Polimorfizam gena za interleukin 28B u osoba zaraženih virusom hepatitisa C

Čerina, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:059168

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Mia Čerina

Polimorfizam gena za interleukin 28B u osoba zaraženih virusom hepatitisa C

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad, izrađen u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Odsjek za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku, pod mentorstvom Dr. sc. Snježane Židovec Lepej, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Dr. sc. Snježani Židovec Lepej najljepše hvala na iskazanom povjerenju, stručnim savjetima i danoj mogućnosti da izradim diplomski rad u željenom laboratoriju.

Neizmjerno se zahvaljujem dr. sc. Ivani Grgić na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem dipl. ing. Lani Gorenec na pomoći i susretljivosti prilikom izrade diplomskog rada.

Svim članovima Odjela za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku zahvaljujem na pomoći i vremenu.

Posebno hvala mojim roditeljima koji su me podržavali i bili mi neprestani oslonac tijekom cijelog studija.

Mia

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Polimorfizam gena za interleukin 28B u osoba zaraženih virusom hepatitisa C

MIA ČERINA

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Virus hepatitisa C (HCV) zaražava hepatocite i limfocite. Dio osoba zaraženih virusom spontano će se osloboditi virusa tijekom akutne faze infekcije, dok će oko 80 % zaraženih razviti kroničnu infekciju. Kronična infekcija HCV-om može uzrokovati cirozu jetre i karcinom. Osobe zaražene genotipom 1 HCV-a dulje se liječe antivirusnim lijekovima u odnosu na osobe zaražene genotipovima 2 i 3, a uspješnost liječenja je značajno manja. Interleukin-28B pripada skupini interferona λ čije djelovanje inhibira replikaciju virusa. Polimorfizam jednog nukleotida rs12979860 u promotorskoj regiji gena za IL-28B povećava ekspresiju gena i jedan je od čimbenika koji utječu na tijek zaraze HCV-om. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti povezanost između genotipa HCV-a, polimorfizma rs12979860 gena za IL-28B i viremije u serumu u osoba s kroničnim hepatitisom C. Iz seruma ispitanika izolirana je virusna RNA, qRT-PCR metodom određena je koncentracija virusne RNA po mikrolitru seruma te je metodom reverzne hibridizacije određen genotip HCV-a. Iz pune krvi ispitanika izolirana je ljudska DNA te RT-PCR metodom određen je polimorfizam rs12979860 gena za IL-28B. Ne postoje statistički značajne razlike između C homozigota, T homozigota i heterozigota u opsegu viremije pri ulasku u kliničku skrb.

(43 stranice, 14 slika, 6 tablica, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: virus hepatitisa C, genotip, interleukin-28B

Voditelj: Dr. sc. Snježana Židovec Lepej, znanstvena savjetnica

Suvoditelj: Doc. dr.sc. Inga Marijanović, docent

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Ivančica Ternjej, izvanredni profesor

Doc.dr.sc. Inga Marijanović, docent

Doc.dr.sc. Duje Lisičić, docent

Rad prihvaćen: 02.04.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology Graduation Thesis

Polymorphism of interleukin 28B gene in hepatitis C virus infected individuals

MIA ČERINA

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

The hepatitis C virus (HCV) infects hepatocytes and lymphocytes. In a smaller portion of the infected population, the virus is eradicated spontaneously during the acute phase of the inflammation. On the other hand, around 80 % of the infected population suffers chronic inflammation, which may lead to liver cirrhosis and cancer. In comparison to those infected by genotypes 2 and 3, individuals infected by HCV genotype 1 have a prolonged antiviral treatment time, as well as lower treatment success rates. Interleukin-28B belongs to the interferon λ family, whose prominent function is the inhibition of viral replication. The single-nucleotide polymorphism rs12979860 in the promotor region of the IL-28B gene enhances the expression of the gene and is one of the factors influencing the course of HCV infection. The aim of this study was to determine the correlation between the HCV genotype, the polymorphism rs12979860 in the IL-28B gene and the viraemia in people suffering chronic hepatitis C. We isolated the viral RNA from the serum of patients, determined its concentration per microliter of serum using qRT-PCR and determined the HCV genotype using reverse hybridization. We isolated human DNA from patients whole blood and determined the polymorphism rs127979860 of the IL-28B gene using RT-PCR. There are no statistically significant differences between C homozygous, T homozygous and heterozygous individuals in intial viral load.

