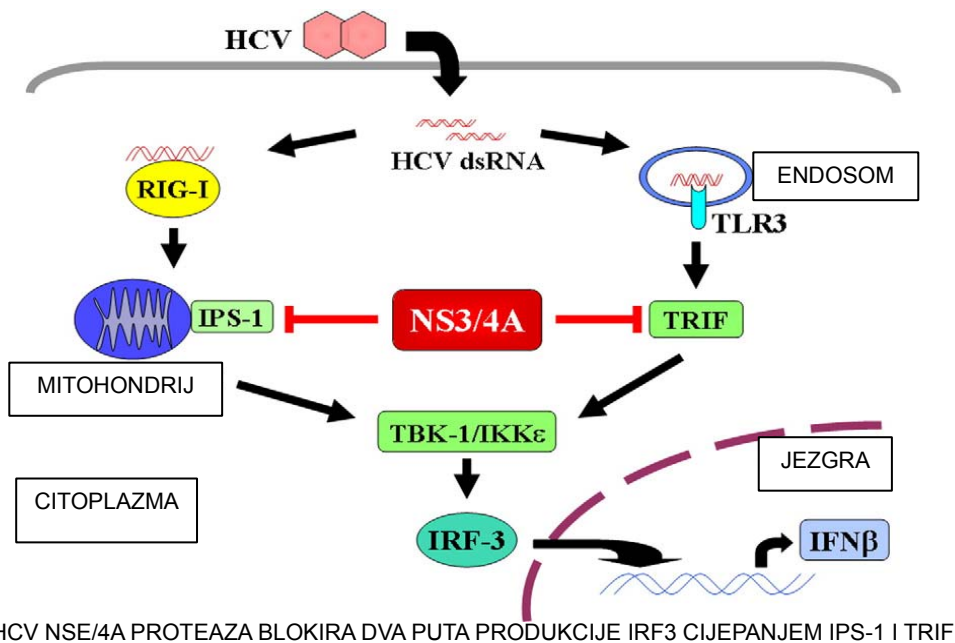
Postotci HCV-specifičnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita u akutnoj fazi infekcije su između 2-8% ukupnih limfocita periferne krvi, dok druga istraživanja pokazuju i niže vrijednosti u kroničnoj infekciji i to prosječno 0,05% (između 0,0-1,2%) od ukupnih limfocita (8). Međutim, dio antigen-specifičnih limfocita iskazuje određene funkcionalne poremećaje (snižena sinteza IFN- $\gamma$ , niska koncentracija perforina i nesposobnost uništavanja ciljnih stanica in vitro), što vjerojatno pridonosi uspostavi kronične infekcije.

Literaturni podaci o važnosti HCV-specifičnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita za replikaciju virusa i opseg upalnog procesa u jetri tijekom kronične faze infekcije su kontroverzni. Dio je istraživanja pokazao negativnu korelaciju između postotka HCV-specifičnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita i viremije što ukazuje na važnost ovih stanica u kontroli virusne replikacije (44).





Slika 1. Urođeni i stečeni imuni odgovor u HCV infekciji



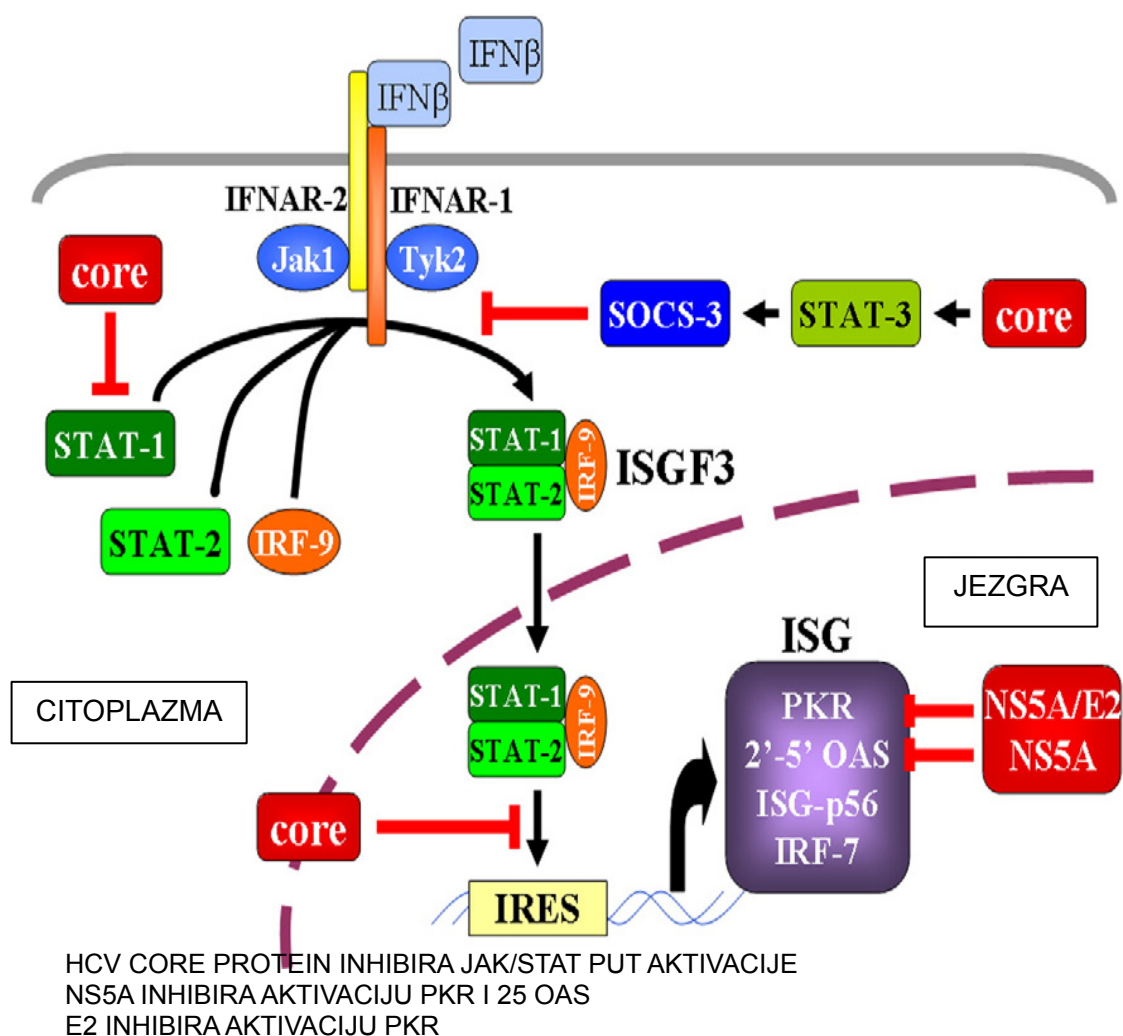
Slika 2. HCV RNA inducira aktivaciju IRF-3 i produkciju interferona

## 1.4. Prelazak HCV infekcije u kronicitet

### 1.4.1. Imunološki bijeg

HCV virus je razvio sofisticirane mehanizme za izbjegavanje imunosti domaćina. On interferira s endogenim INF i TLR odgovorom tako da virusna NS3/4A proteaza blokira aktivaciju virusom inducirane IRF-3 odgovorne za produkciju interferona beta. Također inhibira TLR3 signale cijepanjem TRIF proteina.

Stvoreni interferon beta aktivira ekspresiju brojnih interferonom stimuliranih gena (ISG) putem Jak/STAT signalnog puta. HCV core protein inhibira aktivaciju STAT-1 i funkciju ISGF3 (interferonom stimulirni gen faktor 3). NS5A smanjuje aktivaciju PKR, i inducira stvaranje interleukina 8 koji inhibira aktivnost interferona (8,11,12).



Slika 3. Inhibitorni učinci HCV virusa na ekspresiju interferonom stimuliranih gena

#### **1.4.2. Iscrpljenost imunološkog odgovora/anergija**

Jedan od osnovnih problema u patogenezi HCV infekcije je činjenica da T stanice ne uspijevaju zaustaviti infekciju bilo da je to zbog disfunkcije dendritičkih stanica, ili zbog visokog stupnja HCV replikacije koja nadmašuje imunološke mogućnosti domaćina.

Kod bolesnika koji nisu eliminali HCV virus primjećene su niže vrijednosti CD4+ T limfocita u ranoj infekciji, dok su u kroničnoj infekciji CD8+ bili funkcionalno slabiji u smislu manje produkcije interferona u nekim, ali ne svim studijama (45,46).

Neke studije upućuju na PD-1L supresijski put koji ima inhibitorni efekt na CD8+T limfocite i stimuliran je u osoba s kroničnom HCV infekcijom a čija pak blokada vraća efektorske mehanizme CD8+T stanica (47,48,49).

#### **1.4.3. Brzina virusne replikacije i stvaranje mutanti**

Tijekom rane faze akutne infekcije, HCV uspješno izbjegava mehanizme nespecifične imunosti (NK-stanice, antivirusni citokini) i aktivno se replicira u jetri (44). Virusna replikacija se nastavlja, a novonastali se virioni oslobađaju u cirkulaciju.

Broj kopija HCV RNA u serumu bolesnika vrlo se brzo povećava nakon infekcije. Visoka viremija je karakteristična za prvih 10-12 tjedana od početka infekcije (više od  $10^6$  kopija HCV RNA po ml seruma).

HCV virus ima vrlo veliku brzinu replikacije,  $10^{12}$  virusnog genoma dnevno čak i u kroničnoj fazi infekcije (50) uz pojavu mutacije 1,5 do  $2,0 \times 10^3$  baza supstitucija po genomu, po mjestu, po godini i to zbog karakteristika svoje RNA polimeraze. Tako stvorene varijante virusa imaju potencijal da izbjegnu imunološko prepoznavanje. Sekvencijske mutacije mogu smanjiti vezanje MHC molekule i HCV epitopa te smanjiti prepoznavanje T staničnog receptora (TCR) (51).

#### 1.4.4. T regulatorne stanice

T regulatorne stanice također imaju ulogu u kroničnoj HCV infekciji, utječući na održavanje kroniciteta. Te stanice podržavaju toleranciju antigena i limitiraju potencijalno štetne imunološke odgovore (52,53,54). U bolesnika s kroničnom infekcijom nađene su povišene vrijednosti T reg. stanica, dok je njihova deplecija dovela do promoviranja produkcije interferona i CD8+T HCV specifičnih limfocita (55,56).

U toku HCV infekcije imunološki odgovori locirani su uglavnom u jetrenom parenhimu, tako da je odnos intrahepatalnih HCV specifičnih CD4+ i CD8+ T stanica u odnosu na serum 100:1 ili više. U okupljanju tih stanica u jetri ulogu imaju INF alfa/beta te monocitni kemoatraktant protein 1 (MCP-1) kojeg produciraju makrofagi, koji dovodi do regrutacije drugih makrofaga u to područje, a također NK stanica. NK stanice izlučuju interferon gama koji inducira produkciju kemokina CXCL9 i CXCL10.

Bolesnici s suprimiranom staničnom imunosti imaju ubrzan tok HCV infekcije, i mogu razviti cirozu mnogo prije (8).

Amplituda HCV specifičnog CD4+ T staničnog odgovora određuje stupanj progresije u kroničnu bolest jetre i obrnuto je proporcionalan sa stupnjem jetrenog oštećenja (57). Prema tome on ima protektivnu ulogu iako potpuno ne prevenira bolest.

S druge strane uloga HCV specifičnih CD8+ T ukazuju da su one medijator jetrenog oštećenja, dok neke njihove subpopulacije mogu biti povezane sa inhibicijom upale preko IL10 ili TGB-f 41. Upalni infiltrati u kroničnoj HCV infekciji sastoje se od velikog broja T stanica koje nisu specifične za HCV i njihova aktivacija može biti kritična za upalnu aktivnost. Različite subpopulacije NK stanica mogu imati utjecaja na inflamaciju dok je veća prisutnost drugih (CD56 dim) u korelaciji sa značajnijom fibrozom (58,59).

## 1.5. Imunološki odgovor u toku antivirusne terapije

Imunološki odgovor u toku terapije može biti moduliran djelovanjem interferona alfa i ribavirina (60). Pegiliarni interferon alfa i ribavirin iskazuju snažan antivirusni učinak, ali imaju i važan imunomodulacijski učinak in vivo. Interferon alfa potiče antigen prezentirajuće stanice i CD4+ T limfocite, ali uz malo djelovanja na citotoksične T limfocite. Više razine CD4+ u toku početka terapije bile su povezane sa SVR (61). Analiza CD8+ T limfocita specifičnih za HCV pokazala je da se postotak ovih stanica ne povećava tijekom liječenja PEG-IFN- $\alpha$  i ribavirinom. Kamal i sur. su pokazali rekonstituciju HCV-specifičnih CD4+ T-limfocita u krvi uspješno liječenih bolesnika (62,63). Suprotno tome, Rahman i sur. su pokazali smanjenje HCV-specifičnih T-limfocita u bolesnika s povoljnim učinkom liječenja (64). Stoga za sada nije poznato da li eliminacija HCV-a tijekom liječenja omogućava rekonstituciju specifične imunosti na ovaj virus. Međutim, rezultati na modelu liječenja kronične HBV infekcije lamivudinom pokazuju da liječenje može povećati frekvenciju i rekonstituirati funkcionalne CD4+ i CD8+ T-limfocite specifične za virus (65). S druge strane ribavirin potiče Th1 profil reakcije (66) i inhibira produkciju interleukina10.

Kod HCV infekcije opaženo je oslabljeno sazrijevanje plazmacitoidnih dendritičkih stanica i kemotaksija. Terapija interferonom ima ulogu u restituciji broja dendritičkih stanica koje mogu biti snižene u HCV infekciji. Frekvencije dendritičkih stanica prije terapije bile su značajno niže kod bolesnika s HCV infekcijom nego u zdravih kontrola, a uspješna terapija normalizirala je plazmacitoidne dendritičke stanice. Nivoi kemokinskog receptora CXCR3 na plazmatskim dendritičkim stanicama bili su viši prije terapije nego u zdravih kontrola (67).

Mogući mehanizmi neuspjeha T staničnog odgovora koji doprinose perzistiranju HCV su dakle: iscrpljenost T staničnog sustava; razvoj virusnih mutanti; disfunkcija T stanica u smislu slablje proliferacije, citotoksičnosti i slablje produkcije interferona; slabli odgovor izbog izloženosti visokim nivoima antigena; slablje sazrijevanje T stanica; supresija T staničnih funkcija zbog faktora virusa, ali i zbog djelovanja T regulatornih stanica; manjak akumulacije T

stanica u jetri; te ubrzana deplecija u jetri (68).

Buduća istraživanja antigen-specifične imunosti omogućit će nam bolje razumijevanje imunomodulacijskog učinka liječenja PEG-IFN- $\alpha$  i ribavirinom kao i novih strategija za HCV-specifičnu imunoterapiju. Naime, razlika u amplitudi i repertoaru HCV-specifične imunosti u samoograničavajućoj u odnosu na kroničnu infekciju ukazuje na to da bi terapijska rekonstitucija antivirusne imunosti mogla pridonijeti kontroli virusne replikacije i bolesti. Istraživanje kinetike antigen-specifične imunosti u neliječenih i liječenih HCV bolesnika omogućit će stjecanje znanja koja će predstavljati temelj stvaranja novih strategija za optimizaciju terapijske vakcinacije (69).

## **1.6. Kemokini u HCV infekciji**

Imunoregulacijski citokini imaju vrlo važnu ulogu u imunopatogenezi kronične HCV infekcije a utječu i na opseg oštećenja jetre. Većina literaturnih podataka o citokinima u kroničnoj HCV infekciji temelji se na analizi Th1 versus Th2 citokinskog profila kao i IFN- $\alpha$ -inducibilnim citokinima u odnosu na HCV viremiju, aktivnost jetrenih enzima te ishod antivirusne terapije (Falasca K, 2006; Vecchiet J, 2005; Hassoba H, 2003; Murata K, 2005) (70,71,72).

Kemokini su citokini male molekulske težine koji su odgovorni za migraciju stanica i međustaničnu komunikaciju. Kemokini promoviraju migraciju leukocita i orkestriraju imunološki odgovor na HCV virus. Kemokini su ključni za eliminaciju virusa, ali neadekvano perzistiranje njihove ekspresije u kroničnoj C infekciji može dovesti do oštećenja jetrenog tkiva i perzistiranja upale. Kemokini djeluju unutar fizioloških i patoloških stanja i neki imaju homeostatsko djelovanje u smislu održavanja odgovarajućeg imunološkog miljea, dok su inflamatorni kemokini rezultati signaliziranja u upalnim i infektivnim stanjima. Ekspresija kemokina u jetri također se reflektira i u korelaciji je s vrijednostima u perifernoj krvi (73,74).

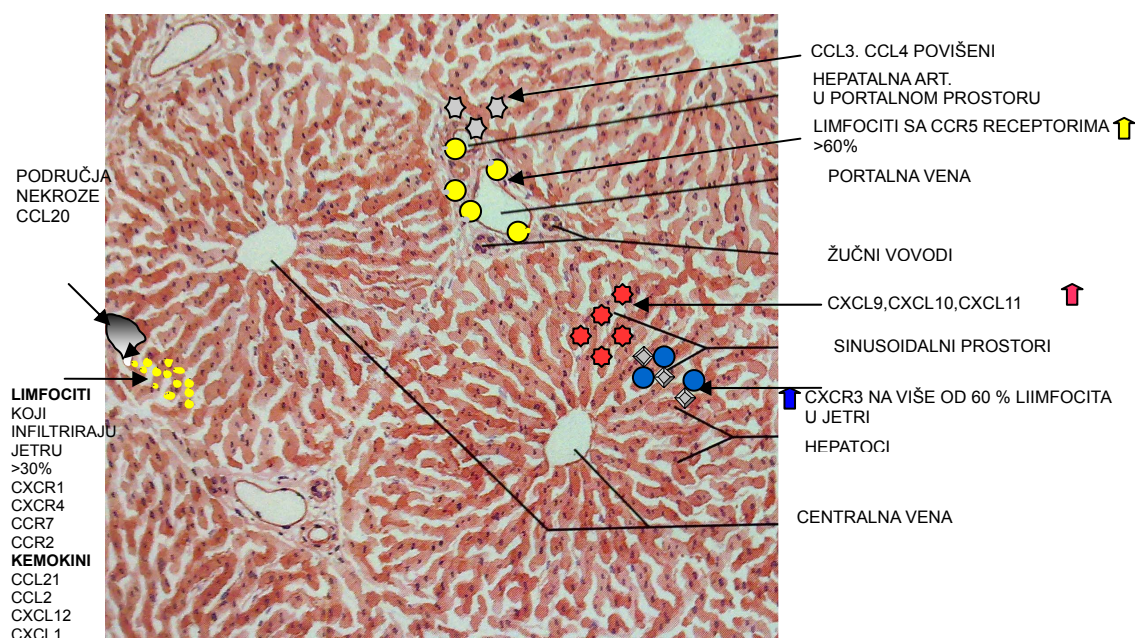
Osim privlačenja imunoloških stanica, citokini djeluju u njihovoj aktivaciji, proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi. Također imaju ulogu u angiogenezi, razvoju tumora i procesu regeneracije tkiva nakon oštećenja (75,76). Virusima potaknuta sinteza kemokina ima važnu ulogu u regrutiranju i aktivaciji

imunoloških efektora na mjesto upalne reakcije u tkivima te kemokine smatramo ključnim medijatorima antivirusne lokalne ali i sistemske imunosti (77). Kemokini ostvaruju svoj biološki učinak vezanjem za kemokinske receptore ciljnih stanica koji su vezani za G-proteine, a izraženi su na površini imunoloških stanica.

Receptori za kemokine također se označavaju kao CXCR, CCR, XCR, CX3CR ovisno o tipu kemokina koje vežu. Kemokini se mogu vezati sa 1 do 5 liganada, a različiti ligandi mogu ostvariti slične ili alternativne efekte na receptor.

Kemokinski receptor CXCR3 eksprimiran je na aktiviranim T-limfocitima za koje je karakterističan citokinski profil tipa 1. Ekspresija ovog kemokinskog receptora karakteristična je za populacije T-limfocita koje su povezane s upalnim procesima. CXCR3 je receptor za tri interferonom- $\gamma$ -inducibilna kemokina: CXCL9 (monokine induced by interferon gamma, MIG), CXCL10 (interferon-gamma inducible protein 10 kDa, IP-10) i CXCL11 (interferon-inducible T cell alpha chemoattractant, I-TAC).

Receptori CCR5 i CCR1 postoje na aktiviranim T i NK stanicama i makrofagima, dok je CXCR3 prisutan na T i NK stanicama. Ti su receptori povezani sa Th1 imunim odgovorima i imaju ulogu u patogenezi kroničih inflamatornih zbivanja kao što je kronična HCV infekcija(78).



Slika 4. Ekspresija kemokina i kemokinskih receptora u jetri s HCV infekcijom

Tablica 1. Kemokini i kemokinski receptori

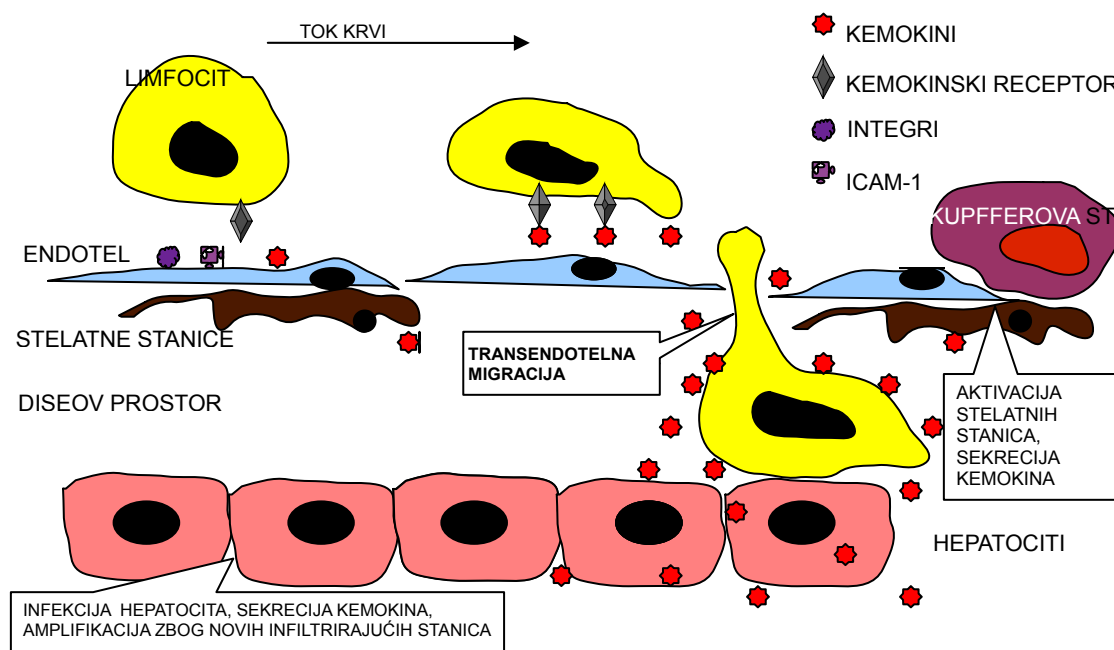
| KEMOKIN                                                 | RECEPTOR   | STANICE              |
|---------------------------------------------------------|------------|----------------------|
| CCL2-MCP-1 - Monocyte chemotactic protein 1             | CCR2       | monociti             |
| CCL3-MIP-1a - Macrophage inflammatory protein 1a        | CCCR2 R1/5 | T, NK, NK-T, monocit |
| CCL4-MIP-1b - Macrophage inflammatory protein 1b        | CCR1/5     | T, NK, NK-T, monocit |
| CCL5-RANTES - Regulated upon activation,                | CCR1/5     | T, NK, NK-T, monocit |
| CCL20-MIP-3a - Macrophage inflammatory protein 3a       | CCR6       | T, Dendritičke st    |
| CCL21-SLC.- Secondary lymphoid chemokine                | CCR7       | T, Dendritičke st    |
| CXCL6-GCP-2 - Granulocyte chemotactic protein 2         | CXCR1/2    | Neutrofili           |
| CXCL8- IL-8 - Interleukin 8                             | CXCR1/2    | T, N Neutrofili      |
| NeutrofiliCXCL9-MIG. - Monokine induced by interferon c | CXCR3      | T, NK, NK-T          |
| CXCL10-IP-10 - Interferon c inducible protein 10        | CXCR3      | T, NK, NK-T          |
| CXCL11-I-TAC - Interferon inducible T-cell a chemoattr. | CXCR3      | T, NK, NK-T          |
| CXCL16-Bonzo                                            | CXCR6      | T, NK, NK-T          |
| CX3CL1-Fractalkine                                      | CXCR6      | T, NK, NK-T          |

Model s četiri faze u zaustavljanju leukocita i njihovom prodiranju u upalno područje opisuje kemokinima inducirano privlačenje u tkiva imunih stanica koje imaju odgovarajuće receptore za te kemokine.

Prvo, selektin/selektin-ligand interakcije induciraju kotrljanje limfocita na ciljanim endotelnim stanicama. U drugom koraku kemokinski receptori dolaze u kontakt s kemokinima na vaskularnom endotelu, što dovodi u trećem koraku do aktivacije integrina i zaustavljanja imunoloških stanica na zidu krvnih žila. Četvrti korak, nakon zaustavljanja dolazi do transendotelne migracije u perivaskularne prostore. Jednom u tkivu stanice migriraju u smjeru gradijenta kemokina direktno prema relevantnom mikroambijentu (75,76,77,78).



I dok je u odsutnosti upalnih stimulusa limfocitna infiltracija jetre prisutna u manoj mjeri u okviru trajnog imunološkog nadzora (79), u toku HCV infekcije upala povisuje sekreciju kemokina koji promoviraju privlačenje limfocita. U jetri limfocitno okupljanje u portalnim venulama slično je kao i u drugim tkivima (80). Suprotno tome, u jetrenim sinusoidalnim prostorima prisutan je usporen tok krvi, fenestrirani endotel i manjak sinusoidalnih endotelialnih selektina, što predstavlja razliku za privlačenje i zadržavanje intrahepatalnih limfocita u odnosu na druga tkiva (81).



Slika 5. Okupljanje limfocita u jetrenom parenhimu

Dijagram okupljanja i prometa limfocita u jetrenom parenhimu, u hepatalnim sinusoidalnim prostorima. Nakon integrinima potaknute adhezije dolazi do aktivacije kemokinskih receptora na limfocitima i transendotelne migracije kroz fenestrirani endotel.

Za razliku od neinficirane populacije gdje malo intrahepatalnih T stanica ima CXCR3 ili CCR5 receptore, takvi su limfociti većinski u portalnim i lobularnim prostorima kod HCV inficiranih (82,83).

Interferoni spadaju u najsnažnije induktore kemokina CXCL9 i CXCL10 i CXCL11 koji se vežu za kemokinski receptor CXCR3. U toku HCV infekcije

kronična upala, regeneracija i fibroza ključni su elementi u razvoju jetrene disfunkcije, a citokini i kemokini su značajni regulatori tih procesa. Stoga ishod infekcije ovisi dijelom o toj kompleksnoj mreži koja koordinira prirođene i stečene imunološke odgovore prema HCV infekciji

Ekspresija kemokina i njihovih receptora razlikuje se u zdravoj i HCV inficiranoj jetri, na temelju rezultata imunohistokemijskih analiza i fluorescentnih bojanja te analize limfocita iz jetre protočnom citometrijom.

Kemokinski receptor CXCR3 je pojačano izražen na aktiviranim efektorskim stanicama i povezan s Th1 imunim odgovorima, te dolazi do lociranja tih stanica u području jetrenog sinusoidalnog epitela u HCV infekciji. Limfociti iz tog područja pokazuju povećanu migraciju kao odgovor na CXCL9 i CXCL10 u odnosu na limfocite iz periferne krvi (84). I dok CXCR3 receptor biva najviše izražen na aktiviranim T i memorijskim T stanicama i NK stanicama, CCR5 receptor je izražen dominantno na dendritičkim stanicama, monocitima i makrofagima (85).

CXCL10 produciraju hepatociti i sinusoidalne epitelne stanice na poticaj interferona gama, TNF alfa, ds RNA i lipopolisaharida. Kod KHC CXCL10 je lociran u hepatocitima koji okružuju intralobularne mononukleare i lobularnu nekrozu, te u hepatocitima uz sinusoidalne prostore. Intrahepatalne koncentracije CXCL10 su u korelaciji s lobularnom infiltracijom, ali ne sa fibrozom (83,90), dok su drugi radovi pokazali da su periferne koncentracije u korelaciji s nekroinflamatornom aktivnosti kod kroničnog hepatitisa C (86).

CXCL9 prisutan je na sinusoidalnom endotelu i portalnim venulama a kod KHC intenzivnije je prisutan uz područja jače infiltracije limfocita, a slično je i sa CXCL11.

CCL5 je kemokin primarno biliarnog endotela, sinusoida i vaskularnog endotela, dok je kod KHC prisutan u portalnim prostorima, piecemeal nekrozama, periportalnim hepatocitima te biliarnom endotelu.

CCL3 i CCL4 prisutni su portalnom vaskularnom endotelu.

CXCL9, CXCL10 i CXCL11 su kemokini važni za patološke procese koje karakterizira prisutnost aktiviranih T-limfocita i regrutacija Th1 limfocita na mjesto upale. Th1 upalne stanice karakterizirane su sekrecijom interferona

gama i interleukina 2 i dominiraju u jetri u toku kronične HCV infekcije. Činjenica da su Th1 upalne stanice privučene spomenutim citokinima govori o njihovoj potencijalnoj ulozi u progresiji bolesti (87,88,89). Ovi su kemokini i antagonisti kemokinskog receptora CCR3 koji je eksprimiran na eozinofilima i Th2 limfocitima čime još značajnije pridonose Th1/Th2 polarizaciji (91).

Literaturni podaci o ulozi CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u toku liječenja HCV infekcije su oskudni. Analiza ekspresije ovih citokina u jetri HCV-om zaraženih osoba pokazala je da virusom zaraženi hepatociti sintetiziraju IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  koji potiče Kuppferove stanice na sintezu CCL3 (engl. monocyte inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ). CCL3 potiče sintezu IFN- $\gamma$  u NK-stanicama što u konačnici uzrokuje sintezu CXCL9 i CXCL10 u hepatocitima i sinusodalnim endotelnim stanicama jetre. CXCL9 i CXCL10 odgovorni su za regrutiranje aktiviranih CD4+ i CD8+ T-limfocita odgovornih za upalnu reakciju u jetri (Bertoletti i Ferrari, 2003) (87,88). Intrahepatalne koncentracije CXCL11 i CXCL10 koreliraju s težinom bolesti (89, 83, 90).

Koncentracije CXCL9 i CXCL10 u plazmi smanjuju se nakon uspješne anti-HCV terapije. CXCR3 i njegovi ligandi igraju dakle ključnu ulogu u lociranju imunoloških stanica u jetrenim prostorima te mogu biti uspješni prediktor odgovora na antivirusnu terapiju i marker aktivnosti bolesti (91).

Neki istraživači primjetili su povišene serumske koncentracije CXCL9 kod bolesnika s jače uznapredovalim stadijem fibroze (92).

U kroničnom hepatitisu C, antivirusno liječenje inducira povećanje broja CD8+ stanica koje imaju kemokinske receptore vezane za Th1 odgovore i redukciju njihovih liganda. Postizanje virusne kontrole povezano je sa povećanim brojem CD8+stanica sa CXCR3 receptorom (93).

Koncentracija CXCL 9 i CXCL10 u plazmi bolesnika s kroničnim hepatitisom C smanjivala se u toku terapije pegiliranim interferonom kod bolesnika s dobrim odgovorom u studiji s malim brojem bolesnika (29 bolesnika) podijeljenih u tri različite terapijske grupe (89). Međutim, preduvjet procjene moguće prediktivne vrijednosti koncentracije CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u plazmi u odgovoru na liječenje PEG-IFN- $\alpha$  i ribavirinom je longitudinalno istraživanje kemokinske kinetike u mnogo većeg broja bolesnika.

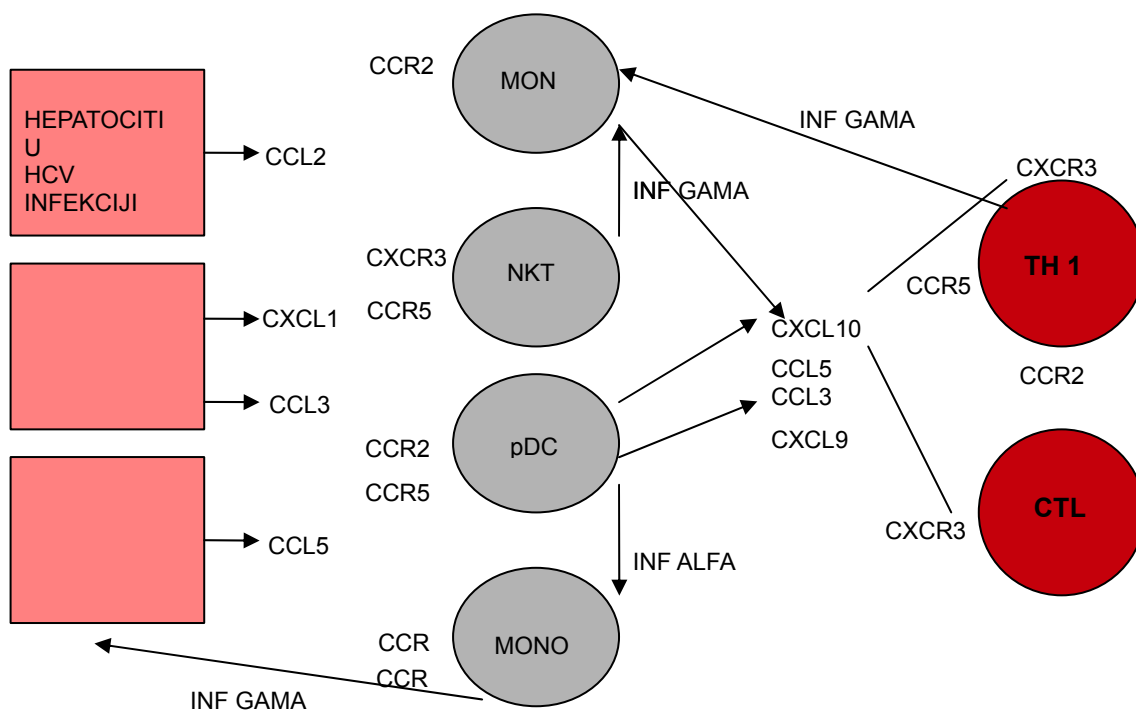
Važnost kemokina u HCV infekciji pokazuje podatak da je heterozigotnost za CCR5delta32 receptora za kemokine statistički značajno povezana sa spontanom eliminacijom HCV-a te značajno nižim opsegom upalne reakcije u jetri (94). Interesantno je da su nosioci mutacije CCR5delta32 slablje regirali na terapiju interferonom u nekim studijama. Ostaje nerješeno pitanje da li bi blokada CCR5 bila terapijski uspješna u smislu reduciranja upalnog odgovora (95).

Kemokin CXCL 12 povezan je s mogućom ulogom u regeneraciji i modulaciji fibroze, epitelialnih stanica žučnih vodova, organizacijom limfnog tkiva u portalnim prostorima i hepatokarcinogenezom (74, 13).

Kemokin CCL20 privlači nezrele dendritičke stanice i limfocite i ima ulogu u patogenezi upale i karcinogeneze, jer je nadena jaka ekspresija njega i njegovog receptora CCR6 u području hepatocelularnog karcinoma (96). Slična korelacija s HCC nadena je za CXCL8.

Kemokini kao markeri progresije HCV infekcije mogli pri predstavljati manje invazivnu metodu od histološke procjene aktivnosti bolesti prije, u toku i nakon liječenja hepatitisa, jer je u nekim studijama pokazano da su CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u dobroj korelaciji sa histološkom aktivnosti. Infiltracija portalnih područja dobro korelira sa ekspresijom CCL2, koji ima direktne kemotaktičke učinke na jetrene stielne stanice (83,84,85).

Intrahepatalni nivoi CXCR3 povezanih kemokina pokazuju korelaciju s upalnom aktivnosti i fibrozom u istraživanju Zeremski i sur. U lobularnoj regiji hepatociti koji stvaraju CXCL10 i CXCL9 primjećeni su dominantno u područjima nekroinflammacije, a CXCL11 u svim portalnim područjima. Većina intrahepatalnih limfocita imala je CXCR3 receptore, a njihov broj bio je povišen u pacijenata s uznapredovalom nekroinflammatornom aktivnosti i fibrozom kod bolesnika s kroničnom HCV infekcijom (97,98).



Slika 6. Amplifikacija citokinskog odgovora u HCV infekciji

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

### **2.1. Hipoteze**

Povišene koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 te postotci NS3-specifičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita u početku liječenja u korelaciji su s odgovorom na terapiju kroničnog hepatitisa C pegiliranim interferonom- $\alpha$ 2b i ribavirinom.

Rana virusna kinetika (mjerena nakon 4 i 12 tjedana liječenja) povezana je ishodom liječenja te smatramo da postoji korelacija između nje i odabranih imunoloških parametara (HCV specifičnih CD8<sup>+</sup> limfocita i kemokina CXCL9, CXCL10, CXCL11).

### **2.2. Specifični ciljevi istraživanja**

1. Analizirati kinetiku HCV-specifične stanične imunosti i kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 tijekom 24-tjednog liječenja kroničnog hepatitisa C kombinacijom pegiliranog interferona alfa-2b i ribavirina.
2. Utvrditi da li postoji korelacija između odabranih imunoloških parametara i virusne kinetike, posebno u ranom periodu liječenja (4 i 12 tjedana).

### **2.3. Očekivani znanstveni doprinos**

Temeljno obilježje kliničkog tijeka HCV infekcije je varijabilnost koja je uzrokovana specifičnim biološkim karakteristikama ovog virusa kao i interakcijom virusa i domaćina. Svrha ovog rada je prikupljanje i kritičko razmatranje novih spoznaja o imunopatogenezi HCV infekcije, dijagnostici, kliničkom tijeku bolesti te liječenju virusnih hepatitisa. Originalni znanstveni doprinos ovog istraživanja sastoji se u procjeni vrijednosti HCV-specifične stanične imunosti i koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 kao prediktora ishoda liječenja kroničnog hepatitisa C i to promatrano ne samo u početku liječenja već dinamički za vrijeme provođenja antivirusne terapije.

### **3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Plan istraživanja**

Studija u kojoj su praćene vrijednosti kemokina u toku terapije kroničnog hepatitisa C bila je longitudinalna prospektivna studija. Radi ujednačenosti ispitivani su bolesnici s genotipom 1.

Bolesnici su započeli liječenje pegiliranim interferonom i ribavirinom. U bolesnika s kroničnom HCV infekcijom prije liječenja i nakon 4, 12 i 24 tjedna liječenja analizirana je viremija (IU HCV RNA/ml), koncentraciju kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 te postotke i brojeve CD8<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za NS3 protein (epitopi na pozicijama aminokiselina 1073-1081 te 1406-1415).

Bolesnici su praćeni u toku terapije (48 tjedana) i pola godine po završetku terapije. U toku terapije bolesnici su se izdiferencirali u dvije grupe, onu s dobrim odgovorom odnosno negativizacijom HCV RNA, te onu sa i dalje prisutnom viremijom - non responderi. Nakon pola godine po prekidu terapije izdiferencirala se grupa bolesnika s protrahiranim dobrim odgovorom na terapiju (SVR).

Zatim se izvršila usporedba dinamike koncentracija kemokina te broja HCV specifičnih CD8<sup>+</sup>T limfocita u jednoj i drugoj grupi bolesnika. Analizirani su i drugi mogući parametri povezani s dobrim ili lošim odgovorom te koncentracijom kemokina kao što su dob, upalna aktivnost, stadij fibroze i visina viremije.

Istraživanje je provedeno u Klinici za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević na odjelu za virusni hepatitis odnosno unutar referalnog centra za dijagnostiku i liječenje virusnog hepatitisa. Patohistološka analiza bila je izvršena u Zavodu za patohistologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Imunološke i virusološke analize bioloških uzoraka izvršene su u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i celularnu imunost Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu pod voditeljstvom Dr. sc. S. Židovec Lepej.

Analiza podataka izvršena je prije započinjanja terapije pegiliranim interferonom- $\alpha$ 2b, te nakon 4, 12, 24, 48 tjedana po započinjanju terapije, i pola godine po završetku liječenja.

### **3.2. Ispitanici**

U istraživanje su uključene odrasle osobe ( od 18 do 67 godina) oba spola s kroničnom HCV infekcijom (genotip 1) koje se liječe u Odjelu za virusne hepatitis Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu odnosno kontroliraju u Ambulanti za virusne hepatitis Klinike.

Svi ispitanici uključeni u istraživanje potpisali su informirani pristanak. Ovo je istraživanje odobrio Etički komitet Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu i Etičko povjerenstvo pri Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Kriteriji za uključanje su bili HCV RNA pozitivitet, uz povišene vrijednosti aminotransferaza i patohistološki nalaz bioptata jetre u smislu kroničnog hepatitisa. Kriteriji za isključenje su druge konkomitantne bolesti jetre (autoimune bolesti, maligne bolesti, koinfekcija drugim hepatotropnim virusima), dekompenzirana ciroza jetre, psihijatrijske bolesti i alkoholizam.

Svi bolesnici uključeni u liječenje i istraživanje nisu prethodno nikada bili liječeni antivirusnom terapijom zbog kronične HCV infekcije.

Biopsija jetre u sklopu dijagnostike i liječenja bolesnika s kroničnim hepatitisom C učinjena je prije započinjanja terapije pegiliranim interferonom. Ona je potrebna da bi se ocijenio stupanj aktivnosti bolesti i stadij fibroze što nije uvijek u korelaciji s visinom aminotransferaza ili ultrazvučnim nalazom.

Patohistološka potvrda kroničnog hepatitisa uvijet je Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje za odobravanje terapije pegiliranim interferonom alfa 2, te se ona prije terapije radi i neovisno o ovom istraživanju kod bolesnika koji imaju biokemijske i virusološke pokazatelje kroničnog hepatitisa C (povišene vrijednosti aminotransferaza dulje od 6 mj, te dokaz HCV viremije - pozitivan HCV RNA PCR) i to prije započinjanja terapije pegiliranim interferonom.

Nisu se poduzimale ponovne biopsije u toku terapije niti po njenom završetku.



U istraživanje je također uključeno 25 odraslih osoba (18 do 65 g.) bez očitih hematoloških poremećaja kao zdrave kontrole.

### **3.3. Metode**

#### **3.3.1 Terapijski protokol**

Ukupno 46 bolesnika s genotipom 1 HCV-a bilo je liječeno pegiliranim interferonom alfa-2b ( Peg-intron) u dozi od 1,5 mikrograma/kg sc. 1x tjedno te ribavirinom per os (Rebetol, doziran prema tjelesnoj težini), dakle prema sada standardnom protokolu za kronični hepatitis C ( genotip 1).

Virusna kinetika mjerena kvantitativnim molekularnim testom određivana je neposredno prije započinjanja terapije i nakon 4, 12 i 24 tjedna, te na kraju terapije i pola godine po njenom završetku.

Standardni protokol podrazumijeva terapiju u trajnju od 48 tjedana. Kod bolesnika s početnom viremijom manjom od 600 000 IU terapijski protokol predviđa terapiju u trajanju od 48 tjedana ako nema brzog nestaka viremije nakon 4 tjedna terapije. Ako liječenje dovodi do nedetektabilne viremije nakon 4 tj. liječenja, terapija se provodi kroz 24 tjedna. Nakon 12 tjedana terapiju nastavljaju bolesnici koji u tom trenutku pokazuju pad viremije za 2 ili više log. od početne viremije. Standardni protokol temelji se na preporukama EASL (Europske asocijacije za bolesti jetre) i propozicijama Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje za primjenu navedene terapije te predstavlja sadašnji opće prihvaćeni način liječenja u većini razvijenih zemalja.

Bolesnici kod kojih terapije nije mogla biti provedena u cijelosti zbog nuspojava ili iz drugih razloga isključeni su iz studije, jer njihovi rezultati ne bi bili komparabilni. Bolesnici koji su bili non responderi dobili su terapiju kroz 24 tjedna, i analizirani su podaci dobiveni u tom vremenu.

### 3.3.2. Kontrolni pregledi i biološki uzorci

U bolesnika s kroničnim hepatitisom C učinjene su ove pretrage: KKS, hepatogram, koagulogram, serumski biljezi virusnih hepatitisa, viremija, elektroforeza proteina, Fe, UIBC, TIBC, UZV pretraga abdomena te biopsija jetre prije započinjanja terapije interferonom. Za potrebe molekularne dijagnostike (određivanje viremije, genotip HCV-a), bolesnicima s kroničnim hepatitisom C virusnim hepatitisima uzeta je jedna epruveta periferne krvi.

Za potrebe dodatne imunološke analize (analiza HCV-specifičnih T-limfocita i kemokina), koristio se dio krvi koji ostaje nakon analize uzorka na hematološkom brojaču (rutinska dijagnostička pretraga, 1 epruveta, 5 mL) i koji se u normalnim uvjetima odbacuje. Ovim istraživanjem nije bilo predviđeno uzimanje bilo kakvih dodatnih bioloških uzoraka. Uzorci plazme bili su pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  do kvantifikacije kemokina.

Tablica 2. Plan pretraga u toku i nakon terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom

|                             | Početak th | 4 tj | 12 tj | 24 tj | 48 tj | 6mj<br>nakon th |
|-----------------------------|------------|------|-------|-------|-------|-----------------|
| HCV RNA                     | x          | x    | x     | x     | x     | x               |
| CXCL9                       | x          | x    | x     | x     |       |                 |
| CXCL10                      | x          | x    | x     | x     |       |                 |
| CXCL11                      | x          | x    | x     | x     |       |                 |
| HCV SPECIFIČNI<br>LIMFOCITI | x          | x    | x     |       |       |                 |
| BIOPSIJA JETRE              | x          |      |       |       |       |                 |
| ALT                         | x          | x    | x     | x     | x     | x               |
| KKS                         | x          | x    | x     | x     | x     | x               |

## **Biološki uzorci**

Uzorci seruma potrebni za kvantifikaciju HCV RNK, genotipizaciju HCV-a i kvantifikaciju CXCL10 odnosno CXCL11 prikupljeni su uzimanjem krvi u epruvetu bez aditiva ili gela te centrifugiranjem na 800-1600g, 15-20 min na sobnoj temperaturi. Nakon alikvotiranja, uzorak seruma za kvantifikaciju HCV RNK i genotipizaciju HCV-a pohranjen je na -20°C a za kvantifikaciju CXCL9, CXCL10 i CXCL11 na -80°C do testiranja.

Uzorak periferne krvi za detekciju HCV-specifičnih CD8+ T-limfocita prikupljen je u epruvetu s antikoagulansom K3EDTA i pohranjen na sobnoj temperaturi do analize na protočnom citometru (najviše 6 h).

### **3.3.3 Eksperimentalne metode**

#### **Određivanje koncentracije CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u serumu**

Koncentracija CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u serumu ispitanika određena je primjenom standardiziranog enzimskog imunotesta Quantikine Human CXCL10/IP-10 i Quantikine Human CXCL11 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA).

#### **Kvantifikacija HCV RNK te genotipizacija HCV-a**

HCV RNK u serumu bolesnika kvantificirana je primjenom kvantitativnog testa lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) u realnom vremenu (real-time PCR) COBAS AmpliPre/COBAS TaqMan HCV uz automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina primjenom instrumenta COBAS AmpliPrep Instrument te analizatora COBAS TaqMan 48 Analyzer (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, USA). Linearni raspon COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV testa iznosi od 43 HCV RNA IU/mL (international unit, IU) do 6.90E07 HCV RNA IU/mL.

Genotip HCV-a u ispitanika određen je primjenom testa Versant HCV Genotyping assay (LiPA, Bayer Diagnostics, Puteaux, Cedex, France) koji se temelji na kombinaciji PCR-a i hibridizacije. Ovaj test omogućava identifikaciju

genotipova i subtipova HCV-a: 1, 1a, 1b, 1a/1b, 2, 2a/2c, 2b, 3, 4, 5a i 6a.

HCV NS3-CINGVCWTV-specifični CD8<sup>+</sup> T-limfociti

#### Detekcija HCV-specifičnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita

Citotoksično-supresorski CD8<sup>+</sup> T-limfociti specifični za CINGVCWTV peptid NS3 proteina HCV-a (aminokiseline 47-55) u perifernoj krvi bolesnika detektirani su protočnim citometrom Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) primjenom dekstramera HLA-A\*0201 custom defined peptide APC CINGVCWTV (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark).

Ekspresija HLA-A2 alela u bolesnika određena je također protočnom citometrijom primjenom protutijela Mouse anti Human HLA-A2-RPE (ProImmune, Oxford, UK). Uzorci perifernе krvi prvo su obilježeni dekstramerom i inkubirani 15 min. na sobnoj temperaturi u mraku a zatim su inkubirani 10 minuta s protutijelima specifičnim za molekule CD45, CD3 i CD8. Uzorci su pripravljeni za analizu primjenom aparata Multi-Q-Prep i kompleta reagensa ImmunoPrep (Beckman Coulter, USA) a tijekom analize na citometru analizirano je 50,000 CD3+CD8<sup>+</sup> stanica. Uzorak perifernе krvi zdravog volontera tj. HLA-A\*0201-pozitivne HCV-negativne osobe korišten je kao kontrola specifičnosti dekstramerskog testa.

#### 3.3.4. Reagensi

Quantikine Human CXCL9 i CXCL10/IP-10 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Quantikine Human CXCL11 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)

COBAS AMPLICOR HCV Test, version 2.0 (Roche Diagnostics, Diagnostic System Pleasanton, CA)

Versant HCV 3.0 koji se temelji na principu „branched DNA“ tehnologije (Bayer Diagnostics, Puteaux, Cedex, France)

Versant HCV Genotyping assay (LiPA, Bayer Diagnostics, Puteaux, Cedex, France)

Dekstramer HLA-A\*0201 custom defined peptide APC CINGVCWTV (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

Mouse anti Human HLA-A2-RPE (ProImmune, Oxford, UK).

ImmunoPrep (Beckman Coulter, Fullerton, USA)

Monoclonal antibody anti human CD45-ECD (energy-coupled dye, clone J.33), Beckman Coulter, Fullerton, USA

Monoclonal antibody anti human CD3-PC5 (phycoerythrin cyanin 5, clone UCHT1), Beckman Coulter, Fullerton, USA

Monoclonal antibody anti human CD8-FITC (fluorescein isothiocyanate, clone SFCI21Thy2D3), Beckman Coulter, Fullerton, USA

COBAS TaqMan HCV Test For Use With the COBAS AmpliPrep Instrument and the COBAS TaqMan Analyzer or the COBAS TaqMan 48 Analyzer (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, USA)

### **3.3.5. Aparati**

1. COBAS TaqMan 48 Analyzer (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, USA)
2. Captia Reader optički čitač mikrotitracijskih pločica (Trinity Biotech, Ireland)
3. Cytomics FC500 protočni citometar (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
4. Multi-Q-Prep (Beckman Coulter, Fullerton, USA)

### **3.3.6. Patohistološka evaluacija stupanja aktivnosti hepatitisa i stadija fibroze.**

Bioptat jetre bio je evaluiran po Ishakovoj modifikaciji Knodellova indeksa (99).

Patohistološka analiza učinjena je u Zavodu za patohistologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Tablica 3. Patohistološka evaluacija stupnja aktivnosti hepatitisa i fibroze po Ishaku.

| <b>STUPANJ AKTIVNOSTI</b>                                                 |                                                      |    |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----|
| PERIPORTALNE I<br>PERISEPTALNE<br>PIECEMEAL<br>NEKROZE                    | ODSUTNE                                              | 0  |
|                                                                           | FOKALNE, NEKI PORTALNI PROSTORI                      | 1  |
|                                                                           | FOKALNE, VEĆINA PORTALNI PROSTORA                    | 2  |
|                                                                           | KONTINUIRANE U <50% P.P.                             | 3  |
|                                                                           | KONTINUIRANE U >50% P.P.                             | 4  |
| KONFLUIRAJUĆE I<br>PREMOŠTAVAJUĆE<br>NEKROZE                              | ODSUTNE                                              | 0  |
|                                                                           | FOKALNE KONFLUIRAJUĆE NEKROZE                        | 1  |
|                                                                           | KONFLUIRAJUĆE NEKROZE OKO NEKIH<br>CENTRALNIH VENA   | 2  |
|                                                                           | KONFLUIRAJUĆE NEKROZE OKO VEĆINE<br>CENTRALNIH VENA  | 3  |
|                                                                           | MJESTIMIČNE PORTOCENTRALNE<br>PREMOŠTAVAJUĆE NEKROZE | 4  |
|                                                                           | MULTIPLE PREMOŠTAVAJUĆE NEKROZE                      | 5  |
|                                                                           | MULTILOBULARNA NEKROZA                               | 6  |
| FOKALNE NEKROZE<br>APOPTOZA<br>ŽARIŠNA UPALA                              | ODSUTNE                                              | 0  |
|                                                                           | 1 ŽARIŠTE                                            | 1  |
|                                                                           | 2-4 ŽARIŠTA                                          | 2  |
|                                                                           | 5-10 ŽARIŠTA                                         | 3  |
|                                                                           | VIŠE OD 10 ŽARIŠTA                                   | 4  |
| PORTALNA UPALA                                                            | ODSUTNA                                              | 0  |
|                                                                           | OSKUDNA                                              | 1  |
|                                                                           | UMJERENA                                             | 2  |
|                                                                           | UMJERENA DO OBILNA U SVIM PORTALNIM<br>PROSTORIMA    | 3  |
|                                                                           | OBILNA U SVIM PORTALNIM PROSTORIMA                   | 4  |
| UKUPNO NAJVIŠE BODOVA                                                     |                                                      | 18 |
| <b>STADIJ FIBROZE</b>                                                     |                                                      |    |
| BEZ FIBROZE                                                               |                                                      | 0  |
| FIBROZA NEKIH PORTALNIH PROSTORA                                          |                                                      | 1  |
| FIBROZA VEĆINE PORTALNIH PROSTORA                                         |                                                      | 2  |
| FIBROZA VEĆINE P.P. S MJESTIMIČNIM PORTOPORTALNIM<br>VEZIVNIM SEPTIMA     |                                                      | 3  |
| FIBROZA PP S OBILNIM PORTOPORTALNIM I PORTOCENTRALNIM<br>VEZIVNIM SEPTIMA |                                                      | 4  |
| OBILNA VEZIVNA SEPTA S MJESTIMIČNIM REGENERATORNIM<br>ČVORIĆIMA           |                                                      | 5  |
| CIROZA ( VJEROJATNA ILI SIGURNA)                                          |                                                      | 6  |
| UKUPNO NAJVIŠE BODOVA                                                     |                                                      | 6  |

### **3.4. Analiza rezultata i statistička obrada**

Nakon provedenog liječenja bolesnici su diferencirani u dvije grupe, onu s dobrim i lošim odgovorom na terapiju. Dobar odgovor podrazumjeva nemjerljivu viremiu metodom HCV RNA PCR (u prvih 12 tjedana terapije dobrim odgovorom se smatra i pad viremije za više od 2 logaritma od početnih vrijednosti). Kategorijski podaci izraženi su u frekvenciji i relevantnom postotku. Značaj opaženih razlika u frekvencijama unutar relevantnih podgrupa testiran je Chi-square testom ili Fisher s exact testom kada je primjereno. Za kontinuirane varijable izračunate su srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom ili vrijednosti mediana sa dvadeset petom i sedamdeset petom percentilom ovisno o distribuciji. Razlike između subgrupa od interesa testirane su Wilcoxon rank-sum testom. Longitudinalno praćenje podataka koncentracije kemokina vođeno je u odnosu na osobe s dobrim odgovorom na terapiju i bez njega. Generalizirani mješani linearni model efekta je korišten da bi se bolje predvidjeli faktori nezavisno povezani sa koncentracijom citokina u različitim vremenskim intervalima od početka liječenja. U model smo uključili bazične varijable koji su se značajno razlikovale između osoba s dobrim i lošim odgovorom nakon univarijante analize. Da bismo saznali prediktivnu vrijednost koncentracije kemokina na početku i nakon 4 tjedna liječenja u odnosu na ishod terapije koristili smo se ROC krivuljom ( receiver operating characteristics curve). Područje ispod krivulje (AUC) koje predstavlja pozitivnu prediktivnu vrijednost te područje negativne prediktivne vrijednosti određne su prema ROC krivulji da bi se ocijenila prediktivna efikasnost serumskih kemokina. P vrijednosti manje od 0.05 su smatrane značajnima. Sve analize učinjene su korištenjem SAS for Windows, verzija 9.2 SAS Institute Inc.

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Bazične karakteristike bolesnika uključenih u studiju**

U studiju je uključeno 46 bolesnika s kroničnim hepatitisom C i genotipom 1 kod kojih je provedena terapija pegiranim interferonom alfa2b i ribavirinom.

U tablicama 4a, 4b, 4c i 4d prikazani su njihovi osnovni demografski podaci.

Liječeni su bolesnici u rasponu dobi od 22 do 67 godina. Prosječna dob uključenih pacijenata bila je 41,5 godinu (SD $\pm$  12,4 godine).

Prema spolu bilo je 17 muškaraca i 29 žena.

Svi osim dvoje bolesnika imali su trajno povišene vrijednosti aminotransferaza. Prosječna vrijednost ALT bila je 95 IU/ml.

Median tjelesne težine bio je 68,5 kg ( u rasponu od minimalih 50 kg do maksimalnih 97 kg). Kod svih bolesnika prije terapije je učinjena biopsija jetre te je medijan fibroze po Knodell-Ishaku iznosio 3 (raspon 2-6) a medijan histološke upalne aktivnosti bio je 8 ( raspon 4-17) što je prikazano na grafikonu 1 i 2.

Visina viremije na početku liječenja bila je prosječno 967000 IU/ml, (u rasponu od najniže 1505 IU/ml do najviše 9470000 IU/ml). Medijan viremije iznosio je 354132 IU/ml. Većina bolesnika (52%) bila je inficirana s HCV genotipom 1b.



Tablica 4a. Bazične karakteristike bolesnika uključenih u studiju

| Karakteristike bolesnika (n=46)                     | Vrijednost                   |
|-----------------------------------------------------|------------------------------|
| Demografske karakteristike                          |                              |
| Dob (srednja±SD), godine                            | 41.5±12.4                    |
| Spol (n, %)                                         |                              |
| Ženski                                              | 29 (63%)                     |
| Muški                                               | 17 (37%)                     |
| Težina (median, raspon) kg                          | 68.5 (50-97)                 |
| Rasa                                                |                              |
| Caucasian, broj (n,%)                               | 46 (100%)                    |
| HCV genotip (n, %)                                  |                              |
| genotip 1a                                          | 9 (19.5%)                    |
| genotip 1b                                          | 24 (52.3%)                   |
| genotip 1                                           | 13 (28.2%)                   |
| Biopsija jetre (ISHAK score)                        |                              |
| Fibroza; median (raspon)                            | 3 (2-6)                      |
| Histološki indeks aktivnosti (HAI); median (raspon) | 8 (4-17)                     |
| HCV RNA (IU/ml) prije liječenja, median (raspon)    | 354 132<br>(1 505-9 470 000) |

Tablica 4b. Početna viremija bolesnika uključenih u studiju

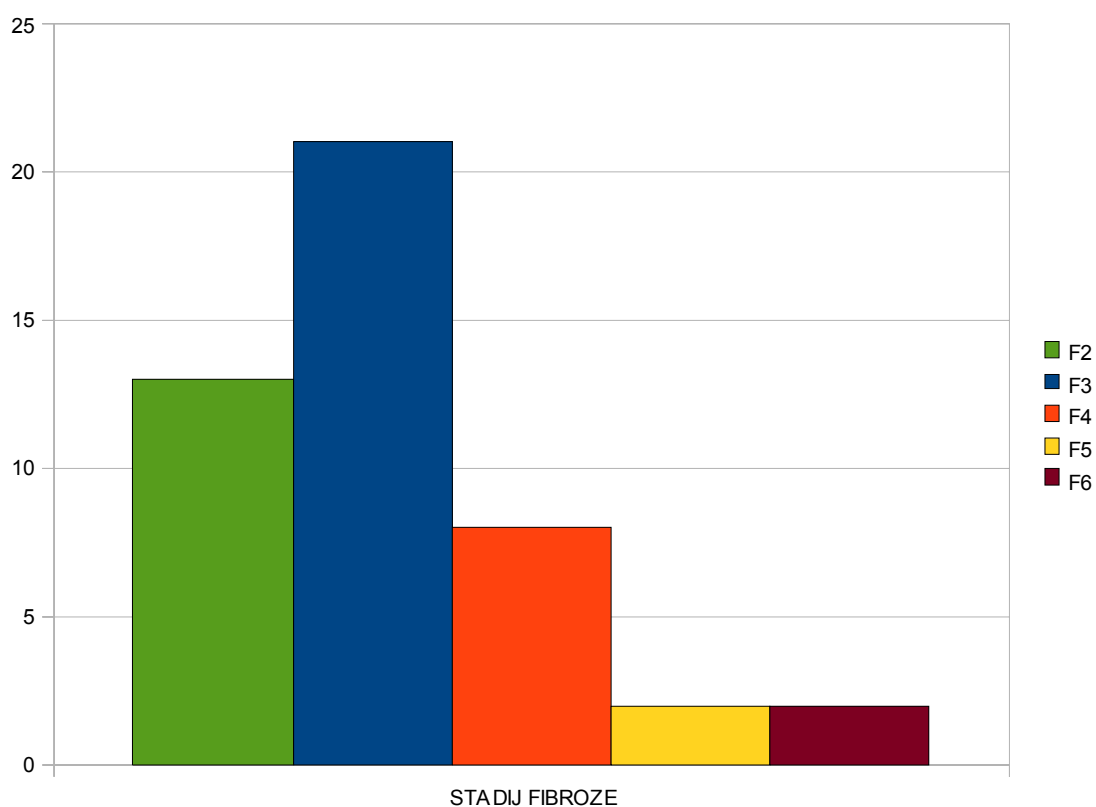
|                       |                       |          |
|-----------------------|-----------------------|----------|
| VIREMIJA<br>( IU/ml ) | UKUPNO BOLESNIKA      | 46       |
|                       | PROSJEČNA VRIJEDNOST  | 967000   |
|                       | STANDARDNA DEVIJACIJA | 1,61E+04 |
|                       | MIN                   | 1505     |
|                       | MAX                   | 9470000  |

Tablica 4c . HAI index bolesnika uključenih u studiju

|                                     |                  |    |
|-------------------------------------|------------------|----|
| UPALNA<br>AKTIVNOSTI<br>(HAI INDEX) | UKUPNO BOLESNIKA | 46 |
|                                     | MEDIAN           | 8  |
|                                     | 25.PERCENTILA    | 6  |
|                                     | 75.PERCENTILA    | 9  |
|                                     | MIN              | 4  |
|                                     | MAX              | 17 |

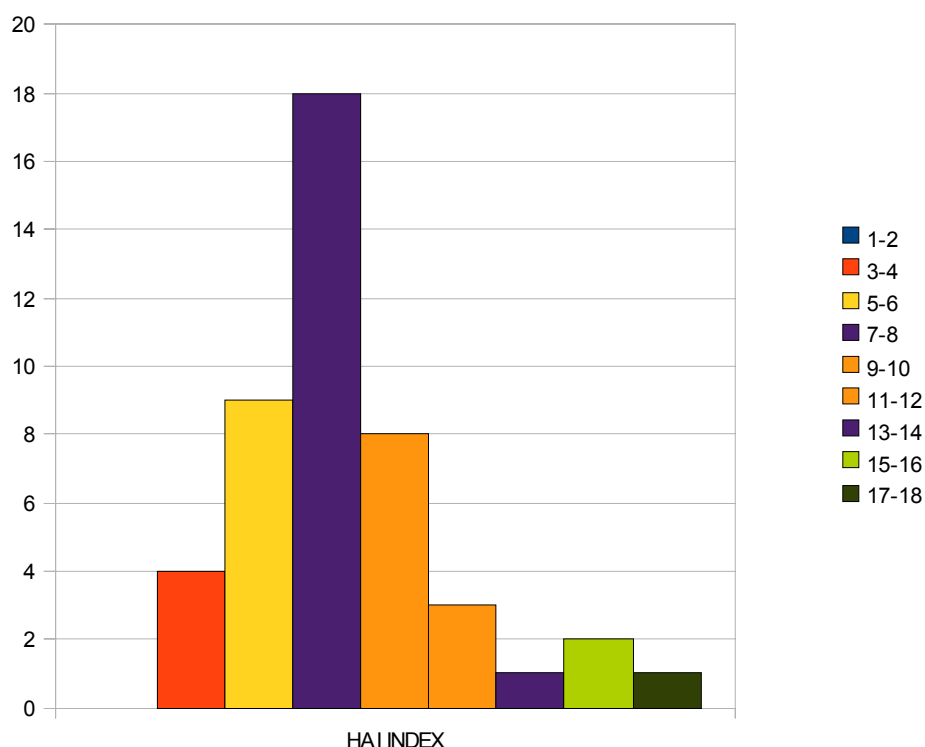
Tablica 4d. Stadij fibroze bolesnika uključenih u studiju

| STADIJ FIBROZE |   |      |
|----------------|---|------|
| F2             | n | 13   |
|                | % | 28,3 |
| F3             | n | 21   |
|                | % | 45,7 |
| F4             | n | 8    |
|                | % | 17,4 |
| F5             | n | 2    |
|                | % | 4,3  |
| F6             | n | 2    |
|                | % | 4,3  |



Grafikon 1. Stupanj fibroze u liječenih bolesnika

Prema stadiju fibroze, 13 bolesnika imalo je stadij fibroze 2, 21 bolesnik imao je stadij fibroze 3, 8 bolesnika stadij fibroze 4, 2 bolesnika stadij fibroze 5 te 2 bolesnika stadij fibroze 6. (Prosječna vrijednost ocjene za fibrozu 3,1).



Grafikon 2. HAI Index u liječenih bolesnika

Biopsija jetre pokazala je po Ishakovoj modifikaciji Knodellova indeksa median upalne aktivnosti 8 (raspon od 4 do 17).

#### 4.2. Virusološki odgovor u liječenih bolesnika

Nakon započinjanja terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom, brzi virusološki odgovor ( RVR, rapid viral response, nakon 4 tjedna terapije) imalo je 18 od 46 bolesnika (39%).

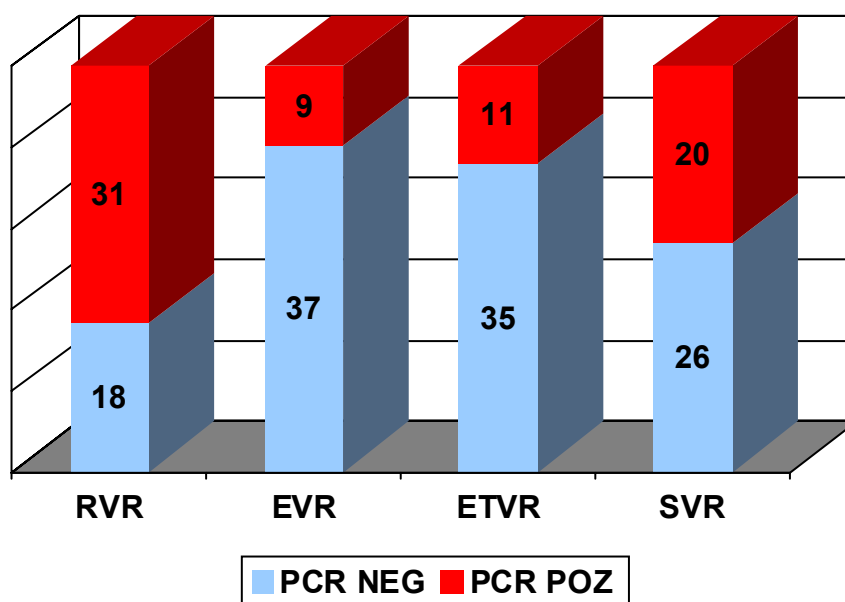
Rani virusni odgovor (EVR, early viral response, nakon 12 tjedana terapije) imalo je 37 od 46 (80,4%) bolesnika

Dobar odgovor na kraju terapije (ETR, end of treatment response) postignut je u je 35 od 46 (76%) bolesnika.

Kod dvoje bolesnika bio je prisutan proboj viremije u toku terapije.

Trajni odgovor na terapiju (SVR, sustained viral response) imalo je 26 od 46 (56,5%) bolesnika.

Devet bolesnika je replapsiralo nakon prekida liječenja (25,7%).

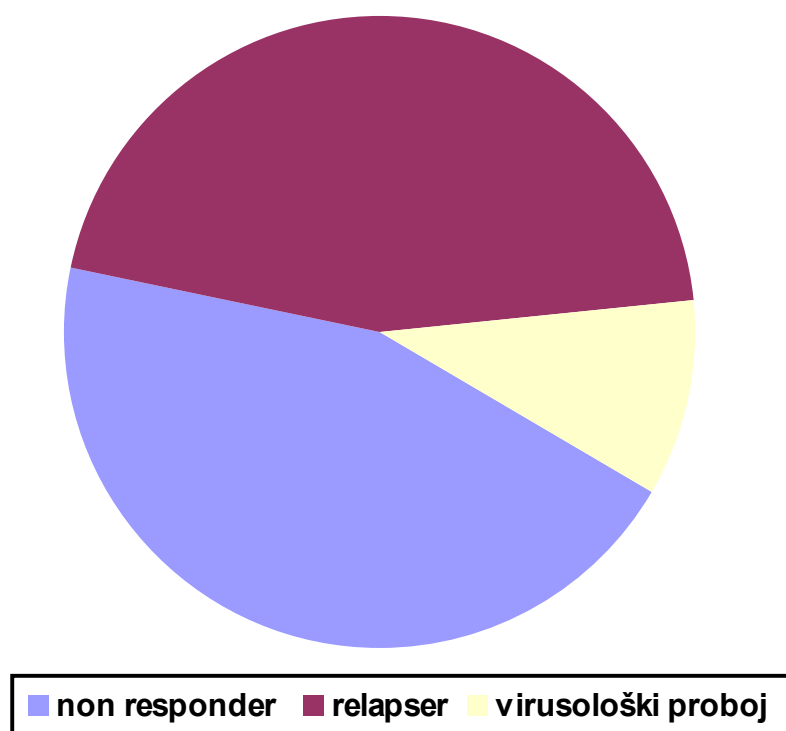


Grafikon 3. Virusološki odgovor (RVR;EVR;ETVR i SVR) u toku liječenja

Tablica 5. Virusološki odgovor u toku terapije HCV infekcije

|                  | RVR- 4 tj | EVR-12 tj | ETR-48 tj | SVR (+24 tj) |
|------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| HCV RNA 0*       | 18        | 37        | 35        | 26           |
| HCV RNA +        | 31        | 9         | 11        | 20           |
| Ukupno bolesnika | 46        | 46        | 46        | 46           |

\*HCV RNA kod odgovora nakon 12 tjedana ( EVR) smatra se uspješnim ako je pad viremije za 2 ili više log od početne viremije



Grafikon 4. Udio non respondera, relapsera i virusološkog proboja među bolesnicima koji nisu postigli trajni odgovor na terapiju

Non-SVR kod ukupno 20 bolesnika, a od toga non responderi 9, relapseri 9 te virusološki proboj 2 bolesnika.

Tablica 6. Ishod liječenja ispitanika obzirom na RVR, EVR, ETVR i SVR

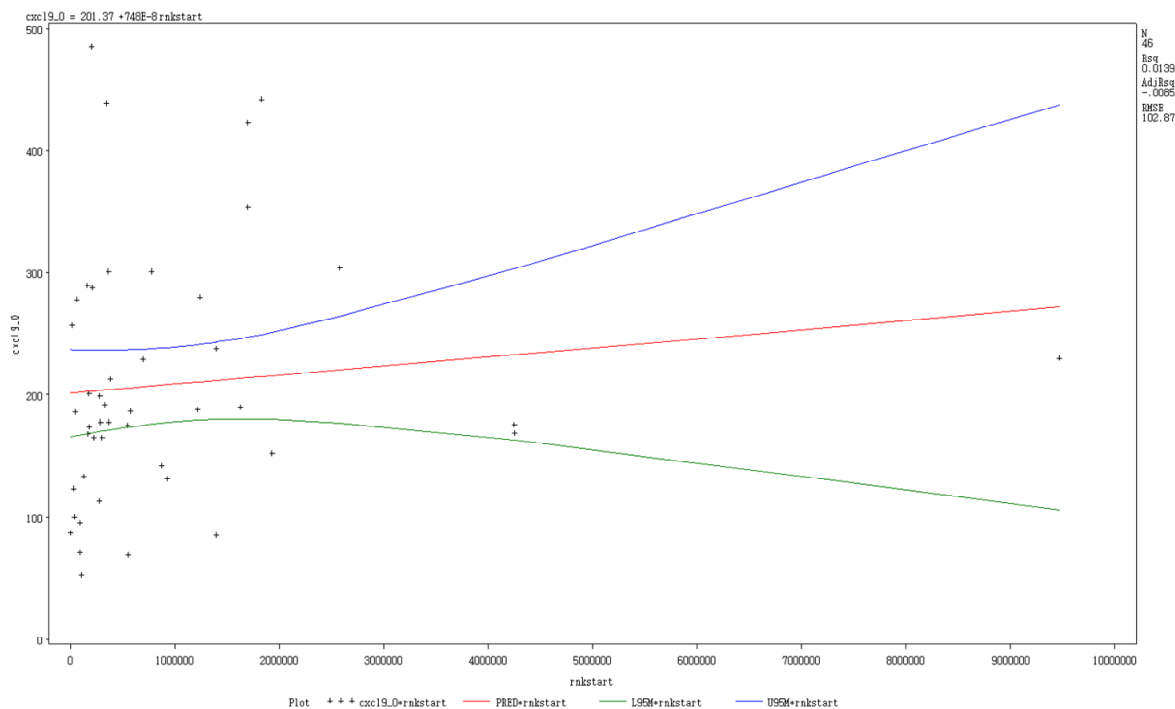
| ID | RVR | EVR | +ETR | SVR           |
|----|-----|-----|------|---------------|
| 1  | +   | +   | +    | +             |
| 2  | -   | +   | +    | +             |
| 3  | -   | +   | +    | +             |
| 4  | +   | +   | +    | +             |
| 5  | +   | +   | +    | +             |
| 6  | -   | +   | +    | +             |
| 7  | -   | +   | +    | +             |
| 8  | -   | -   | -    | NON RESPONDER |
| 9  | +   | +   | +    | +             |
| 10 | -   | -   | +    | RELAPSER      |
| 11 | -   | +   | +    | +             |
| 12 | -   | +   | +    | RELAPSER      |
| 13 | -   | +   | +    | +             |
| 14 | -   | +   | +    | RELAPSER      |
| 15 | +   | +   | +    | +             |
| 16 | -   | +   | +    | +             |
| 17 | -   | -   | +    | RELAPSER      |
| 18 | +   | +   | +    | +             |
| 19 | -   | +   | -    | BREAKTHROUGH  |
| 20 | -   | +   | +    | +             |
| 21 | -   | +   | +    | +             |
| 22 | -   | +   | +    | RELAPSER      |
| 23 | -   | +   | +    | RELAPSER      |
| 24 | -   | +   | -    | BREAKTHROUGH  |
| 25 | -   | +   | -    | BREAKTHROUGH  |
| 26 | -   | +   | -    | BREAKTHROUGH  |
| 27 | -   | -   | -    | NON RESPONDER |
| 28 | -   | -   | -    | NON RESPONDER |
| 29 | -   | +   | +    | RELAPSER      |
| 30 | -   | +   | +    | RELAPSER      |
| 31 | -   | +   | +    | RELAPSER      |
| 32 | -   | -   | -    | NON RESPONDER |
| 33 | -   | -   | -    | NON RESPONDER |
| 34 | -   | -   | -    | NON RESPONDER |
| 35 | -   | -   | -    | NON RESPONDER |
| 36 | +   | +   | +    | +             |
| 37 | +   | +   | +    | +             |
| 38 | +   | +   | +    | +             |
| 39 | +   | +   | +    | +             |
| 40 | +   | +   | +    | +             |
| 41 | +   | +   | +    | +             |
| 42 | +   | +   | +    | +             |
| 43 | +   | +   | +    | +             |
| 44 | +   | +   | +    | +             |
| 45 | +   | +   | +    | +             |
| 46 | +   | +   | +    | +             |

#### 4.3. Povezanost koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 s dobi, visinom HCV viremije i indeksom histološke aktivnosti.

Koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 mjerene su prije liječenja, te nakon 4, 12 i 24 tjedna liječenja. Koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 bile su značajno veće u bolesnika s kroničnim hepatitisom C nego u zdravih kontrola.

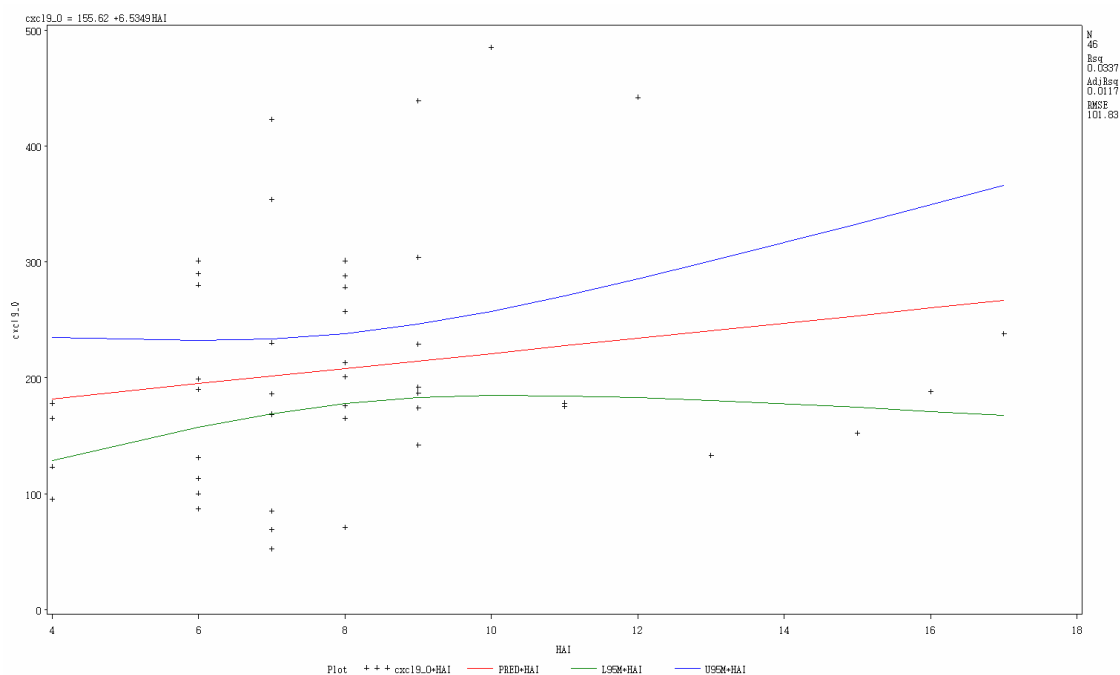
Prije analize povezanosti koncentracija kemokina s ishodom terapije (dobar ili loš odgovor na terapiju) usporedili smo inicijalne koncentracije pojedinih kemokina s drugim mogućim parametrima vezanim za ishod liječenja a to su visina viremije, upalna aktivnost i dob bolesnika.

Za kemokin CXCL9 nije nađena značajna povezanost inicijalnih vrijednosti niti sa visinom viremije ( $p=0.436$ ), niti sa dobi bolesnika ( $p=0,802$ ), niti sa upalnom aktivnosti ( $p=0,221$ ) prije terapije što je prikazano na grafikonima 5a, 5b i 5c

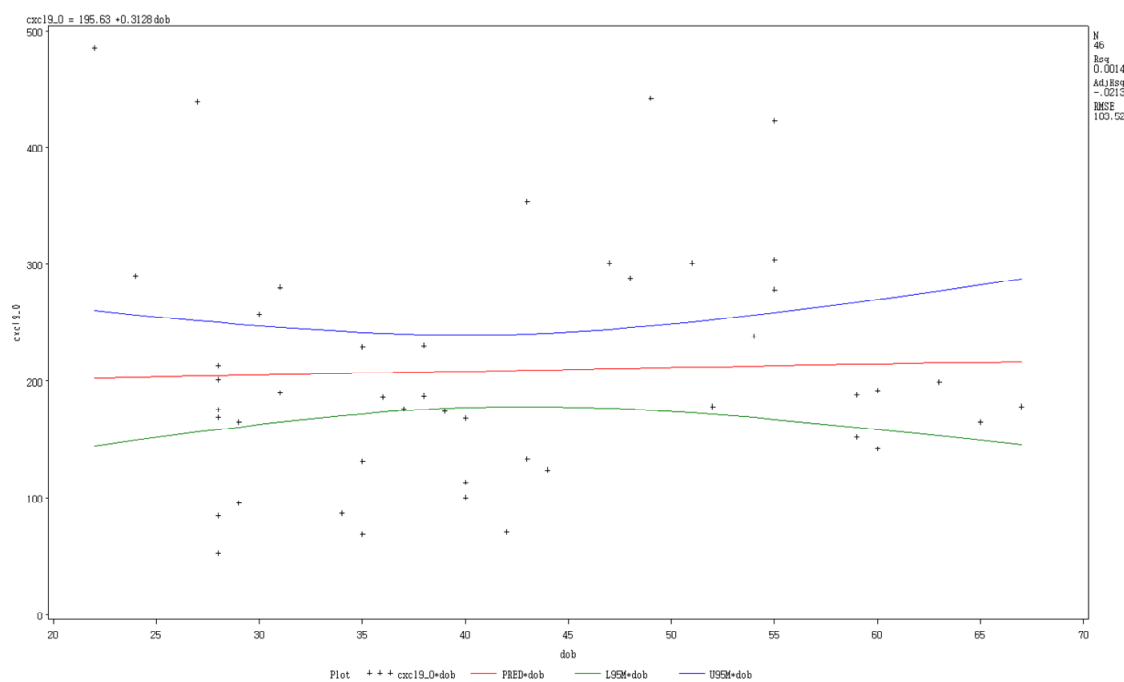


P=0.436

Grafikon 5a. Odnos inicijalnih vrijednosti HCV RNK i CXCL9



Grafikon 5b Odnos inicijalnih vrijednosti HAI indeksa i CXCL9 (p=0,221)

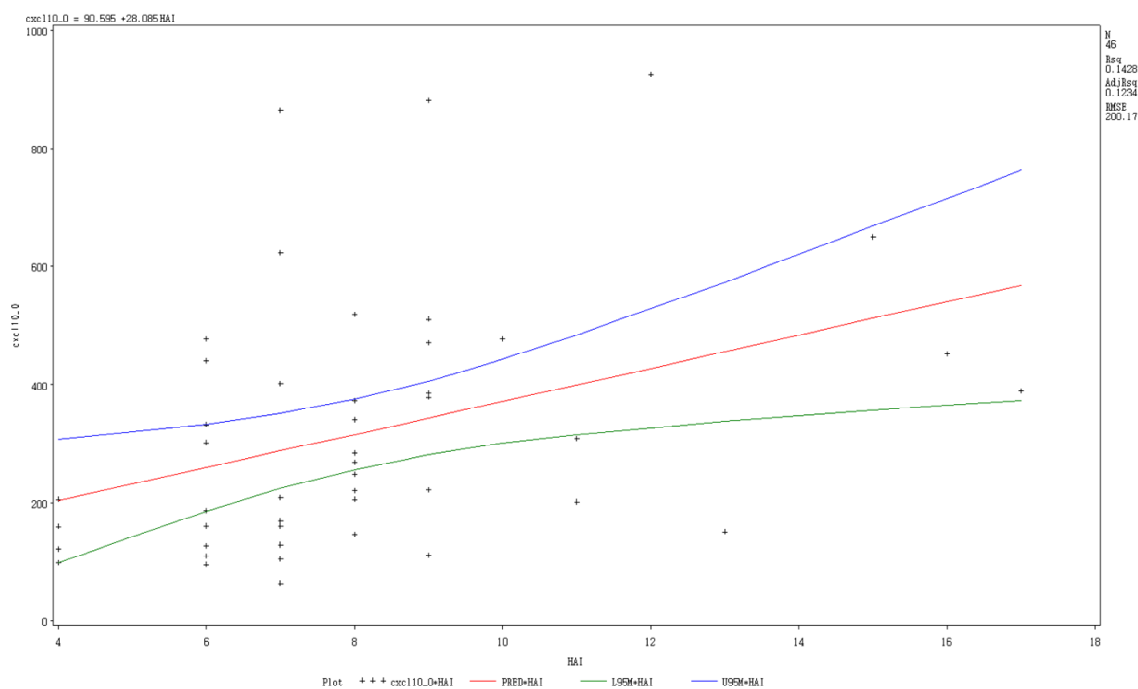


P=0.802

Grafikon 5c. Odnos dobi i inicijalne vrijednosti CXCL9

Rezultati povezanosti stupnja histološke aktivnosti, viremije i dobi s početnim koncentracijama CXCL10 prikazani su na grafikonima 6a, 6b i 6c. Za kemokin CXCL10 nadena je povezanost inicijalnih vrijednosti i stupnja histološke upalne aktivnosti (p=0,010) prije terapije.

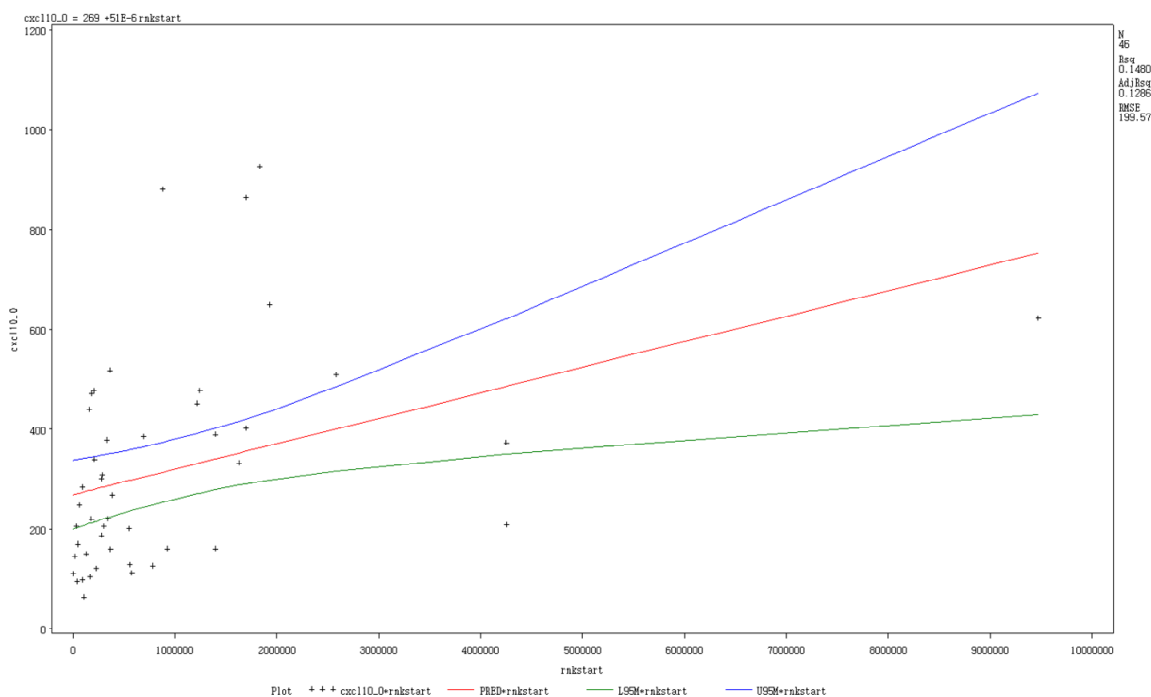




P=0.010

Grafikon 6a. Povezanost HAI indeksa i inicijalnih vrijednosti CXCL10

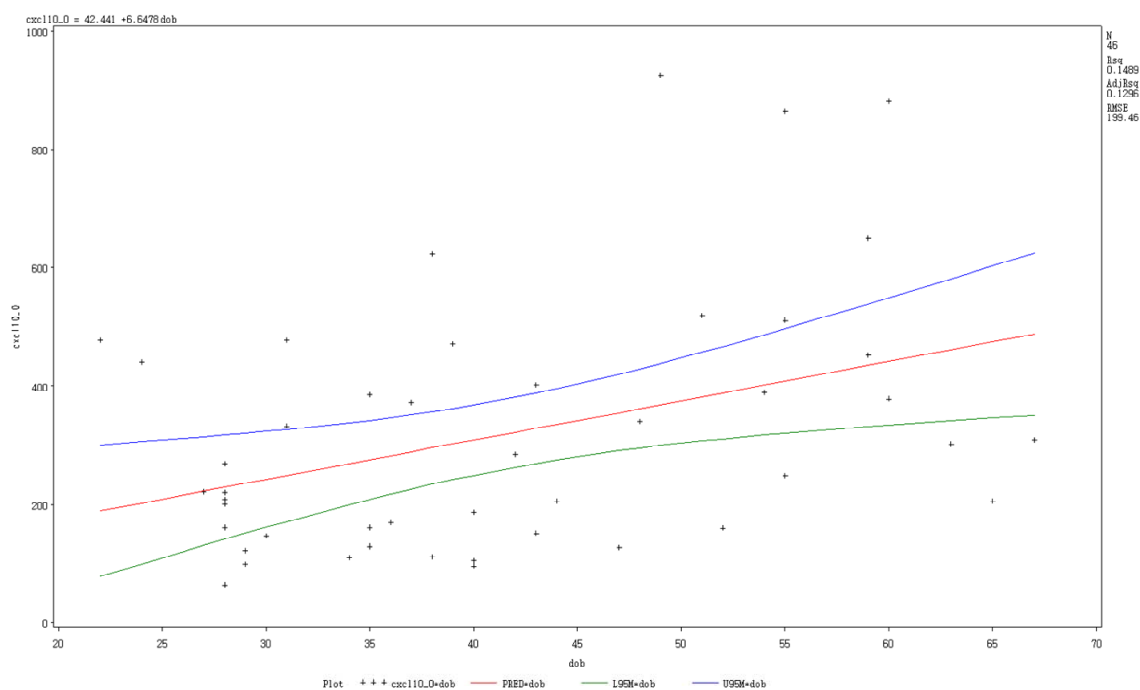
Bolesnici s inicijalno višom viremijom imali su značajno povišene vrijednosti kemokina CXCL10 (p=0,008)



P=0.008

Grafikon 6b. Povezanost HCV RNA viremije i inicijalnih vrijednosti CXCL10

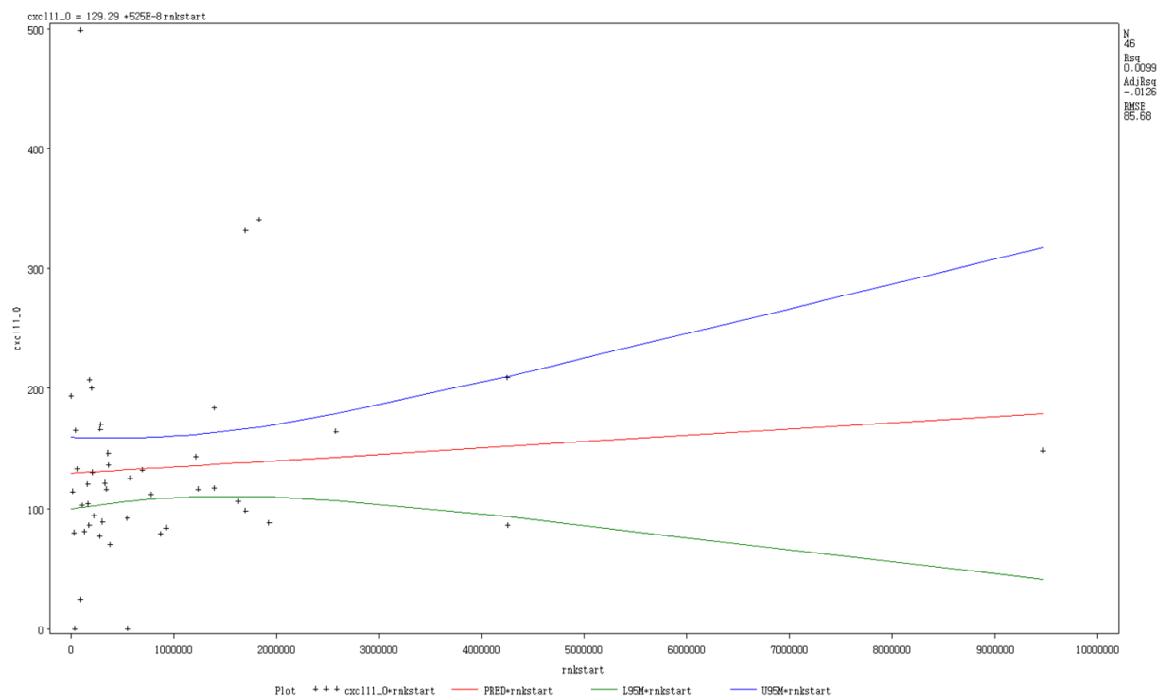
Također je nađena povezanost starije dobi i inicijalno povišene vrijednosti kemokina CXCL10 (  $p=0,008$  ).



$P=0.008$

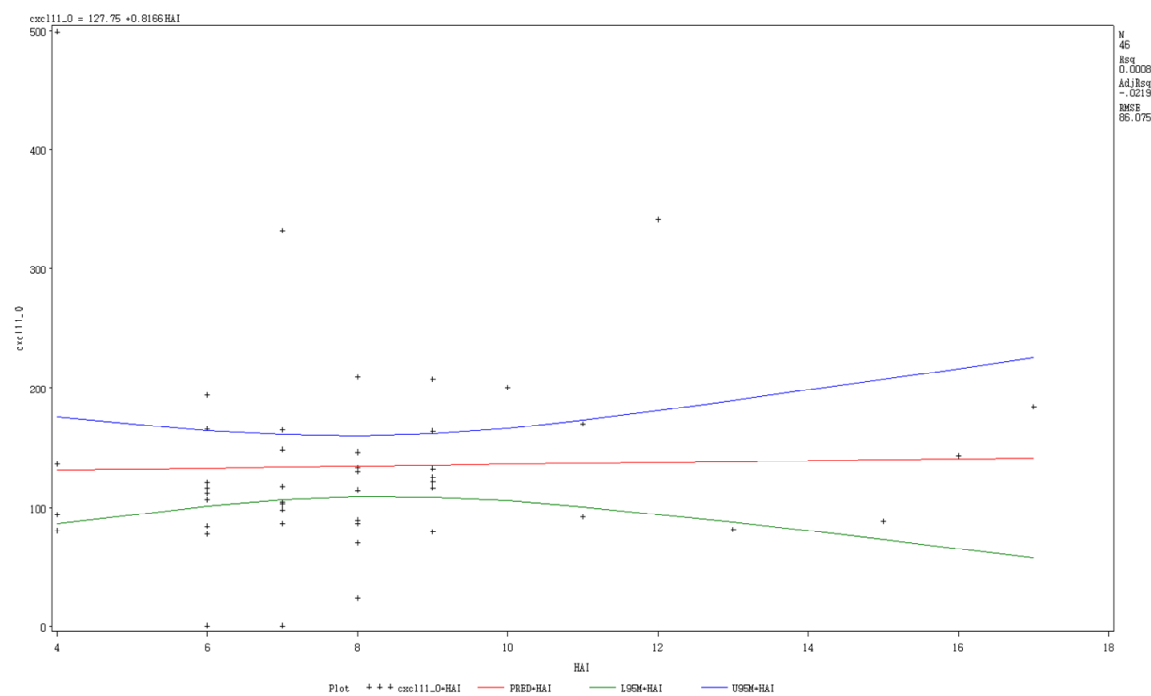
Grafikon 6c. Povezanost dobi i inicijalnih vrijednosti CXCL10

Za inicijalne vrijednosti kemokina CXCL11 nije nađena korelacija niti s visinom viremije prije terapije ( $p=0,511$ ) niti sa stupnjem upalne aktivnosti ( $p=0,856$ ) niti sa dobi ( $p=0,659$ ), što je prikazano na grafikon 7a, 7b i 7c.



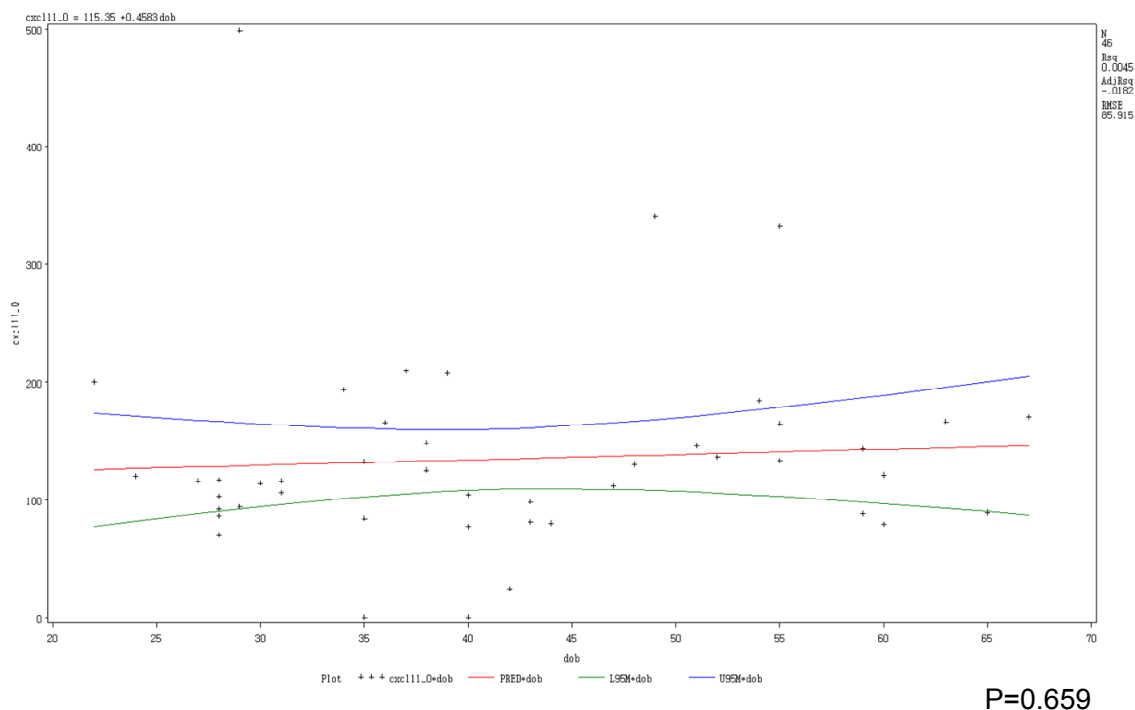
P=0.511

Grafikon 7 a. Odnos inicijalnih vrijednosti HCV RNA i vrijednosti CXCL11



P=0.856

Grafikon 7 b. Odnos HAI indeksa i inicijalnih vrijednosti CXCL11



Grafikon 7 c. Povezanost dobi i inicijalnih vrijednosti CXCL11

#### 4.4. Koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u odnosu na SVR ili non-SVR

Koncentracije kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 su praćene u toku primjene antivirusne terapije te smo usporedili njihovu dinamiku u toku liječenja unutar grupe s trajnim odgovorom (SVR) i grupe bolesnika kod kojih nije postignuto trajno izlječenje (non-SVR) (Tablica 7). Kemokinski odgovor u toku terapije kroničnog hepatitisa C pegiliranim interferonom alfa2b razlikuje se za sva tri ispitivana kemokina. Kod CXCL9 nalazimo smanjivanje od bazičnih vrijednosti ali održanu razliku između SVR i non-SVR grupe (118 pg/ml vs 176 pg/ml nakon 4 tjedna) te također kasnije u toku liječenja. Kod CXCL10 izraženija je dihotomija između SVR i non-SVR grupe na početku terapije i naročito nakon 4 tjedna terapije pa je u non-SVR grupi CXCL10 u porastu od početnog medijana 395 pg/ml na 424 pg/ml, a u SVR grupi pada sa početnih 185pg/ml na 156pg/ml. Nakon 12 i 24 tjedna vrijednosti CXCL10 za SVR i non-SVR grupu su u smanjivanju, ali međusobne razlike koncentracije su značajne.

Razlike u koncentracijama CXCL9 i CXCL10 u grupama SVR i non-SVR bile su statistički značajne ( $p=0.002$  i  $p < 0.0001$ ) Razlika u koncentraciji CXCL11 između SVR i non-SVR grupa nisu statistički značajne ( $p=0.143$ ).

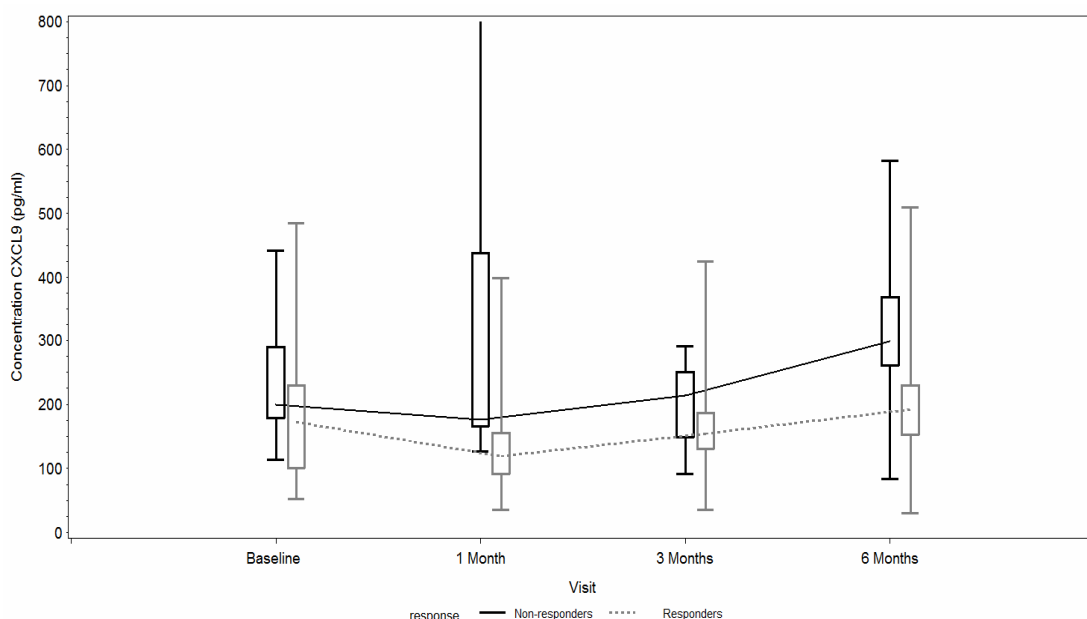
Tablica 7. Koncentracije kemokina u plazmi bolesnika s kroničnim hepatitisom C bazirane na odgovoru na liječenje pegiliranim interferonom alfa2 i ribavirinom

| Kemokin<br>(pg/ml, median, range) | Koncentracije kemokina u plazmi bolesnika s<br>kroničnim hepatitisom C bazirane na odgovoru na<br>liječenje pegiliranim interferonom alfa2 i ribavirinom |                    |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|                                   | SVR<br>n=26 bolesnika                                                                                                                                    | Non-SVR<br>n=20    |
| <b>CXCL9</b>                      |                                                                                                                                                          |                    |
| Prije terapije                    | 171.5<br>(52-485)                                                                                                                                        | 200<br>(113-442)   |
| 4 tjedna terapije                 | 118.5<br>(36-399)                                                                                                                                        | 176<br>(126-1990)  |
| 12 tjedana terapije               | 153.5<br>(35-425)                                                                                                                                        | 214<br>(92-290)    |
| 24 tjedna terapije                | 191.5<br>(30-510)                                                                                                                                        | 298<br>(84-583)    |
| <b>CXCL10</b>                     |                                                                                                                                                          |                    |
| Prije terapije                    | 185<br>(63-518)                                                                                                                                          | 395.5<br>(111-926) |
| 4 tjedna terapije                 | 156<br>(92-396)                                                                                                                                          | 424<br>(90-815)    |
| 12 tjedana terapije               | 199<br>(105-780)                                                                                                                                         | 277.5<br>(108-674) |
| 24 tjedna terapije                | 202<br>(80-650)                                                                                                                                          | 272<br>(76-514)    |
| <b>CXCL11</b>                     |                                                                                                                                                          |                    |
| Prije terapije                    | 109<br>(0-499)                                                                                                                                           | 127.5<br>(77-341)  |
| 4 tjedna terapije                 | 96.5<br>(0-211)                                                                                                                                          | 135.5<br>(94-304)  |
| 12 tjedana terapije               | 97.5<br>(5-267)                                                                                                                                          | 120.5<br>(81-167)  |
| 24 tjedna terapije                | 114<br>(82-267)                                                                                                                                          | 127<br>(81-203)    |

Objašnjenje za tablicu 7: Razlike za koncentracije CXCL9 i CXCL11 između grupe sa SVR i non-SVR bile su statistički značajne ( $p=0.002$  i  $p<0.0001$ ), razlike za koncentraciju CXCL11 između SVR i non-SVR grupe nije bilo statistički značajno ( $p=0.143$ ).

#### 4.5. Profil kretanja koncentracija CXCL9, CXCL10 i CXCL10 u toku terapije kronične HCV infekcije pegiliranim interferonom i ribavirinom

Koncentracije CXCL9 snizile su se u odnosu na početne vrijednosti u obje grupe bolesnika - medijan 171.5 te 200 pg/ml (s trajnim odgovorom i bez njega). Vrijednosti prije započinjanja terapije manje su se razlikovale nego kasnije u toku terapije između grupe sa i bez SVRa. Vrijednosti CXCL9 snižavale su se u toku terapije kod respondera i kod non respondera na mjeranjima u 4 i 12 tjednu, dok su non responderi/relapseri imali više vrijednosti u 24 tjednu. Najveće koncentracije zabilježne su u grupi bez trajnog odgovora nakon 24tj liječenja (298 pg/ml). Razlike u CXCL9 koncentraciji između SVR i non SVR grupe bile su statistički značajne ( $p=0.002$ ) što prikazuje grafikon 8.

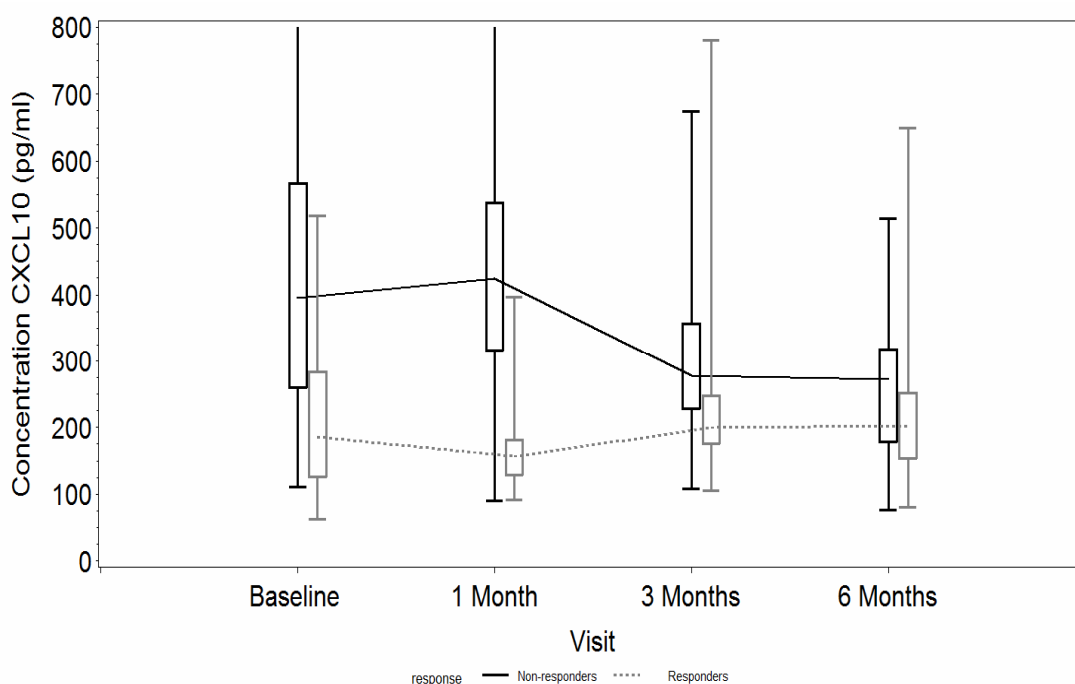


Grafikon 8 Koncentracije CXCL9 u toku terapije obzirom na SVR/non-SVR (glimix  $p=0,002$ )

Vrijednosti CXCL10 pokazale su dva različita kretanja ovisno o SVR ili non-SVRu. One su bile znatno više u bolesnika koji nisu na kraju liječenja postigli trajni odgovor, ne samo prije početka terapije već i u svim točkama provjere u toku terapije (4 tj, 12 tj, 24 tj) ( $p=0,006$ ).

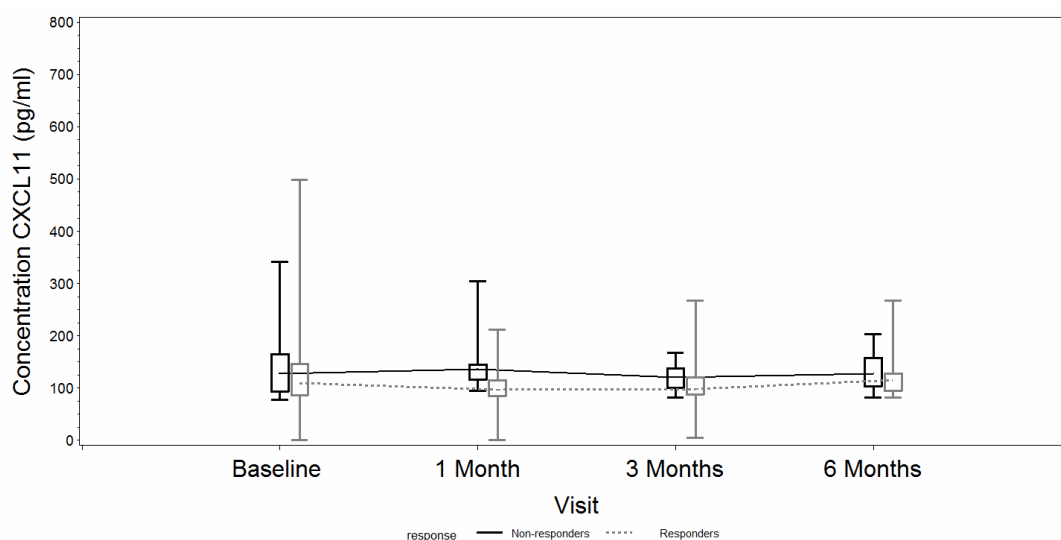
Nakon 4 tjedna terapije bolesnici s trajnim dobrim odgovorom imali su pad koncentracije CXCL10 (medaijan 185pg/ml na početku vs 156 pg/ml nakon

4 tjedna). Suprotno tome koncentracije CXCL10 u non-SVR bolesnika uvećale su se s početnog medijana 395,5 pg/ml na 424 pg/ml nakon 4 tjedna liječenja. Nakon 12 tjedana bilježi se pad koncentracija kemokina i u grupi s dobrim i onoj s lošim odgovorom, no apsolutne vrijednosti CXCL10 su kod non respondera i relapsera stalno značajno više. Takvo stanje se održava i u 24 tjednu terapije. Postoji statistički značajna razlika ( $p < 0.0001$ ) u koncentracijama CXCL10 između SVR i non SVR nakon 12 i 24 tjedna terapije. Pacijenti čija je viremija u početku trenutno pala, ali bez trajnog odgovora, dakle relapseri, imali su sličan profil vrijednosti kemokina CXCL10 kao non responderi. (Grafikon 9)



Grafikon 9. Koncentracije CXCL10 u toku terapije obzirom na SVR/non-SVR (glimix  $p < 0.0001$ )

Vrijednosti CXCL11 mjerene u toku terapije nisu se razlikovale u odnosu SVR ili non-SVR. Nije bilo korelacije između početnih vrijednosti i ishoda liječenja (medijan 109pg/ml vs 127pg/ml). Nakon 24 tjedna terapije pegiliranim interferonom alfa2a i ribavirinom medijan koncentracije CXCL11 u SVR grupi bio je 114pg/ml a u non-SVR grupi 127pg/ml. Vrijednosti CXCL11 nisu pokazivale značajnijih odstupanja u toku terapije i nisu bile statistiki značajne između SVR i non-SVR grupe ( $p = 0.143$ )



Grafikon 10. Koncentracija CXCL11 u toku terapije u odnosu na SVR/non-SVR (glimix  $p=0.143$ )

#### 4.6. Multivariatna analiza parametara povezanih s koncentracijom kemokina CXCL9 i CXCL10 na ishod liječenja pegiliranim interferonom i ribavirinom

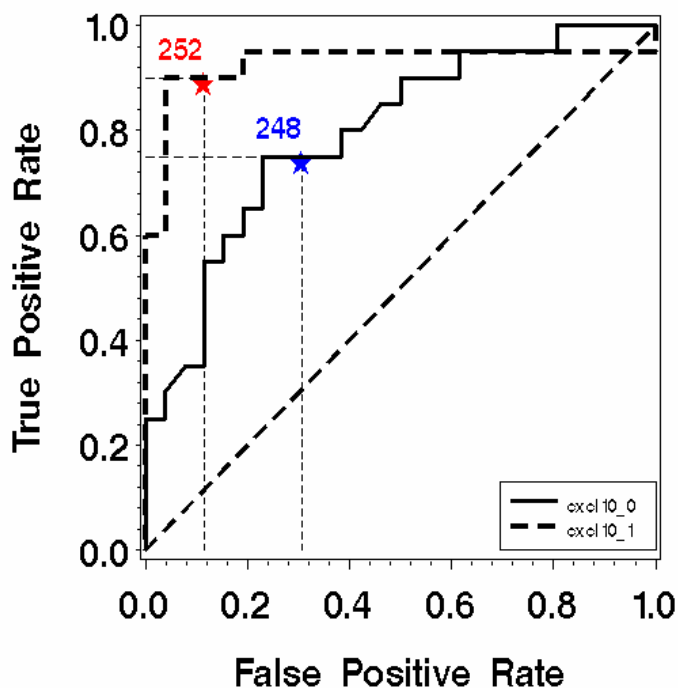
Multivariatna analiza parametara povezanih s koncentracijom kemokina u toku liječenja pegiliranim interferonom i ribavirinom (generalizirani linearni mješani model) pokazala je značajnu povezanost neuspjeha terapije s višim koncentracijama CXCL10 (nakon korekcije za HCV RNA visinu viremije, stadij fibroze te indeks upalne aktivnosti koji su također mogući prediktori odgovora) što je prikazano na tablici 8.

Tablica 8. Multivarijatna analiza parametara povezanih s CXCL10 koncentracijama u toku liječenja kronične HCV infekcije (generalizirani linearni model)

| Tip 3 test fiksnih efekata |                        |        |         |        |
|----------------------------|------------------------|--------|---------|--------|
| Efekt                      | Broj stupnjeva slobode | Den DF | F value | Pr < F |
| Kontrola                   | 3                      | 135    | 2.66    | 0.0506 |
| Odgovor (SVR)              | 1                      | 40     | 16.28   | 0.0002 |
| Indeks upalne aktivnosti   | 2                      | 40     | 1.15    | 0.3278 |
| Stadij fibroze             | 1                      | 40     | 0.31    | 0.5790 |
| HCV RNA prije liječenja    | 1                      | 40     | 0.81    | 0.3745 |



Viša prediktivna vrijednost nađena je za koncentraciju CXCL10 nakon 4 tjedna terapije nego za početnu vrijednost tog kemokina (P=0.9288 vs P=0.7942) što je prikazano na graf. 11. Razlika je statistički značajna (p=0.016)



Grafikon 11 Usporedba prediktivnih vrijednosti CXCL10 nivoa za virusološki odgovor na terapiju (koncentracija CXCL10 prije liječenja puna linija, koncentracija nakon 4 tjedna terapije isprekidana linija)

ROC Curve Areas and 95% Confidence Intervals

|          | ROC Area | Std Error | Confidence Limits | p=    |
|----------|----------|-----------|-------------------|-------|
| cxcl10_1 | 0.9288   | 0.0517    | 0.8275 - 1.0302   | 0.016 |
| cxcl10_0 | 0.7942   | 0.0671    | 0.6627 - 0.9257   |       |

(CXCL10\_0 = na početku terapije, CXCL10\_1 = nakon 4 tjedna terapije)

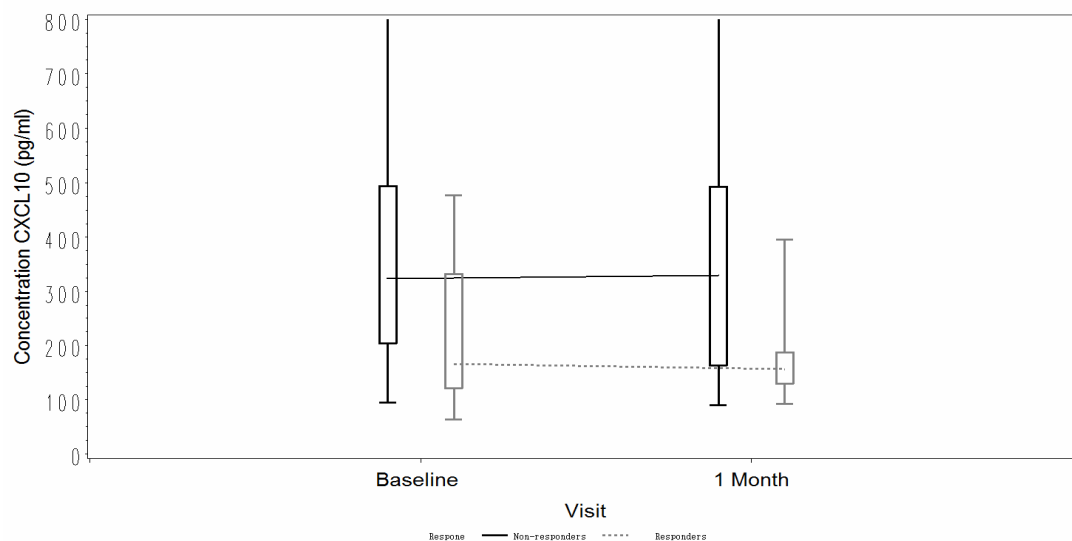
Rezultati analize pokazuju da za CXCL 10 nakon mjesec dana th. vrijednost veća od 252 pg/mL kao prediktor neuspjeha terapije ima senzitivnost 81.8% i specifičnost 91.7%

#### **4.7. Stratifikacija vrijednosti kemokina sa stanovišta brzog (RVR) i ranog (EVR) odgovora**

U dosadašnjim rezultatima prikazali smo koncentracije kemokine u dvije grupe, stratificirane prema trajnom odgovoru (SVR) ili njegovom odsustvu (non-SVR).

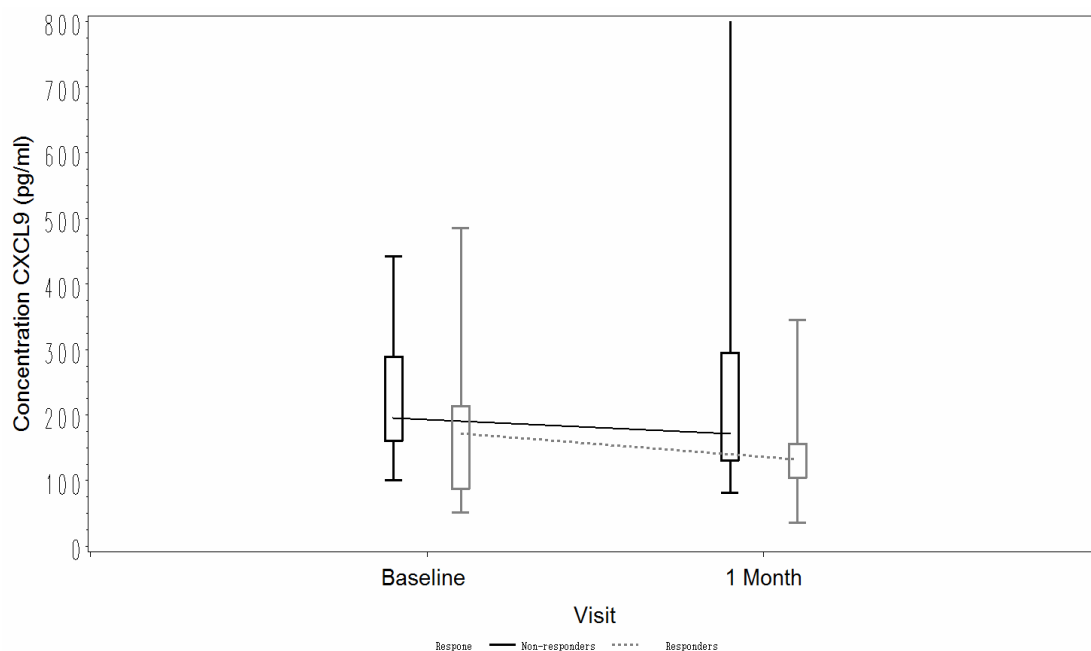
Iduće tablice prikazuju stratifikaciju bolesnika prema brzom virusološkom odgovoru (RVR, nakon 4 tjedna terapije) te ranom virusološkom odgovoru (EVR, nakon 12 tjedana terapije). Postoji značajna razlika u koncentraciji CXCL10 u grupi bolesnika s RVR u odnosu na non-RVR u tom periodu ( $p=0,006$ ) što je prikazano na grafikonu 12. Također postoji značajna razlika u koncentraciji CXCL9 u grupi bolesnika s RVR u odnosu na non-RVR u promatranom periodu prva 4 tjedna liječenja ( $p=0,016$ ) što je prikazano na grafikonu 13. Za kemokin CXCL11 nije nađena značajna razlika između RVR i non-RVR grupe bolesnika ( $p=0,378$ ). Navedeni rezultati su prikazani na tablicama 9a, 9b i 9c.

Ako bolesnike stratificiramo prema postignutom ranom (EVR) odgovoru, nakon 12 tjedana terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom, dobivamo sljedeće rezultate: postoji značajna razlika u koncentraciji CXCL9 u grupi bolesnika s EVR u odnosu na non-RVR u promatranom periodu prva 4 tjedna liječenja ( $p=0,016$ ). Također postoji značajna razlika u koncentraciji CXCL10 u grupi bolesnika s EVR u odnosu na izostanak EVR u tom periodu ( $p=0,003$ ) što je prikazano na grafikonu 14. Za kemokin CXCL11 nije nađena značajna razlika između EVR i non EVR grupe bolesnika ( $p=0,683$ ). Navedeni rezultati prikazani su na tablicama 10a, 10b i 10c.



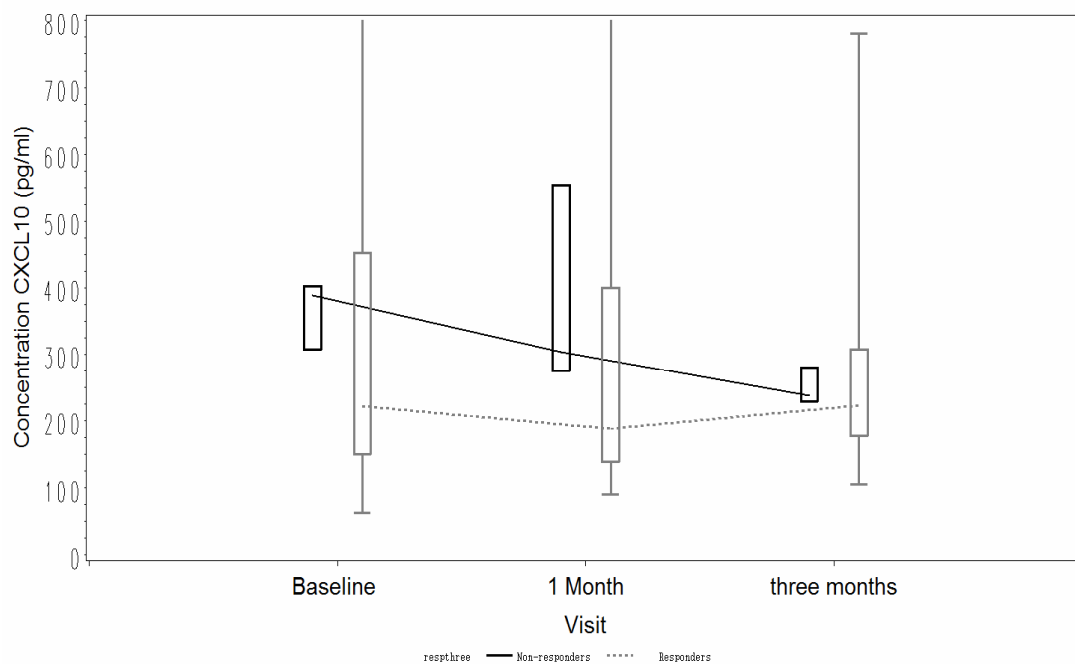
Box extends to 25th and 75th percentile.  
Whiskers extend to minimum and maximum values.

Grafikon 12. Koncentracije CXCL10 obzirom na RVR ( $p=0.006$ )



Box extends to 25th and 75th percentile.  
Whiskers extend to minimum and maximum values.

Grafikon 13. Koncentracije CXCL9 obzirom na RVR ( $p=0,016$ )



Box extends to 25th and 75th percentile.  
Whiskers extend to minimum and maximum values.

Grafikon 14 Koncentracije CXCL10 obzirom na EVR/ non-EVR (p=0,003)

Tablica 9a. Dinamika CXCL 9 u ranoj fazi liječenja  
Stratifikacija s obzirom na brzi odgovor nakon 4 tj liječenja

|                      | Početna vrijednost CXCL9_0 |        |        |        |        |        | CXCL9_1 nakon mjesec dana |        |        |        |        |        |
|----------------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Rani efekt liječenja | N                          | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     | N                         | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh             | 28                         | 229.57 | 97.69  | 195.50 | 160.50 | 289.00 | 28                        | 279.57 | 364.77 | 171.00 | 130.00 | 295.00 |
| Uspjeh               | 18                         | 176.00 | 103.77 | 171.00 | 87.00  | 213.00 | 18                        | 145.61 | 73.69  | 132.00 | 104.00 | 156.00 |

| Tip III test fiksih efekata |        |        |         |        |
|-----------------------------|--------|--------|---------|--------|
| efekt                       | Num DF | Den DF | F Value | Pr>F   |
| kontrola                    | 1      | 45     | 36.28   | <.0001 |
| odgovor                     | 1      | 44     | 6.28    | 0.0160 |

Tablica 9b. Dinamika CXCL 10 u ranoj fazi liječenja  
Stratifikacija s obzirom na brzi odgovor nakon 4 tjedna liječenja

|                      | Početna vrijednost CXCL 10 |        |        |        |        |        | CXCL 10 nakon mjesec dana |        |        |        |        |        |
|----------------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Rani efekt liječenja | N                          | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     | N                         | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh             | 28                         | 379.46 | 234.67 | 324.00 | 203.00 | 493.50 | 28                        | 354.39 | 191.49 | 330.00 | 162.50 | 492.50 |
| Uspjeh               | 18                         | 223.22 | 133.37 | 164.50 | 121.00 | 332.00 | 18                        | 173.56 | 70.29  | 156.00 | 129.00 | 187.00 |

| Tip III test fiksnih efekata |        |        |         |        |
|------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| efekt                        | Num DF | Den DF | F Value | Pr>F   |
| kontrola                     | 1      | 45     | 91.89   | <.0001 |
| odgovor                      | 1      | 44     | 13.67   | 0.0006 |

Tablica 9c. Dinamika CXCL 11 u ranoj fazi liječenja  
Stratifikacija s obzirom na brzi odgovor nakon 4 tjedna liječenja

|                      | Početna vrijednost CXCL 11 |        |        |        |       |        | CXCL 11 nakon mjesec dana |        |       |        |        |        |
|----------------------|----------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|---------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Rani efekt liječenja | N                          | Mean   | Std    | Median | Q1    | Q3     | N                         | Mean   | Std   | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh             | 28                         | 130.07 | 69.69  | 120.50 | 86.00 | 147.00 | 28                        | 134.57 | 58.72 | 127.50 | 101.00 | 142.50 |
| Uspjeh               | 18                         | 141.06 | 106.77 | 113.00 | 94.00 | 194.00 | 18                        | 110.22 | 40.81 | 98.00  | 84.00  | 113.00 |

| Tip III test fiksnih efekata |        |        |         |        |
|------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| efekt                        | Num DF | Den DF | F Value | Pr>F   |
| kontrola                     | 0      |        |         |        |
| odgovor                      | 1      | 44     | 0.79    | 0.3783 |

Tablica 10 a. Dinamika CXCL 9 u prva tri mjeseca  
Stratifikacija s obzirom na rani odgovor nakon 12 tjedana liječenja

| Efekt liječenja nakon tri mjeseca | Početna vrijednost CXCL9 |        |        |        |        |        | CXCL9 nakon tri mjeseca |        |        |        |        |        |
|-----------------------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                   | N                        | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     | N                       | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh                          | 3                        | 256.67 | 89.47  | 238.00 | 178.00 | 354.00 | 3                       | 256.00 | 144.70 | 177.00 | 168.00 | 423.00 |
| Uspjeh                            | 43                       | 205.26 | 103.37 | 186.00 | 133.00 | 278.00 | 43                      | 225.14 | 302.25 | 154.00 | 105.00 | 181.00 |

| cxcl9_3                           |    |        |       |        |        |        |
|-----------------------------------|----|--------|-------|--------|--------|--------|
| Efekt liječenja nakon tri mjeseca | N  | Mean   | Std   | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh                          | 3  | 194.00 | 83.29 | 151.00 | 141.00 | 290.00 |
| Uspjeh                            | 43 | 181.60 | 70.34 | 166.00 | 132.00 | 240.00 |

| Tip III test fiksnih efekata |        |        |         |        |
|------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| efekt                        | Num DF | Den DF | F Value | Pr>F   |
| kontrola                     | 1      | 45     | 36.28   | <.0001 |
| odgovor                      | 1      | 44     | 6.28    | 0.0160 |

Tablica 10 b. Dinamika CXCL 10 u prva tri mjeseca  
Stratifikacija s obzirom na rani odgovor nakon 12 tjedana liječenja

| Efekt liječenja nakon tri mjeseca | Početna vrijednost CXCL10 |        |        |        |        |        | CXCL10 nakon mjesec dana |        |        |        |        |        |
|-----------------------------------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                   | N                         | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     | N                        | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh                          | 3                         | 366.33 | 50.93  | 389.00 | 308.00 | 402.00 | 3                        | 377.33 | 152.82 | 304.00 | 275.00 | 553.00 |
| Uspjeh                            | 43                        | 314.98 | 220.62 | 221.00 | 150.00 | 452.00 | 43                       | 277.09 | 179.78 | 187.00 | 139.00 | 400.00 |

| CXCL10 nakon tri mjeseca          |    |        |        |        |        |        |
|-----------------------------------|----|--------|--------|--------|--------|--------|
| Efekt liječenja nakon tri mjeseca | N  | Mean   | Std    | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh                          | 3  | 249.00 | 27.22  | 238.00 | 229.00 | 280.00 |
| Uspjeh                            | 43 | 275.49 | 163.08 | 222.00 | 178.00 | 307.00 |

| Tip III test fiksnih efekata |        |        |         |        |
|------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| efekt                        | Num DF | Den DF | F Value | Pr > F |
| kontrola                     | 2      | 90     | 86.20   | <.0001 |
| odgovor                      | 1      | 44     | 9.59    | 0.0034 |

Tablica 10 c. Dinamika CXCL 11 u prva tri mjeseca  
Stratifikacija s obzirom na rani odgovor nakon 12 tjedana liječenja

|                                   | Početna vrijednost CXCL11 |        |       |        |       |        | CXCL11 nakon mjesec dana |        |       |        |        |        |
|-----------------------------------|---------------------------|--------|-------|--------|-------|--------|--------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Efekt liječenja nakon tri mjeseca | N                         | Mean   | Std   | Median | Q1    | Q3     | N                        | Mean   | Std   | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh                          | 3                         | 150.67 | 46.14 | 170.00 | 98.00 | 184.00 | 3                        | 166.00 | 61.61 | 142.00 | 120.00 | 236.00 |
| Uspjeh                            | 43                        | 133.23 | 87.44 | 116.00 | 86.00 | 148.00 | 43                       | 122.19 | 52.31 | 111.00 | 93.00  | 138.00 |

|                                   | CXCL11 nakon tri mjeseca |        |       |        |        |        |
|-----------------------------------|--------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Efekt liječenja nakon tri mjeseca | N                        | Mean   | Std   | Median | Q1     | Q3     |
| Neuspjeh                          | 3                        | 132.33 | 3.79  | 134.00 | 128.00 | 135.00 |
| Uspjeh                            | 43                       | 115.88 | 44.56 | 102.00 | 90.00  | 139.00 |

| Tip III test fiksnih efekata |        |        |         |        |
|------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| efekt                        | Num DF | Den DF | F Value | Pr>F   |
| kontrola                     | 1      | 45     | 12.43   | 0.0010 |
| odgovor                      | 1      | 44     | 0.17    | 0.6823 |

#### 4.8. Koncentracije kemokina u odnosu na stadij fibroze

Početne vrijednosti kemokina usporedili smo sa stadijem fibroze prije početka terapije (grafikon 15). Razlike nisu bile statistički značajne za CXCL9 i CXCL11. Za CXCL10 dobivena je p vrijednost  $p=0,097$ , kao što je prikazano u tablici 11 i 12.

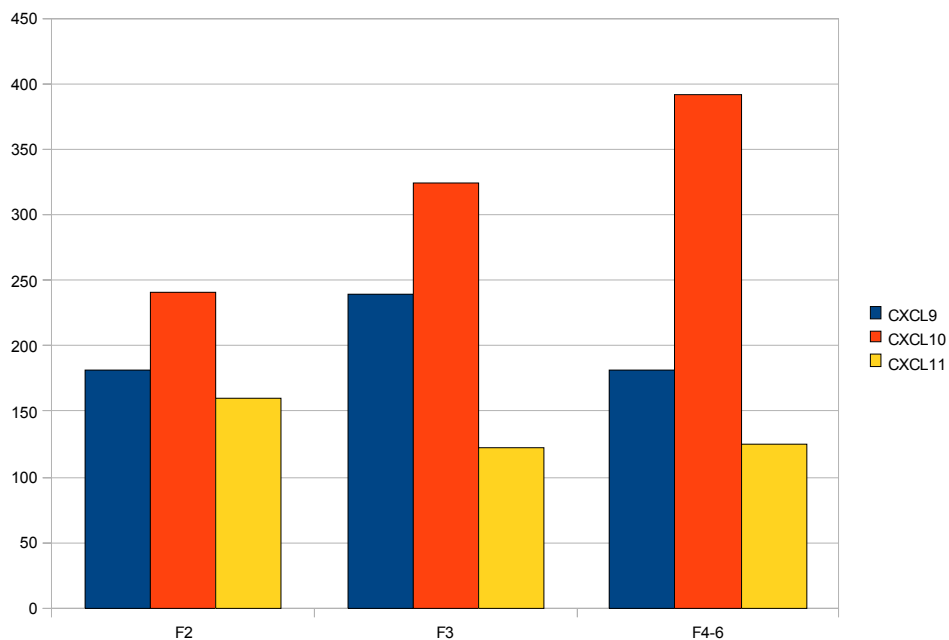
Tablica 11. Odnos početnih vrijednosti CXCL9 u odnosu na stupanj fibroze

| FIBROZA | N  | PROSJEK | STD    | MEDIAN | Q1    | Q3    | P       |
|---------|----|---------|--------|--------|-------|-------|---------|
| F2      | 13 | 182,62  | 99,01  | 178    | 113   | 229   | P=0,242 |
| F3      | 21 | 240,48  | 113,69 | 201    | 169   | 301   |         |
| F4 - 6  | 12 | 181     | 71,86  | 183    | 137,5 | 218,5 |         |

Tablica 12. Odnos početnih vrijednosti CXCL10 u odnosu na stupanj fibroze

| FIBROZA | N  | PROSJEK | STD    | MEDIAN | Q1    | Q3  | P       |
|---------|----|---------|--------|--------|-------|-----|---------|
| F2      | 13 | 241,23  | 207,56 | 169    | 145   | 248 | P=0,097 |
| F3      | 21 | 324,24  | 205,88 | 268    | 201   | 141 |         |
| F4 - 6  | 12 | 391,5   | 223,57 | 383,5  | 225,5 | 481 |         |

Grafikon 15. Vrijednosti kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u HCV infekciji u odnosu na stupanj fibroze



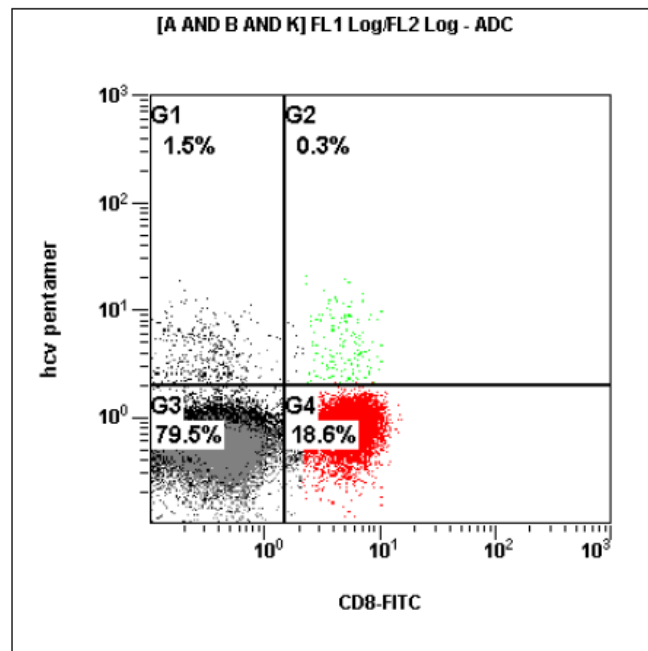


#### 4.9. Frekvencije HCV-NS3 specifičnih CD8+ T limfocita prije i za vrijeme terapije HCV infekcije.

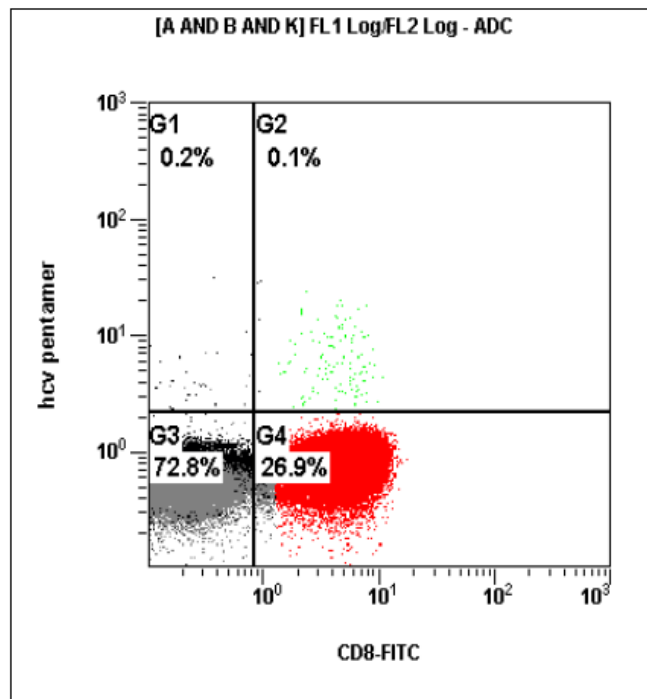
Ekspresija HLA-A2 alela na leukocitima periferne krvi metodom protočne citometrije detektirana je u 25 bolesnika. HCV NS3CINGVCWTV-specifični CD8+ T-limfociti detektirani su u 19 od 25 bolesnika prije liječenja i u 14 od 25 bolesnika nakon 3 i 6mj liječenja. Medijan postotka HCV NS3CINGVCWTV-specifični CD8+ T-limfocita prije liječenja bio je 0.10% (raspon 0.00-0.70%) a nakon liječenja medijan je bio 0.10% svih limfocita (raspon 0.00-0.30%) (Tablica 13).

Tablica 13. HCV NS3CINGVCWTV-specifični CD8+ T-limfociti u perifernoj krvi bolesnika s kroničnim hepatitisom C tijekom liječenja

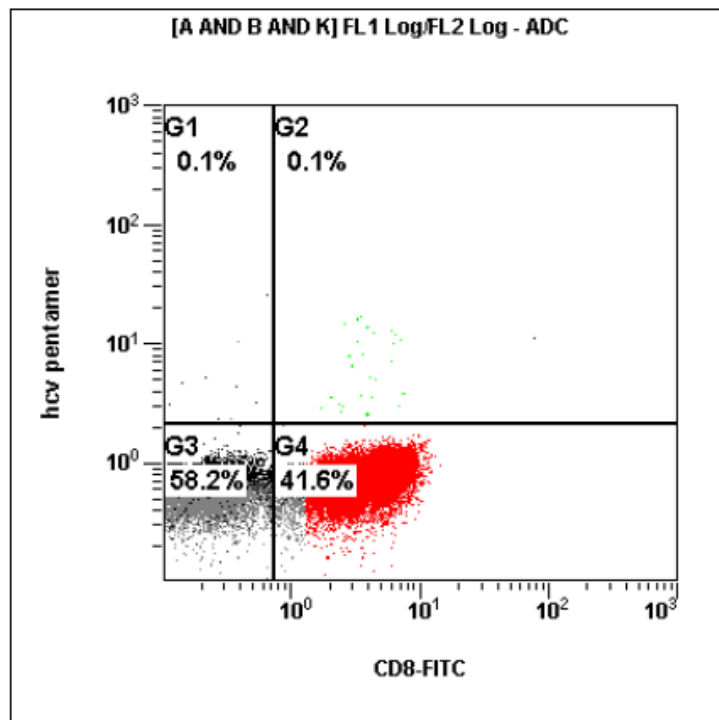
| Parametar HCV-specifične imunost (n=25 bolesnika) (medijan, raspon postotka stanica) | Bolesnici s kroničnim hepatitisom C prije liječenja | Bolesnici s kroničnim hepatitisom C nakon 3-6 mjeseci liječenja |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| HCV NS3CINGVCWTV-specifični CD8+ T-limfociti                                         | 0.10%<br>(0.00-0.70)                                | 0.10%<br>(0.00-0.30)                                            |



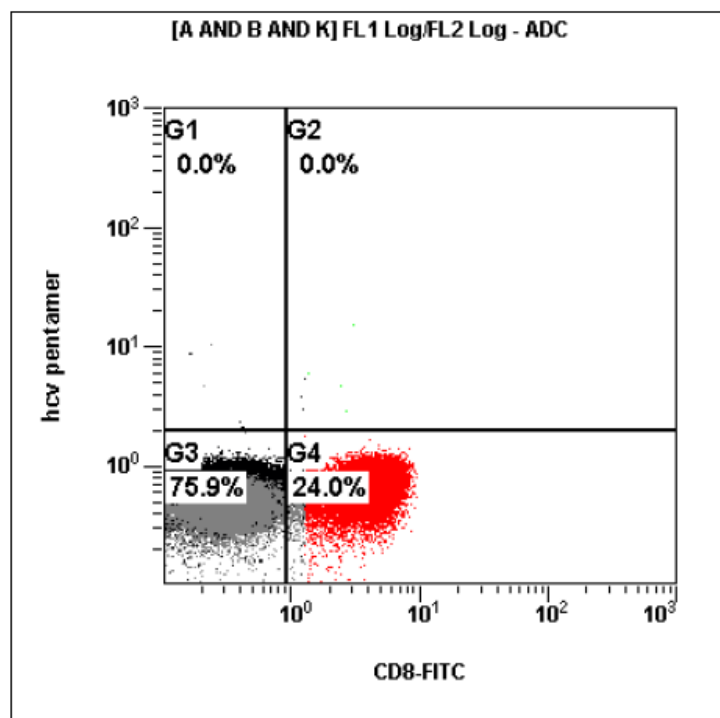
Grafikon 16. HCV NS3CINGVCWTV-specifični CD8+ T-limfociti u perifernoj krvi bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije liječenja (reprezentativni prikaz)



Grafikon 17. HCV NS3CINGVCWTV-specifični CD8+ T-limfociti u perifernoj krvi bolesnika s kroničnim hepatitisom C nakon 3 mjeseca liječenja



Grafikon 18. HCV NS3CINGVCWTV-specifični CD8+ T-limfociti u perifernoj krvi bolesnika s kroničnim hepatitisom C nakon liječenja 6 mjeseci liječenja



Grafikon 19. Negativna kontrola za bojanje dekstramerom (HLA-A\*0201-pozitivna HCV-negativna osoba)

## 5. RASPRAVA

Kemokini CXCL9, CXCL10 i CXCL11 vežu se za CXCR3 receptor izražen na efektorskim Th 1 limfocitima te igraju ključnu ulogu u mobilizaciji leukocita i ulasku u inflamirano područje (100). Butera i suradnici pokazali su da su samo vrijednosti CXCL10 na početku terapije značajno više u onih koji nakon provedene terapije neće imati dobar odgovor, dok koncentracije CXCL9 i CXCL11 nisu pokazale značajnu povezanost s ishodom liječenja (101).

Za razliku od tog opažanja, ova studija pokazala je razlike u serumskim koncentracijama i kemokina CXCL 10 i CXCL9 kod bolesnika bolesnika sa SVR i non-SVR.

Ova studija pokazala je da su koncentracije kemokina CXCL10 u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije započinjanja terapije u korelaciji sa stupnjem aktivnosti hepatitisa, sa visinom viremije i s dobi bolesnika. Također postoji povezanost sa stupnjem fibroze. Za kemokine CXCL9 i CXCL11 ta korelacija nije dokazana.

U ovom radu također je pokazano da se kemokinski profil CXCL10 razlikuje od profila CXCL9 i CXCL11. Kod bolesnika koji će se na kraju terapije izdiferencirati kao non responderi, početne vrijednosti CXCL10 značajno su veće od onih s dobrim trajnim odgovorom i ostaju značajno povišene i nakon 4 tjedna terapije. Najveću pozitivnu prediktivnu vrijednost za odsustvo odgovora na kraju terapije ima upravo koncentracija CXCL10 nakon 4 tjedna terapije ( $>252$  pg/ml, ROC  $P=0.9288$ ). Takva korelacija nije nađena za CXCL11, dok je za CXCL9 nađena korelacija, ali slablja nego za CXCL10.

Obzirom na povezanost CXCL10 sa stupnjem aktivnosti hepatitisa, stadijem fibroze i viremijom, multivarijatnom analizom isključen je upliv tih faktora na konačnu predikcijsku vrijednost. Nađeno je da CXCL10 ima veći prognostički značaj za ishod liječenja nego stupanj aktivnosti i visina viremije te stadij fibroze (tablica 8).

Bolesnici koji će se kasnije izdiferencirati kao oni s trajno dobrim odgovorom nakon 4 tjedna terapije imaju značajan pad vrijednosti CXCL10, dok se vrijednosti CXCL10 budućih non respondera u tom periodu čak povisuju ( $p < 0.0001$ ).

Nakon 12 i 24 tjedna terapije dinamika CXCL10 nije tako značajna kao u prva četiri tjedna.

Za CXCL9 u toku liječenja je nađena razlika u koncentracijama kemokina u odnosu na grupe bolesnika sa SVR i non-SVR ( $p = 0.002$ ), dok za CXCL11 nije nađena takva dinamika niti nakon 4 tjedna, niti u drugim točkama praćenja (12 i 24 tjedna).

Ako koncentracije kemokina gledamo iz perspektive brzog i ranog virusološkog odgovora dobivao sljedeće rezultate. Bolesnici s HCV infekcijom koji su imali brzi virusni odgovor (RVR, 4tj) imali su značajno niže vrijednosti CXCL10 i CXCL9 ali ne i CXCL11 ( $p = 0.003, p = 0.016, p = 0.683$ ) i na početku i nakon 4 tjedna terapije.

Bolesnici s HCV infekcijom koji su imali rani virusni odgovor (EVR, 12tj) imali su značajno niže vrijednosti CXCL10, i CXCL9 ali ne i CXCL11 ( $p = 0.006, p = 0.016$  te  $p = 0.378$ ) i na početku i nakon 4 i nakon 12 tjedna terapije. Ipak povezanost CXCL10 bila je veća za SVR nego za EVR ili RVR.

Vrijednosti HCV specifičnih CD8<sup>+</sup> poz. limfocita u serumu ne razlikuju se značajno u respondera i non respondera. Prije terapije median HCV NS3-CINGVCWTV specifični CD8<sup>+</sup> T limfocita bio je 0.10% (raspon 0.00-0.70%) a nakon liječenja median je bio 0.10% (raspon 0.00-0.30%).

Vrijednosti HCV specifičnih CD8<sup>+</sup> limfocita u serumu nisu u korelaciji s koncentracijama kemokina.

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da su povišene vrijednosti CXCL10 pokazatelj uznapredovale histološke aktivnosti i visoke viremije, te su prediktor lošeg odgovora na terapiju pegiliranim interferonom.

Izostanak pada vrijednosti CXCL10 nakon 4 tjedna terapije prediktor je lošeg odgovora na kraju terapije. CXCL11 nije podesan kao prediktor za terapijski uspjeh.

Dinamika kemokinskog odgovora najizraženija je u prvih 4 tjedna terapije.

Prediktori odgovora na terapiju značajni su u vrijeme individualizirane terapije. Visina viremije, genotip virusa, dob i stadij fibroze, prisutnost metaboličkog sindroma te polimorfizam IL28B do sada su najviše korišteni parametri u nastojanju da se bolesnicima sa lošim prediktorima pruži dulja ili efikasnija terapija (npr trojna terapija DAA ili neka od novih terapija u razvoju). Također je moguće, zahvaljujući takvim prediktorima, da se u određenom trenutku jasno definiraju bolesnici bez izgleda za izlječenje i kod njih prekine terapija te smanji njihova izloženost nepotrebnim nuspojavama. Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da vrijednosti kemokina CXCL10 u startu a naročito nakon 4 tjedna terapije pružaju visoku pozitivnu predikcijsku vrijednost ishoda terapije te otvaraju mogućnost bolje prognoze ishoda liječenja sadašnjom dvojnomo terapijom (pegilirani interferon alfa2 i ribavirin) što je važno za donošenje odluke o trajanju terapije, te odluci o primjeni dvojne ili trojne (PEG INF +DAA) terapije.

Reiberger i suradnici su pokazali da CXCL10 cutoff vrijednost od 400 pg/ml može biti koristan prediktivni marker za liječenje HIV/HCV koinfekcije jer govori za loš ili dobar odgovor. (101).

U naših bolesnika bez HIV koinfekcije vrijednosti CXCL10 >252pg/ml nasuprot <252 pg/ml imale su veći prognostički značaj od dobi bolesnika, te od razlike u stadiju fibroze 1-3 vs 4-6. ( OR 40,7 ; 1,08 ; 0,33).

Ova studija pratila je dinamiku koncentracije kemokina u toku terapije, za razliku od većine dosadašnjih koji su se oslanjale tek na usporedbu početnih vrijednosti u odnosu na finalni odgovor na liječenje. Studija je pokazala da postoje dva različita profila dinamike kemokina CXCL10 u toku terapije u odnosu na uspjeh terapije. U toku uspješnog antivirusnog liječenja vrijednosti CXCL10 se smanjuju dok kod non respondera ostaju povišene u toku bar prvih 4 tjedna liječenja ili čak lagano rasu.

Početne vrijednosti CXCL10 niže su kod bolesnika koji će kasnije postići rani virusni odgovor i trajni virusni odgovor u toku terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom, a najizraženija je razlika u koncentracijama CXCL10 između budućih SVR i non-SVR nakon 4 tjedna liječenja. Mjerenja nakon tog perioda nisu pokazala toliki značaj.

Takvi rezultati sugeriraju moguću povezanost visokih koncentracija CXCL10 i rezistencije na antivirusne učinke interferona alfa (102).

Podloga za negativnu prognostičku vrijednost CXCL10 u kontekstu virusološkog odgovora nedavno je bila objašnjena u studiji koja je pokazala da CXCL10 u plazmi bolesnika s kroničnom HCV infekcijom postoji u antagonističkom obliku (Casrouge et al 2011) (103). CXCL10 antagonistička molekula stvara se in situ amino-terminalnim cijepanjem proteina koje se ostvaruje dipeptidil peptidazom IV. Antagonistička forma CXCL10 uspješno se veže na CXCR3 receptor ali ne uspijeva inicirati prijenos signala, na taj način ukidajući svoj vlastiti biološki učinak. To otkriće pomoglo je objasniti očiti paradoks zbog čega kemokin povezan s privlačenjem aktiviranih CD-8 T limfocita u jetru predstavlja negativan marker odgovora na terapiju.

Mogući utjecaj drugih solubilnih biomarkera kao prediktora odgovora na liječenje također je ispitan u dosadašnjim studijama. Tako je Lee i suradnici (2010) usporedio vrijednosti brojnih solubilnih markera (sCD30, interleukin-13, r ukupni i aktivni transformirajući faktor rasta beta-1, interleukin-18 i CXCL10) sa stadijem fibroze i ishodom liječenja. U toj studiji su visoki TGF-beta1 i niski CXCL10 bili povezani s neuspjehom terapije (104).

Povezanost koncentracija CXCL10 ne samo u plazmi već i u bioptičkom materijalu jetre nedavno je istraživao Askarieh et al (2010), prateći pri tome HCV RNA kinetiku u toku liječenja kronične HCV infekcije. Niske vrijednosti intrahepatalnog CXCL10 i plazmatskog CXCL10 bile su prediktor dobrog odgovora u prvoj fazi liječenja (nakon 24h do 4 dana terapije). U kasnijim fazama liječenja ta korelacija nije bila toliko izražena (102).

Neka dosadašnja istraživanja pokazala su kontradiktorne rezultate vrijednosti kemokina za vrijeme kroničnog hepatitisa C.

Dok su nivoi intrahepatalnog CXCL10 u korelaciji s lobularnom infiltracijom ali ne i nekrozom, koncentracije CXCL10 u serumu u korelaciji su s nekroinflamatornom aktivnosti. Intrahepatalni CXCL9 i CXCL11 u korelaciji su s portalnom i lobularnom upalom (105).

U našem ispitivanju koncentracija serumskog CXCL9 nije korelirala sa stupnjem fibroze, što je nedavno potvrdio Butera (89) za razliku od Shermanna i suradnika koji su našli povišene koncentracije i serumskog i intrahepatalnog CXCL9 u bolesnika s uznapredovalom fibrozom (92).

Još jedna studija (106) našla je povezanost serumskih vrijednosti CXCL9 i TNF receptora, sa jetrenom fibrozom, ali su uspoređeni samo bolesnici sa stadijem fibroze do F1 s jedne strane i oni sa stadijima fibroze F2 i višim s druge strane usporedbe.

Visoke koncentracije kemokina u plazmi rezultat su njihove pojačane prezentacije na endotelnim površinama blizu mjesta produkcije i potom daljnjeg širenja iz područja koje je već saturirano s kemokinima. Neki autori (89) smatrali su da visoke koncentracije interferiraju s potrebom postojanja gradijenta koncentracije koji omogućava da limfociti budu privučeni u određena tkiva, djelujući u takvim visokim koncentracijama kao antagonist migracije leukocita. Međutim novije studije (Askarieh i suradnici 2010) pokazale da su u dobrim respondera i intrahepatalne koncentracije CXCL10 niže (102), te (Casrouge et al. 2011) da je alterirana molekula CXCL10 koja ne prenosi biološko signaliziranje na Th1 limfocite prisutna u povišenoj koncentraciji što je razlog zaustavljanja adekvatnog staničnog odgovora koji je ključan za supresiju viremije (103).

Kemokinski odgovor privlači limfocite sa CXCR3 receptorom, ali to nisu samo HCV specifični T limfociti koji su tako jako povezani s dobrim odgovorom, već stanice potencijalno povezane s nespecifičnim upalnim oštećenjem bez direktnog djelovanja na HCV virus. Intrahepatalne T stanice od takvih neizlječenih bolesnika pokazuju funkcionalne defekte u smislu smanjene mogućnosti da produciraju interferon, proliferiraju ili ubiju stanice koje prezentiraju HCV antigen (104). Iako neuspješne u smislu klirensa virusa te imunološke stanice produciraju daljnje količine kemokina i citokina te stimuliraju druge limfocite da to rade (107). Neki od tih citokina, posebno TGF- $\beta$  igraju ulogu u započinjanju i održavanju fibrogeneze (108).

U razvoju progresivnog jetrenog oštećenja intrahepatalna upala čini se da je značajnija od direktne virusne citotoksičnosti (97,98). Intrahepatalna upala, naročito lobularna i periportalna najznačajnije su determinante progresije u fibrozu (109,110). Neki autori pokazali su na modelu kronične virusne infekcije jetre u miša da CXCL9 i CXCL10 nisu bili neophodni za antivirusne učinke virus specifičnih citotoksičnih T limfocita, a blokiranje tih kemokina preveniralo je upalnu aktivnost u jetri (111).



U svijetlu takvog nespecifičnog, neutralnog ili štetnog okupljanja limfocita u jetrenom parenhimu koje ne doprinosi kontroli virusne replikacije možemo gledati povezanost CXCL10 sa visokom viremijom, jakom upalnom aktivnosti i lošim odgovorom na terapiju. Neki autori (112) našli su antagonističku funkciju kemokina koji se vežu na CXCR3 receptor limfocita u odnosu na one koje se vežu na CCL5 receptor, a neki podaci govore za značaj CCL5 receptora u spotanom ili terapijskom izlječenju HCV infekcije.

Ovo ispitivanje pokazalo je različite profile kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u toku terapije pegiranim interferonom za razliku od nekih starijih istraživanja koji su našli povišene vrijednosti svih triju navedenih kemokina u korelaciji sa uznapredovalom fibrozom i stupanjem aktivnosti i fibrozom (naročito CXCL9 sa upalnom aktivnosti, a CXCL10 sa stupnjem fibroze) (97). Druga istraživanja nisu potvrdila takvu korelaciju osim za CXCL10 i upalnu aktivnost, sa čime su konzistentni i naši rezultati (89).

Protrahirano povišene vrijednosti CXCL10 u toku terapije mogu biti razlog perpetuiranja jetrenog oštećenja jer nisu u korelaciji s padom viremije i rezolucijom infekcije. Kada adoptivni imunološki odgovor ne uspijeva savladati upalu nespecifični T limfociti bez mogućnosti da kontroliraju infekciju također se sakupljaju u jetri i oni su na kraju odgovorni za perzistiranje jetrenog oštećenja. Modulacija kemokinske sekrecije u funkciji su mehanizama bijega virusa od imunološkog odgovora i omogućuju mu preživljavanje u kroničnoj fazi koja je karakterizirana pogoršavanjem specifičnog T staničnog odgovora (Larrubia i suradnici 2008) (93).

Studija je pokazala da vrijednosti kemokina CXCL10 i u manjoj mjeri CXCL9 imaju značaj markera ishoda liječenja, iako su vrijednosti drugih kemokina također povišene u kroničnoj HCV infekciji. Određivanje CXCL10 klinički je značajno prije započinjanja i nakon 4 tjedna provedene terapije. CXCL10 također je prediktor histološke aktivnosti bolesti. Osim monitoriranja prirodnog toka bolesti i njene progresije, CXCL10 može pomoći u identifikaciji bolesnika s većom ili manjom vjerojatnosti terapijskog odgovora i utjecati na odluku o modifikaciji trajanja terapije

Kemokini također mogu imati ulogu potencijalnih terapijskih meta u

modificiranju aktivnosti kronične HCV infekcije. Teoretski, antitijela ili molekule koje će blokirati interakciju CXCR3 receptora i antagonistički promjenjenih CXCL10 kemokina koji zaustavljaju Th1 odgovor mogla bi smanjiti kroničnu upalu u onih bolesnika koji nisu uspjeli eliminirati virus. CXCL10 blokada pokazala se uspješna u liječenju eksperimentalnog kolitisa (113,114) a anti CXCR3 monoklona protutijela imaju antiupalni efekt u animalnom modelu artritisa (115). U prilog tome govori i otkriće da bolesnici s KHC s mutacijom u području CCR5delta32 - heterozigoti ili s polimorfizmom u CCL5 genu imaju manju intrahepatalnu upalnu aktivnost (116).

Kod kroničnog hepatitisa C takvi antagonistički lijekovi mogli bi reducirati razvoj fibroze do otkrića novih antivirusnih lijekova i mogli bi biti primjenjeni u bolesnika bez trajnog odgovora. Ostaje otvoreno i pitanje nuspojava sistemske blokade CXCR5 i CCR3 jer kroničnom hepatitisu C nedostatak odgovarajućeg animalnog modela otežava ispitivanje učinkovitosti i sigurnosti takvih lijekova.

Koncentracija CXCL10 u serumu također može imati ulogu u sklopu neinvazivnog određivanja stupnja upalne aktivnosti, nadopunjavajući panel serumskih markera koji se sada za to koriste.

Medijan postotka HCV NS3-CINGVCWTV specifični CD8+ T limfocita u krvi prije liječenja bio je isti na početku liječenja kao i nakon 3 i 6 mj terapije, bez statistički značajnih razlika između SVR i non-SVR tako da se ta metoda nije pokazala kao mogući dobar predikcijski test za SVR. Razlog je ovisnost postotka HCV NS3-CINGVCWTV specifičnih CD8+ T limfocita o više različitih regulatornih mehanizama ( s jedne strane pad viremije u bolesnika sa SVR, a s druge antagonističko djelovanje povišenih CXCL10 na Th1 odgovor u non respondera), što u završnici dovodi do istog efekta na postotak HCV NS3 specifičnih limfocita u dvije različite grupe bolesnika. Prije terapije medijan HCV NS3-CINGVCWTV specifičnih CD8+ T limfocita bio je 0.10% (raspon 0.00-0.70%) a nakon liječenja medijan je bio 0.10% (raspon 0.00-0.30%). Moguće da bi određivanje intrahepatalnih HCV NS3 specifičnih CD8+T limfocita bilo specifičnije no u svakom slučaju nepraktično za kliničku praksu u prisustvu boljih prediktora terapijskog odgovora.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Koncentracije CXCL10 na početku terapije više su u bolesnika s kroničnim C hepatitisom koji na kraju terapije neće imati protrahirano dobar odgovor. Povišene početne vrijednosti CXCL10, a naročito CXCL10 nakon 4 tj terapije predstavljaju pozitivnu predikcijsku vrijednosti za non-SVR (ROC P=0.7942 i P=0.9288).
2. Koncentracije CXCL10 nakon 4 tjedna terapije su više u bolesnika s kroničnim C hepatitisom koji na kraju terapije neće imati protrahirano dobar odgovor (SVR). Koncentracija CXCL10 >252pg/ml nakon 4 tjedna terapije ima osjetljivost 81,8% i specifičnost 91,7% u predikciji krajnjeg neuspjeha terapije. Povišene vrijednosti CXCL10 nakon 4 tj terapije predstavljaju najbolju pozitivnu predikcijsku vrijednosti za non-SVR.
3. Vrijednosti CXCL10 nakon 12 i 24 tjedna terapije nisu bile značajne u tom smislu.
4. Vrijednosti CXCL10 veće od 248 pg/ml prije liječenja te 252 pg/ml nakon 4 tjedna liječenja imaju bolju pozitivnu predikcijsku vrijednost za neuspjeh terapije nego dob bolesnika, ili stupanj fibroze (1-3 vs 4-6).
5. Početne koncentracije CXCL9 također više su u non-SVR bolesnika, ali vrijednosti CXCL10 imaju bolju predikcijsku vrijednost.
6. Kemokinski odgovor tj visina koncentracije kemokina u toku terapije kroničnog hepatitisa C pegiliranim interferonom alfa-2b razlikuje se za sva tri ispitivana kemokina. Kod CXCL9 nalazimo razliku između SVR i non SVR grupe u toku liječenja, no bez značajne razlike između 0, 4 i 12 tjedana terapije. Kod CXCL10 izraženija je dihotomija između SVR i non SVR grupe na početku terapije i naročito nakon 4 tjedna terapije, dok su nakon 12 i 24 tjedna razlike manje izražne, no stalno statistički značajne.

7. Vrijednosti CXCL11 nakon 0, 4, 12 i 24 tjedna terapije nisu pokazale značajnu dinamiku niti predikcijsku vrijednost za SVR, za razliku od CXCL9 i CXCL10 koji imaju predikcijsku vrijednost.
8. Početne vrijednosti CXCL10 također su u korelaciji s dobi, stupnjem fibroze, te visinom viremije i fibrozom ali je multivarijatna analiza pokazala najjaču povezanost upravo za SVR ili non-SVR.
10. Medijan postotka HCV NS3-CINGVCWTV specifičnih CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi prije liječenja bio je isti na početku liječenja kao i nakon 3 i 6 mj terapije, bez statistički značajnih razlika između SVR i non-SVR tako da se ta metoda nije pokazala kao mogući dobar predikcijski faktor za SVR. Razlog je ovisnost postotka HCV NS3-CINGVCWTV specifičnih CD8+ T limfocita o više različitih regulatornih mehanizama (s jedne strane pad viremije u bolesnika sa SVR, a s druge antagonističko djelovanje povišenih CXCL10 na Th1 odgovor u non respondera), što u završnici dovodi do istog efekta na postotak HCV NS3 specifičnih limfocita.
11. Vrijednosti CXCL10 na početku i nakon 4 tjedna liječenja prema ovim rezultatima mogu se implementirati u terapijske postupnike za individualiziranu terapiju kronične HCV infekcije, jer pružaju dobru prognozu trajnog odgovora.

## 7. SAŽETAK

Uvod. HCV specifični T stanični odgovor i uspješna migracija specifičnih T limfocita prema jetri bitna je za kontrolu HCV virusne infekcije, dok je prisustvo nespecifičnih inflamatornih stanica povezano s jetrenim oštećenjem. Interakcija specifičnih T limfocita s kemokinima i njihovo privlačenje prema mjestu upale ključna je točka pokretanja imunološkog odgovora u HCV infekciji.

Cilj i metode: cilj studije bio je analizirati kinetiku HCV specifične stanične imunosti i kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 tijekom liječenja kroničnog hepatitisa C pegiliranim interferonom i ribavirinom. Praćena je dinamika kemokina prije i u toku liječenja obzirom na uspjeh terapije. Također je praćena korelacija frekvencija HCV NS3 specifičnih CD8<sup>+</sup> limfocita i virusne kinetike posebno u ranom periodu liječenja. Osnovi cilj bio je utvrditi da li postoji korelacija između visine pojedinih kemokina i odgovora na terapiju. Praćena je korelacija između odabranih upalnih parametara, virusne kinetike, kretanja koncentracije kemokina u različitim vremenskim točkama liječenja (0, 4, 12 i 24 tjedna) a u odnosu SVR.

Rezultati: 46 bolesnika s kroničnom infekcijom i genotipom 1 praćeno je u toku terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom. Koncentracije CXCL10 na početku terapije više su u bolesnika koji na kraju neće imati protrahirano dobar odgovor (non-SVR n=20, SVR n=26) Povišene vrijednosti CXCL10 također su pozitivnoj korelaciji su sa dobi, viremijom, stupnjem fibroze i upalnom aktivnosti ali je multivarijatna analiza pokazala najveći OD upravo za SVR ili non-SVR. Povišene početne vrijednosti CXCL10 imaju pozitivnu predikcijsku vrijednost za non-SVR (ROC P=0,7942) . Koncentracije CXCL10 nakon 4 tjedna terapije još su više u bolesnika s non-SVR (ROC P=0,9288). Povišene vrijednosti CXCL10 nakon 4 tj. terapije predstavljaju najbolju pozitivnu predikcijsku vrijednosti za non-SVR. Koncentracija CXCL10 >252pg/ml nakon 4 tjedna terapije ima osjetljivost 81,8% i specifičnost 91,7% u predikciji krajnjeg neuspjeha terapije, a te vrijednosti imaju bolju pozitivnu predikcijsku vrijednost za neuspjeh terapije nego dob bolesnika, ili stupanj fibroze (F1-3 vs F4-6).

Koncentracije CXCL9 također više su u non-SVR bolesnika, dok koncentracije CXCL11 nisu pokazale značajnu dinamiku niti predikcijsku vrijednost za SVR.

Kemokinski odgovor tj visina koncentracije kemokina u toku terapije kroničnog hepatitisa C pegiliranim interferonom alfa2b razlikuje se za sva tri ispitivana

kemokina. Kod CXCL9 nalazimo smanjivanje od bazičnih vrijednosti ali održanu razliku između SVR i non-SVR grupe (118 pg/ml vs 176 pg/ml nakon 4 tjedna) te također kasnije u toku liječenja. Kod CXCL10 izraženija je dihotomija između SVR i non-SVR grupe na početku terapije i naročito nakon 4 tjedna terapije pa je u non-SVR grupi CXCL10 u porastu od početnog medijana 395 pg/ml na 424 pg/ml, a u SVR grupi pada sa početnih 285pg/ml na 156pg/ml. Nakon 12 i 24 tjedna vrijednosti CXCL10 za SVR i non-SVR grupu su u smanjivanju ali međusobne razlike koncentracije su značajne.

Medijan postotka HCV NS3CINGVCWTV-specifični CD8<sup>+</sup> T-limfocita u perifernoj krvi prije liječenja bio je isti na početku liječenja kao i nakon 3 i 6 mj terapije. Prije terapije median HCV NS3-CINGVCWTV specifični CD8<sup>+</sup> T limfocita bio je 0.10% (raspon 0.00-0.70%) a nakon 6 mj liječenja medijan je bio 0.10 (raspon 0.00-0.30%) i bez statistički značajnih razlika između SVR i non-SVR tako da se ta metoda nije pokazala kao mogući dobar predikcijski faktor za SVR u kliničkoj praksi.

**Zaključak:** Povišene početne vrijednosti CXCL10, a naročito CXCL10 nakon 4 tj terapije predstavljaju najbolju pozitivnu predikcijsku vrijednost za non-SVR (ROC P=0.7942 i ROC P=0.9288). Te vrijednosti mogu predstavljati parametar za odluke o individualiziranoj antivirusnoj terapiji. CXCL9 u toku terapije također je biološki prediktor za non-SVR u bolesnika s hepatitisom C. Kemokini CXCL9 i CXCL10 imaju različitu dinamiku koncentracija u toku liječenja pegiliranim interferonom i ribavirinom.

## 8. SUMMARY

### Cellular immune response during therapy of chronic HCV virus infection

**INTRODUCTION:** HCV specific immune response and successful migration of HCV-specific T cells towards liver is essential for HCV virus control, while concomitant recruitment of non-specific inflammatory infiltrate results in liver damage. The recruitment of T-cells, (both specific for HCV and non-specific) is mediated by the interaction of chemokines secreted by infected cells and corresponding chemokine receptors on migrating leukocytes, which is one of the key points in immune response against HCV infection.

**AIMS AND METHODS:** The aim of this study was to analyze the kinetics of HCV specific cellular immunity and CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokine responses during therapy of chronic HCV virus infection with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin. The concentrations of chemokines before and during treatment were measured and analyzed regarding presence of sustained viral response. The frequency of HCV NS3 specific CD8+ lymphocytes was measured before and in the first 24 weeks of therapy, with primary endpoint to determine if there is a correlation between chemokines concentration and therapy outcome. Viral kinetic and different chemokine concentrations in relation with hepatitis activity index and fibrosis were analyzed at weeks 0, 4, 12, 24 of therapy to access different chemokine profiles during therapy, especially regarding SVR or non-SVR.

**RESULTS:** 46 patients with chronic HCV virus infection were stratified in SVR (n=20) and non-SVR group (n=26) after peg.interferon+ribavirin treatment. CXCL10 concentrations at the beginning of therapy were higher in patients with non-SVR. Higher values of CXCL10 were also in correlation with higher hepatitis activity index and higher viraemia and fibrosis, but multivariate analysis showed the highest predictive value of elevated CXCL10 for non-SVR. Elevated values of CXCL10 at start showed positive predictive value for non-SVR (p=0,7942). After four weeks of therapy elevated values of CXCL showed best predictive value for non-SVR (p=0.9288).

CXCL10 concentration >252 pg/ml after 4 weeks of therapy has a sensitivity of 81,8% for non-SVR, and specificity of 91,7%, so it is a better predictor than patients' age or fibrosis stage (F1-3 vs F4-6). CXCL9 concentrations were also

higher in non responders, while CXCL11 concentrations were non significant for SVR.

Chemokine response for all 3 chemokines were different during therapy. In CXCL9 we found a decreasing concentration during therapy, but significantly different between SVR and non-SVR. CXCL10 raised in non responders at week four (from 395 pg/ml to 424 pg/ml) in non-SVR patients, while dropped down in SVR group (from 185 pg/ml to 156 pg/ml) at week four of therapy. After weeks 12 and 24 concentrations dropped in both groups, but remained statistically significant.

CXCL11 concentration did not change during therapy in both SVR and non-SVR group. Median of HCV NS3-specific CD+8 T lymphocytes in peripheral blood was not significantly different in the beginning of therapy (median 0.10%, range 0.00 – 0.70%) and at weeks 12 and 24 (median 0.10, range 0.00 – 0.30%) with no differences in SVR and non-SVR patients, so this method does not seem predictive for clinical practice.

**CONCLUSION:** Elevated values of CXCL10 at the beginning and especially at week four of therapy represent the best positive predictive value for non-SVR. They can be used in decisions about therapy duration and discontinuation in individually tailored therapy for chronic hepatitis C virus infection. CXCL9 is also predictive for SVR. CXCL9, CXCL10 and CXCL11 all have different concentration dynamics during hepatitis C virus infection treatment.



## 9. LITERATURA

1. Shepard CW, Finelli L, Alter Mj. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(9):558-67.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;47:607-08.
3. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006;3(2):47-52.
4. S.R.Bialek, N.A. Terrault. The changing epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2006;10:10697-715.
5. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006;45:5298-38.
6. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C, NIH Consensus statements 2002;19:1-46.
7. Gonzalez SA, Keeffe EB. Chronic viral hepatitis: epidemiology, molecular biology, and antiviral therapy. *Front Biosci* 2011;16:225-250.
8. Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clinical immunology* 2008;128:133-147.
9. Neumann-Haefelin C, Timm J, Spangenberg HC, Wischniowski N, Nazarova N, Kersting N, Roggendorf M, Allen TM, Blum HE, Thimme R. Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8+ T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2008;47(6):1824-36.
10. Kasprowitz V, Kang YH, Lucas M, Schulze zur Wiesch J, Kuntzen T, Fleming V, Nolan BE, Longworth S, Berical A, Bengsch B, Thimme R, Lewis-Ximenez L, Allen TM, Kim AY, Klennerman P, Lauer GM. Hepatitis C virus (HCV) sequence variation induces an HCV-specific T-cell phenotype analogous to spontaneous resolution. *J Virol* 2010;84(3):1656-63.
11. Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A et al. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol*. 2003;77(20):10862-71.
12. Mondelli MU, Barnaba V. Viral and host immune regulatory mechanisms in hepatitis C virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18(4):327-31.
13. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: Pathogenesis, prognosis and therapeutics, *Cytokine* 2007;39:50-62

14. Irshad M, Khushboo I, Singh S, Singh S. 2008. Hepatitis C Virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol* 2008;27(6):497-517.
15. Fired MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Haussinger D, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Eng J Med* 2002;347:975-982.
16. Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR i sur. Peginterferon alfa2a and ribavirin combination therapy in treatment of chronic hepatitis C: randomised study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Inter. Med* 2004;140:346-355.
17. Pawlotsky JM, Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradiction *Hepatology* 2006;43:397-408.
18. Chang KM. Pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2003;7(1):89-105.
19. Nelson DR. The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:931-953.
20. Penin F, Doubuisson J, rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:5-19.
21. Simmonds P, Bukh J, Combert C i sur. Consensus proposal for unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-973.
22. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005;436:933-938.
23. Lloyd AR, Jagger E, Post JJ i sur. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:24-32.
24. Thimme R, Lohmann V, Weber F, A target on the move, innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antivir Res* 2006;69:129-41.
25. Rosa D, Saletti G, De Gregorio E i sur. Activation of naïve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C associated B lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2005;102:18544-49.
26. Charles ED, Geen RM, Markuian S i sur. Clonal expansion of IgM+CD27+B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia, *Blood* (2007)
27. Heydtmann M, Shields P, McCaughan G i sur. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:279-87.

28. Freeman AJ, Marinos G, French RA, Lloyd Ar. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2001;79:515-36.
29. Liang TJ i sur. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000;132: 296-305.
30. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345:41-52.
31. Thimme R, Oldach D, Chang KM, i sur. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-406.
32. Morishima C, Paschal DM, Wang CC i sur. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing, *Hepatology* 2006;3:573-580.
33. Colorado J, Toro F, Rivera H I sur. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1997;109:451-457.
34. Crotta S, Stilla A, Wack A i sur. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein J. *Exp. Med.* 2002;195:35-41.
35. Liu YJ, Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity, *Cell* 106(2001)259-262.
36. Liu YJ, Kadowaki. Rissoan MC, T cell activation and polarization by DC1 and DC2, *Curr. Top. Microbiol.Immunol.* 251(2000)149-159.
37. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wonjg DC I sur. Lac of protective immunity against reinfection with hepatitis c virus, *Science* 258 (1992) 135-140.
38. Lancaster T, Sanders E, Christie JM, Brooks C, Green S, Rosenberg WM. Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2002;9(1):18-28.
39. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19: 65-91.
40. Day CL i sur. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 2002;76: 12584-595.
41. Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, Valiga ME i sur. Discordant role of CD4 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 2007;132:654-666.

42. He XS, Rehermann B. Lopez-Labrador FX et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(10):5692-697.
43. Shin EC, Protzer U, Untergasser A, i sur, Liver-directed gama interferon gene delivery in chronic hepatitis C. *J Virol* 2005;79:13412-420.
44. Bertoletti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003;38:4-13.
45. Spangenberg HC, VazovS, Kersting N, Neumann Haefelin C i sur Intrahepatic CD8+T cell failure during chronic hepatitis C virus infection, *hepatology* 2005;42:828-837.
46. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespe GM i sur Memory CD8+Tcells vary in differentiationphenotype in different persistent virus infections *Nat Med* 2002;8:379-385.
47. Leuer GM, Ouchi K, Chung RT, i sur Comprehensive analysis of CD8+ T cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 2002;76:6104-113.
48. Radizewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML i sur. Liver infiltrating lymphocytes in chonic human hepatitis C virus infection display anexhausted phenotype with high viral levels of PD-1 and low levels of CD137 expression. *J Virol* 2007;81:2545-553.
49. Penna A, Pilli M, Zerbini A I sur Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2007;45:588-601.
50. Neumann AU, Lam NP, Gretch DR, Wiley TE, i sur, Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon alfa therapy. *Science* 1998;282:103-107.
51. Tester I, Smyk Pearson S, Wang XH, i sur , Immune evasion versus recovery after acute hepatitis c virus infection from shared source. *J Exp Med* 2005;201:1725-731.
52. Accapezzato D, Fancavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abriganani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansionof virus-specific regulatory CD8+T cell populationin chronic hepatitis C infection. *J Clin Invest* 2004;113:963-972.
53. Spangenberg HC, Viazov S, Kersting N, Neumann\_Haefelin C, McKinney D, Roggendorf M, Weizsacke F, Blum HE, Thimme R. Intrahepatic CD8+ T cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2005;42:828.837

54. Komatsu H, Lauer G, Pybus OG, Ouchi K, Wong D, Ward S, Walker B, Klenerman P. Do antiviral CD8+T cells select hepatitis C virus escape mutants? Analysis in diverse epitopes targeted by human intrahepatic CD8+T lymphocytes. *J Vira Hepat.* 2006 Feb;13(2):121-30.
55. Cabrera P, Tu Z, Xu Y. An immunomodulatory role of CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection *Hepatology* 2004;40:1062-1071.
56. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E i sur. T Cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2005;79:7860-867.
57. Rosen HR, Miner C, Sasaki AW I sur, Frequencies of HCV specific effector CD4+T cells by flow cytometry; correlation with clinical disease stages, *Hepatology* 35 (2002) 190-198.
58. Wakita T, Katsume A, Kato J, Taya C i sur. Possible role of cytotoxic T cells in acute liver injury in hepatitis C virus cDNA transgenic mice. *J Med Virol* 2000;62:308-317.
59. Abrignani S. Antigen-independent activation of resting T-cells in the liver of patients with chronic hepatitis. *Dev Biol Stand* 1998;92:191-194.
60. Cramp ME, Rossol S, Chokshi S i sur. Hepatitis C virus specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C *Gastroenterology* 2000;118:346-355.
61. Kamal SM i sur. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;123:1070-1083.
62. Kamal SM i sur. Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T-cell response kinetics. *Hepatology* 2004;39:1721-731.
63. Murata K i sur. Up-regulation of IL-18 by interferon alpha-2b/ribavirin combination therapy induces an anti-viral effect in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2005;52:547-51.
64. Rahman F, Heller T, Sobao Y, Mizukoshi E, Nascimbeni M, Alter H, Herrine S, Hoffnagle J. Effects of antiviral therapy on cellular immune response in acute hepatitis C. *Hepatology* 2004;40:87-97.
65. Boni C i sur. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspective for immune therapy. *Hepatology* 2001;33:963-971.
66. Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C I. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol* 1999;30:376-382.

67. Menghol JA, Golden-Manson L, Castelblanco N i sur. Impaired plasmacitoide dendritic cell maturation and differential chemotaxis in chronic hepatitis C, associations with antiviral treatment. *Gut* 2009;58:964-973.
68. Neumann-Haefelin C, Bluma HE, Chisari FV i sur. Review T cell response in hepatitis c infection *J Clin Virology* 32 (2005) 75-85.
69. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med* 2006;45(4):183-91.
70. Falasca K i sur. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36:144-50.
71. Vecchiet J i sur. Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35:415-422.
72. Hassoba H i sur. IL-10 and IL-12p40 in Egyptian patients with HCV-related chronic liver disease. *Egypt J Immunol* 2003;10:1-8.
73. Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, i sur, Expression of INF-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J immunol* 1997;158:5536-544.
74. Wald O, Pappo O, Safadi R, Dagan-Berger M, Beider K i sur. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus. *Eur J Immunol* 2004;34:1164-174.
75. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;18:217-42.
76. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610-21.
77. Salazar-Mather TP and Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;313:29-46.
78. Qn S, Rottman JB, Myers P, Kassam N i sur. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of t cells associatede with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998;101:746-54.
79. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural kiler cells. *J Leukoc Biol* 2002;71:173-83.
80. Klugewitz K, Adams DH, Emoto, Euglenburg K i sur. The composition of intrahepatic lymphocytes shaped by selective recruitment? *Trends Immunol* 2004;25:590-594.

81. Lalor PF, Adams DH, The liver: a model of organ specific leukocyte recruitment:organ specific mechanisms of action. *Expert Rev Mol Med* 2002;41-15.
82. Shields PL, Morland CM Salmon M, Qin S i sur. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C infected liver. *J Immunol* 1999;163:6236-243.
83. Harvey CE, Post JJ, Palladineti P i sur Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;74:360-369.
84. Lagging M, Romero AI, Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, Pawlotsky J-M, Zeuzem S, von Wagner M, Negro F, Schalm SW, Haagmans BL, Ferrari C, Missale G, Neumann AU, Verheij-Hart E, Hellstrand K. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006;44:1617-625.
85. Helbig KJ, Ruszkiewicz A, Semendric L, Harley HA i sur. Expression of CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C is in correlation with hepatic inflammation. *Hepatology* 2004;39:1220-229.
86. Narumi S, Yoneyama H, Inadera H i sur. TNF- $\alpha$  is a potent inducer for INF-inducible protein-10 in hepatocytes and unaffected by GM-CSF in vitro, in contrast to IL-1  $\beta$  and INF  $\gamma$ . *Cytokine* 2000;12:1007-1016.
87. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, et al. Sustained dysfunction of antiviral CD8<sub>+</sub> T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001;75:5550-558.
88. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8<sub>+</sub> T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-458.
89. Butera i sur. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005;106:1175-182.
90. Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Perez E, Saez A, Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C, relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2861-870.
91. Zeremski M, Petrovic M, Talal AH, The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection, *Journal of Viral Hepatitis* 2007;14:675-687

92. Shermann E, Wasmuth , Lambert F, Moreno M i sur. Antifibrotic effects of CXCL 9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. *Gastroenterology* 2009;137:309-329
93. Larrubia JR, Benito-Martinez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parracid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronica hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008;14:7149-159.
94. Goulding C i sur. The CCR5-delta32 mutation: impact on disease outcome in individuals with hepatitis C infection from a single source. *Gut* 2005;54:1157-161.
95. Ahlenstiel G, Iwan A, Nattermann J, Bueren K, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, Landt O, Peled A, Sauerbruch T, Spengler U, Woitas RP. Distribution and effects of polymorphic RANTES gene alleles in HIV/HCV coinfection- a prospective cross-sectional study. *World J Gastroenterol* 2005;11:7631-638.
96. Liu Y, Poon RT, Feng X, Yu WC, Luk JM, Fan St. Reduced expression of chemokine receptors on periferial blood lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1111-121.
97. Zeremski M, Dimova R, Brown Q, Jacobson IM, Markatou M, Talal AH. Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2009;200:1774-780.
98. Zeremski M, Dimova R, Astemborski J, Thomas DL, Talal AH. CXCL9 and CXCL10 chemokines as predictors of liver fibrosis in a cohort of primarily African-American injection drug users with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 2011;204:832-836.
99. Ischak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudet F, Denk H, Desmet V, Karb G, Mac Seen RN et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22(6):696-9.
100. Diago M, Castellano G, García-Samaniego J, Pérez C, Fernández I, Romero M, Iacono OL, García-Monzón C. Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut*. 2006;55:374-379.
101. Reiberger T, Aberle JH, Kundi M, Kohrgruber N, Rieger A, Gangl A, Holzmann H, Peck-Radosavljevic M. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther* 2008;13:969-976.



102. Askarieh G, Alsio A, Pugnale P, Negro F, Ferrari C, Neumann AU, Pawlotsky JM, Schalm SW et al. Systemic and intraheptic interferon-gamma-inducible protein 10 kDa predicts the first phase decline in hepatitis C virus RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010;51:1523-530.
103. Casrouge A, Decalf J, Ahloulay M, Lababidi C, Mansour H, Vallet-Pichard A, Mallet V, Mottez E, Mapes J, Fontanet A, Pol S, Albert ML. Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 2011;121:308-317.
104. Lee S, Varano J, Flexman JP, Cheng W, Watson MW, Rossi E, Adams LA, Bulsara M, Price P. Decreased IP-10 and elevated TGFbeta1 levels are associated with viral clearance following therapy in patients with hepatitis C virus. *Dis Markers* 2010;28:273-280.
105. Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, Pawlotsky JM, Neumann AU, Ferrari C, Missale G, Haagmans BL, Schalm SW, Zeuzem S, Negro F, Verheij-Hart E, Hellstrand K; DITTO-HCV Study Group. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006;194:895–903.
106. Moura AS, Carmo RA, Teixeira L I sur. Soluble inflammatory markers as predictors of liver histological changes in patients with chronic hepatitis C virus infection *Eur J Clin Microb Infect Dis* 2010;29;1153-161.
107. Spangenberg HC, Viazov S, Kersting N, Neumann\_Haefelin C, McKinney D, Roggendorf M, Weizsacke F, Blum HE, Thimme R. Intrahepatic CD8+ T cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2005;42:828-837.
108. Friedman SL. Liver fibrosis from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38(Suppl.1):S38-S53.
109. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H i sur. Progression of fibrosis in hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:97-104.
110. Fontaine H, Nalpas B, Poulet B i sur. Hepatitis activity index is a key factor in determinating the natural history of chronic hepatitis C. *Hum Pathol* 2001;32:904-909.
111. Sitia G, Isogawa M, Iannacone M, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. MMPs are required for recruitment of antigen non-specific mononuclear cells into the liver by CTLs. *J Clin Invest* 2004;113:1158-167.
112. Loetscher P, Pellegrino A, Gong JH i sur. The ligands of chemokine receptor 3, I-Tac, Mig and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem* 2001;276:2986-991.

113. Suzuki K, Awauchi Y, Palaniyandi SS i sur blockade of interferon gamma inducible protein-10 attenuates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting interstitial epithelial cells. *Pathol Int* 2007;57:413-420.
114. Singh Up, Singh S, Taub D i sur. Inhibition of INF gamma inducible protein-10 abrogates colitis in IL-10 <sup>-/-</sup> mice. *J Immunol* 2003;171:1401-406.
115. Mohan K. Issekutz TB. Blockade of chemokine receptor CXCR3 inhibits T cell recruitment to inflamed joints and decreases severity of adjuvant arthritis. *J Immunol* 2007;179:8463-469.
116. Goulding C, McManus R, Murphy A, MacDonald G i sur. The impact on disease outcome in individuals with hepatitis c infection from single source. *Gut* 2005;54:117-161.

## **10. ŽIVOTPIS**

### **Ivan Kurelac, dr. med.**

Datum i mjesto rođenja: 3. prosinac 1961, Zagreb, Hrvatska

Mjesto zaposlenja: Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“  
Odjel za virusne bolesti jetre  
Mirogojska 8, 10000 Zagreb, Hrvatska  
E-mail adresa: ikurelac@bfm.hr

### **ŠKOLOVANJE:**

Srednjoškolsko obrazovanje: Klasična gimnazija, Zagreb, Hrvatska

Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska, diplomirao 1988 god.

Specijalizacija iz infektologije, Klinika za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević, Zagreb, 1992-1996 god.

Stručni poslijediplomski studij Ultrazvuk u gastroenterologiji i hepatologiji 1998 god.

Prijelaz na poslijediplomski doktorski studij biomedicina i zdravstvo 2005 – 2007 god.

### **EDUKACIJA U INOZEMSTVU:**

1997 Mary Hitchcock Hospital, Dartmouth University, New Hampshire, USA

### **OBJAVLJENI RADOVI:**

1. Palmović D, Kurelac I, Palmović-Crnjaković J. The treatment of acute post-transfusion hepatitis C with recombinant interferon-alpha. Infection 1994;22(3):222-3.
2. Kurelac I. Prediktori odgovora na terapiju interferonom  $\alpha 2$  u bolesnika s kroničnim hepatitisom C - Abstract. 1. hrvatski kongres o infektivnim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem; 1998 Oct 1-1998 Oct 3; Dubrovnik Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko društvo infektologa, Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 1998. p 76, No 62.

3. Lukas D, Palmović D, Maček P, Kurelac I. Bolesti putnika - Knjiga sažetaka. 62. znanstveno stručni sastanak s međunarodnim sudjelovanjem; 1999 Dec 8-1999 Dec 10; Zagreb, Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević". Zagreb: HLZ, HDI, HDK, AMZH; 1999. p 11, No S21.
4. Palmović D, Kurelac I, Vince A. Acute hepatitis B in the Zagreb region between 1991 to 1999. *Acta Dermatovenerol Croat* 1999;7(4):200.
5. Vince A, Kurelac I. Uloga spolnog prijenosa u infekciji virusima hepatitisa B i C. Simpozij o spolno prenosivim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem; 1999 Apr 26-1999 Apr 28; Dubrovnik. Zagreb: Hrvatsko društvo infektologa; 1999. p No 25.
6. Kurelac I, Palmović D. Rezultati liječenja kroničnog hepatitisa C interferonom alfa nakon pola godine po prekidu terapije. 63. znanstveno-stručni sastanak - Knjiga sažetaka; 2000 Jun 15-2000 Jun 17; Split. Zagreb: HLZ, HDI, Hrvatsko društvo za kemoterapiju, Odjel za zarazne bolesti KB Split, Klinika za infektivne bolesti Zagreb; 2000. p 8, No 13.
7. Kurelac I, Palmović D, Lukas D. Acute viral hepatitis with severe cholestasis. 2nd Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation - Abstract book; 2000 Sep 24-2000 Sep 27; Dubrovnik, Croatia. Zagreb: HLZ, AMZH, HDI, HDK; 2000. p 20, No 46.
8. Kurelac I, Palmović D, Lukas D. Seksualno ponašanje bolesnika s kroničnim hepatitisom C. 2. simpozij o spolno prenosivim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem - Knjiga sažetaka; 2000 May 16-2000 May 18; Dubrovnik. Zagreb: HLZ, AMZH; 2000. p No 21.
9. Lukas D, Palmović D, Kurelac I. Hepatitis E. 63. znanstveno-stručni sastanak - Knjiga sažetaka; 2000 Jun 15-2000 Jun 17; Split. Zagreb: HLZ, HDI, Hrvatsko društvo za kemoterapiju, Odjel za zarazne bolesti KB Split, Klinika za infektivne bolesti Zagreb; 2000. p 7, No 10.
10. Palmović D, Kurelac I, Lukas D. Pathogenicity of transfusion transmitted virus (TTV). 2nd Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation - Abstract book; 2000 Sep 24-2000 Sep 27; Dubrovnik, Croatia. Zagreb: HLZ, AMZH, HDI, HDK; 2000. p 17, No 41.
11. Palmović D, Kurelac I, Lukas D. Patogenost GBV-C/HGV infekcije. 63. znanstveno-stručni sastanak - Knjiga sažetaka; 2000 Jun 15-2000 Jun 17; Split. Zagreb: HLZ, HDI, Hrvatsko društvo za kemoterapiju, Odjel za zarazne bolesti KB Split, Klinika za infektivne bolesti Zagreb; 2000. p 6, No 9.
12. Vince A, Lukas D, Kurelac I. HCV infekcija u trudnoći. 3. simpozij o spolno prenosivim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem - Knjiga sažetaka; 2001 May 14-2001 May 16; Dubrovnik. Zagreb: HLZ, AMZH; 2001. p No 20.

13. Kurelac I, Vince A, Palmović D, Lukas D. Exacerbation of chronic liver disease during the interferon alpha & ribavirin therapy with development of LKM II antibodies. 3rd Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation-Abstract Book; 2002 Oct 12-2002 Oct 15; Dubrovnik. Zagreb: Croatian medical association, Croatian Society of Infectious Diseases, Croatian Society of Chemotherapy, Academy of Medical Sciences of Croatia; 2002. p 89, No 141.
14. Palmović D, Lukas D, Vince A, Kurelac I. Hepatitis E kod putnika u Indiju. Liječ Vjesn 2002;124(10):313-4.
15. Vince A, Kurelac I. Virusni hepatitis B i C kao spolno prenosiva bolest. 4. simpozij o spolno prenosivim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem - Knjiga sažetaka; 2002 Apr 15-2002 Apr 17; Dubrovnik. Zagreb: HLZ, AMZH; 2002. p No 3.
16. Kurelac I. Klinički i epidemiološki aspekti bolesnika s akutnim hepatitisom B i C hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti u Zagrebu u posljednjih 10 godina. 5. simpozij o spolno prenosivim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem; 2003 Apr 14-2003 Apr 16; Opatija. Zagreb: Hrvatsko društvo za kemoterapiju HLZ-a, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"; 2003. p No 12.
17. Vince A, Kurelac I, Palmović D, Markotić A, Klinar I. Subarahnoidalno krvarenje u tijeku hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom - prikaz bolesnika. Simpozij-Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom u Hrvatskoj-Knjiga sažetaka; 2003 Mar 28-2003 Mar 29; Zagreb. Zagreb: HLZ, HDI, HDE, HID, AMZH; 2003. p 42, No 43.
18. Crnjaković-Palmović J, Palmović D, Vince A, Kurelac I. Terapija akutnog hepatitisa C. Infektol Glasn 2004;24(1):11-4.
19. Kurelac I. Klinički i epidemiološki pregled bolesnika oboljelih od akutnog hepatitisa B s osvrtnom na cijepljenje. 6. simpozij o spolno prenosivim bolestima i urogenitalnim infekcijama, Simpozij Slavka Schönwalda s međunarodnim sudjelovanjem; 2004 Apr 18-2004 Apr 21; Opatija. Zagreb: Hrvatsko društvo za urogenitalne infekcije HLZ-a; 2004. p No 49.
20. Palmović D, Vince A, Kurelac I, Crnjaković-Palmović J. Akutni hepatitis C - nerazjašnjena pitanja. Acta Med Croat 2004;58(4):335-9.
21. Vince A, Kurelac I, Palmović D, Čajić V. Lamivudin u liječenju imunokompromitiranih bolesnika s akutnim hepatitisom B: naša iskustva. 6. simpozij o spolno prenosivim bolestima i urogenitalnim infekcijama, Simpozij Slavka Schönwalda s međunarodnim sudjelovanjem; 2004 Apr 18-2004 Apr 21; Opatija. Zagreb: Hrvatsko društvo za urogenitalne infekcije HLZ-a; 2004. p No 51.
22. Vince A, Palmović D, Kurelac I. Mogućnost liječenja virusnih hepatitisa. 68. znanstveno-stručni simpozij Suvremeno liječenje infektivnih bolesti; 2005 Jun 8-2005 Jun 11; Osijek. Samobor: INTERGRAF-BI; 2005. p 39-40, No 40.

23. Gregurević I, Vince A, Kurelac I. Utjecaj značajki domaćina na progresiju jetrene fibroze kod kroničnog hepatitisa C. *Infektol Glasn* 2006;26(2):61-6.
24. Kurelac I, Vince A, Palmović D. Rezultati liječenja bolesnika s kroničnim hepatitisom C Pegiliranim interferonom i Ribavirinom. 70. znanstveno-stručni simpozij s međunarodnim sudjelovanjem Virusni hepatitis i infekt u imunokompromitiranih; 2006 May 26-2006 May 27; Dubrovnik. Zagreb: HLZ; HDIB; AMZH; 2006. p 45-6, No 38.
25. Vince A, Iščić-Beš J, Židovec-Lepej S, Baća-Vrakela I, Bradarić N, Kurelac I, Vince DB. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Croatia - A 10 year retrospective study of four geographic regions. *Coll Antropol* 2006;30(Suppl.2):139-43.
26. Vince A, Kurelac I, Palmović D. Treatment of patients with chronic hepatitis C in Croatia. 5th Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation; 2006 Sep 23-2006 Sep 27; Zadar. Zagreb: Croatian Society of Infectious Diseases; 2006. p 26, No 34.
27. Kurelac I. Virusni hepatitis Duraković Z, i sur. *Gerijatrija - medicina starije dobi*. Zagreb: C.T.-Poslovne informacije d.o.o.; 2007. p 144-9.
28. Vince A, Iščić-Beš J, Židovec-Lepej S, Baća-Vrakela I, Bradarić N, Kurelac I, Vince DB. Distribucija genotipova hepatitis C virusa u Hrvatskoj: desetogodišnje retrospektivno istraživanje u četiri regije. 9. simpozij o spolno prenosivim bolestima i urogenitalnim infekcijama, Simpozij Slavka Schönwalda s međunarodnim sudjelovanjem; 2007 Mar 17-2007 Mar 19; Opatija. Zagreb: HDUGI; Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"; 2007. p 82, No 59.
29. Vince A, Židovec-Lepej S, Kurelac I, Baršić B, Kozić S, Klinar I, Žarković K. Virological and immunological characteristics of fatal Epstein-Barr virus mononucleosis in a 17-year-old Caucasian male presenting with meningoencephalitis and hemophagocytic syndrome. *J Neurovirol* 2007;13(4):389-96.
30. Vince A, Kurelac I. Liječenje virusnih hepatitisa u Hrvatskoj. Simpozij u povodu Svjetskog dana svjesnosti o virusnim hepatitisima "World Hepatitis Day"; 2008 May 16; Zagreb 2008.
31. Vince A, Kurelac I, Čajić V, Dušek D. Nove mogućnosti u liječenju kroničnog hepatitisa C. 74. znanstveno-stručni simpozij s međunarodnim sudjelovanjem "Nove spoznaje na području infektivnih bolesti" uz 80. obljetnicu Odjela za infektivne bolesti OB Šibenik; 2008 Apr 10-2008 Apr 12; Šibenik. Zagreb: HDIB HLZ-a; 2008. p 21, No 1.
32. Budimir J, Iščić-Beš J, Planinić A, Dušek D, Kurelac I, Vince A, Židovec-Lepej S. Resistance of hepatitis B virus to lamivudine and adefovir in patients with chronic hepatitis B treated at the University Hospital for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević" during 2008 and 2009. 6th Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation; 2009 Oct 24-2009 Oct 27; Šibenik. Samobor: HDI; 2009. p 49, No 53.

33. Čajić V, Budimir J, Kurelac I, Dušek D, Židovec-Lepej S, Vince A. Treatment of chronic hepatitis C in complex patients - a case report. 6th Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation; 2009 Oct 24-2009 Oct 27; Šibenik. Samobor: HDI; 2009. p 51, No 55.
34. Vince A, Kurelac I, Budimir J, Dušek D, Čajić V, Židovec-Lepej S. Treatment of hepatitis C in a real-life setting in Croatia: observational study on a cohort of 318 patients. 6th Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation; 2009 Oct 24-2009 Oct 27; Šibenik. Samobor: HDI; 2009. p 24, No 21.
35. Vince A, Židovec-Lepej S, Kurelac I, Čajić V, Burek V, Dušek D, Budimir J. Suvremena dijagnostika i liječenje hepatitisa C. Infektol Glasn 2009;29(2):49-56.
36. Kurelac I, Židovec-Lepej S. Naša iskustva u liječenju bolesnika s kroničnim B hepatitisom lamivudinom - osvrt na klinički tijek i razvoj rezistencije. Simpozij u povodu Svjetskog dana hepatitisa; 2010 May 19; Zagreb 2010.
37. Vince A, Kurelac I, Čajić V, Dušek D, Budimir J. Treatment of chronic hepatitis C in a real-life setting. 2. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem; 2010 May 14-2010 May 16; Opatija. Zagreb: HDUGI; 2010. p 33, No 26.
38. Kurelac I, Papić N, Sakoman S, Orban M, Dušek D, Čorić M, Vince A. Intravenous Drug Users Can Achieve a High Sustained Virological Response Rate: experience From Croatian Reference Center for Viral Hepatitis. Hepat Mon 2011;11(12):986-92.
39. Papić N, Židovec-Lepej S, Kurelac I, Čajić V, Budimi J, Dušek D, Vince A. Treatment of chronic hepatitis C in Croatian war veterans: experiences from Croatian reference center for viral hepatitis. Croat Med J 2011;50(1):35-40.
40. Vince A, Kurelac I. Hepatitis C – suvremene mogućnosti liječenja uz osvrt na liječenje u Hrvatskoj. MEDIX 2011;17(96):178-82.
41. Vince A, Kurelac I. Naša iskustva u liječenju bolesnika s kroničnim B hepatitisom telbivudinom. 79. znanstveno-stručni simpozij s međunarodnim sudjelovanjem: Novosti u infektologiji; 2011 Jun 9-2011 Jun 11; Trogir. Samobor: HDIB; 2011.
42. Kurelac I, Zidovec Lepej S, Grgic I, Gorenc L, Papić N, Dusek D, Baršić B, Vince A, Chemokine CXCL10 at week 4 of treatment predicts sustained virological response in patients with chronic hepatitis C, Journal of Interferon & Cytokine research, 2012, acceptance letter, decision on manuscript ID JICR-2012-0006.R1

## **11. POPIS SLIKA, TABLICA I GRAFIKONA**

### **Slike**

- Slika 1. Urođeni i stečeni imuni odgovor u HCV infekciji
- Slika 2. HCV RNA inducira aktivaciju IRF-3 te produkciju interferona
- Slika 3. Inhibitorni učinci HCV virusa na ekspresiju interferonom stimuliranih gena
- Slika 4. Ekspresija kemokina i kemokinskih receptora u jetri u toku HCV virusne infekcije
- Slika 5. Okupljanje limfocita u jetrenom parenhimu
- Slika 6. Amplifikacija citokinskog odgovora u HCV infekciji

### **Tablice**

- Tablica 1. Kemokini i kemokinski receptori
- Tablica 2. Plan pretraga u toku i nakon terapije pegiliranim interferonom i ribavirinom.
- Tablica 3. Patohistološka evaluacija stupnja aktivnosti hepatitisa i fibroze po Ishaku.
- Tablica 4a. Bazične karakteristike bolesnika uključenih u studiju
- Tablica 4b. Početna viremija bolesnika uključenih u studiju
- Tablica 4c. HAI index bolesnika uključenih u studiju
- Tablica 4d. Stadij fibroze bolesnika uključenih u studiju
- Tablica 5. Virusološki odgovor u toku terapije HCV infekcije.
- Tablica 6. Ishod liječenja ispitanika obzirom na RVR, EVR, ETVR i SVR
- Tablica 7. Koncentracije kemokina u plazmi bolesnika s kroničnim hepatitisom C bazirane na odgovoru na liječenje pegiliranim interferonom alfa2a i ribavirinom
- Tablica 8. Multivarijatna analiza parametara povezanih s CXCL10 koncentracijama u toku liječenja kronične HCV infekcije (generalizirani linearni model)
- Tablice 9 a, b, c Vrijednosti kemokina CXC9, CXCL10 i CXCL11 u odnosu na RVR
- Tablice 10a, b, c Vrijednosti kemokina CXC9, CXCL10 i CXCL11 u odnosu na EVR



- Tablica 11. Odnos koncentracije CXCL9 i stadija fibroze
- Tablica 12. Odnos koncentracije CXCL10 i stadija fibroze
- Tablica 13. HCV NS3-CINGVCWTV specifični CD8+ T limfociti u perifernoj krvi bolesnika s kroničnim hepatitisom C tijekom liječenja

### **Grafikoni**

- Grafikon 1. Stupanj fibroze u liječenih bolesnika
- Grafikon 2. HAI Index u liječenih bolesnika
- Grafikon 3. Virusološki odgovor (RVR;EVR;ETVR i SVR) u toku liječenja
- Grafikon 4. Udio non respondera, relapsera i virusološkog proboda među bolesnicima koji nisu postigli trajni odgovor na terapiju
- Grafikon 5a. Odnos inicijalnih vrijednosti RNK i CXCL9
- Grafikon 5b. Odnos inicijalnih vrijednosti HAI indeksa i CXCL9
- Grafikon 5c. Odnos dobi i inicijalnih vrijednosti CXCL 9
- Grafikon 6a. Odnos HAI indexa i inicijalne vrijednosti CXCL10
- Grafikon 6b. Odnos inicijalnih vrijednosti HCV RNA i vrijednosti CXCL10
- Grafikon 6c. Odnos dobi i inicijalne vrijednosti CXCL10
- Grafikon 7a. Odnos inicijalnih vrijednosti HCV RNA i vrijednosti CXCL11
- Grafikon 7b. Odnos HAI indeksa i inicijalnih vrijednosti CXCL11
- Grafikon 7c. Odnos dobi i inicijalnih vrijednosti CXCL1
- Grafikon 8. Grafikon 8 Koncentracije CXCL9 u toku terapije obzirom na SVR/non-SVR
- Grafikon 9. Koncentracije CXCL10 u toku terapije obzirom na SVR/non-SVR
- Grafikon 10. Koncentracije CXCL11 u toku terapije obzirom na SVR/non-SVR
- Grafikon 11. Usporedba prediktivnih vrijednosti CXCL10 nivoa za virusološki odgovor na terapiju
- Grafikon 12. Koncentracija CXCL10 obzirom na RVR
- Grafikon 13. Koncentracija CXCL9 obzirom na RVR
- Grafikon 14. Koncentracija CXCL10 obzirom na EVR/ non-EVR
- Grafikon 15. Vrijednosti kemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 u HCV infekciji u odnosu na stupanj fibroze
- Grafikon 16. HCV NS3-CINGVCWTV specifični CD8+ T limfociti u perifernoj krvi bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije liječenja (reprezentativni prikaz)

- Grafikon 17. HCV NS3-CINGVCWTV specifični CD8+ T limfociti u perifernoj krvi bolesnika s kroničnim hepatitisom C nakon 3 mjeseca liječenja
- Grafikon 18. HCV NS3-CINGVCWTV specifični CD8+ T limfociti u perifernoj krvi bolesnika s kroničnim hepatitisom C nakon 6 mjeseci liječenja
- Grafikon 19. Negativna kontrola za bojanje dekstramerom (HLA-A\*0201-pozitivna HCV-negativna osoba)