(43 pages, 14 figures, 6 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis stored in the Central Biological Library

Key words: hepatitis C virus, genotype, interleukin-28B

Supervisor: Dr.sc. Snježana Židovec-Lepej, Scientific advisor

Co-supervisor: Dr. sc. Inga Marijanović, Assistant professor

Reviewers: izv. prof. dr. sc. Ivančica Ternjej, Associate professor

Doc.dr.sc. Inga Marijanović, Assistant professor

Doc.dr.sc.Duje Lisičić, Assistant professor

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Imunološki sustav 1
1. 2. Citokini 2
1.2.1. Interferoni 2
1.2.2. Interleukin–28B 3
1.3. Virus hepatitisa C 4
1.4. Morfološke karakteristike i organizacija genoma HCV-a 5
1.5. Genotipovi HCV-a 8
1.6. Životni ciklus HCV-a 9
1.7. Imunopatogeneza HCV infekcije 11
1.8. Put prijenosa HCV-a 13
1.9. Dijagnostika i liječenje HCV infekcije 13
1.10. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 19
3. MATERIJALI I METODE 20
3.1. Ispitanici 20
3.2. Biološki uzorci 20
3.3. Reagensi i otopine 20
3.3.1. Reagensi i otopine za izolaciju ljudske DNA 20
3.3.2. Reagensi i otopine za PCR u stvarnom vremenu 21
3.3.3. Reagensi i otopine za kvantitativni RT-PCR 21
3.3.4. Reagensi i otopine za određivanje genotipa 22
3.4. Oprema, računalni programi i potrošni materijal 22
3.5. Metode 23
3.5.1. Izolacija ljudske DNA 23

3.5.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu 24
3.5.3. Kvantitativni RT-PCR 26
3.5.4. Određivanje genotipa metodom reverzne hibridizacije 26
3.6. Statističke metode 27
4. REZULTATI 28
4.1. Podaci o ispitanicima 28
4.2. Analiza genotipova virusa HCV-a 28
4.3. Rezultati viremije 30
4.4. Analiza polimorfizma jednog nukleotida za IL-28B 31
4.5. Statistička analiza učestalosti viremije i polimorfizma IL-28B 32
5. RASPRAVA 33
6. ZAKLJUČCI 37
7. LITERATURA 38
8. ŽIVOTOPIS 43

1. UVOD

1.1. Imunološki sustav

Imunologija je biomedicinska znanost koja proučava imunost tj. obranu organizma od stranih stvari (antigena). Sastavni dijelovi imunološkog sustava su limforetikularni organi, stanice i molekule koje posreduju u imunosti. Postoje dvije temeljne vrste obrambenih mehanizama u organizmu; nespecifični (urođeni) i specifični (stečeni). Urođena imunost sastoji se od čitavog niza nespecifičnih mehanizama zaštite od infekcije koji uključuju fizičke barijere, urođeno ubilačke stanice (engl. *natural killer cells*, NK), mononuklearne fagocite i polimorfonuklearne limfocite, enzime sustava komplementa, molekule koje prepoznaju obrasce strukture mikroba te solubilne medijatore tj. citokine koji koordiniraju sve aspekte imunosti. Efektorski mehanizmi urođene imunosti ne razlikuju pojedine vrste antigena i izostaje imunološka memorija, ali reakcija je vrlo brza.

Stečenu imunost čine mehanizmi koji se induciraju ili stimuliraju nakon specifičnog prepoznavanja stranog antigena u organizmu. Obrambena sposobnost stečene imunosti povećava se pri svakom slijedećem kontaktu s određenim antigenom što se naziva imunološkom memorijom (Andreis i sur., 2010). Na temelju efektorskih mehanizama razlikujemo dva oblika stečene imunosti: humoralni i stanični. Ulazak bilo kojeg antigena potiče stvaranje obaju oblika imunosti, ali često izrazito prevladava jedan oblik, ovisno o antigenu i načinu imunizacije. Humoralna imunost je imunost posredovana protutijelima. Protutijela se stvaraju nakon ulaska nekog antigena u organizam, bilo slobodnog topljivog, bilo vezanog na površinu neke čestice (Murphy i sur. 2007). Antitijela sintetiziraju aktivirani limfociti B (plazma stanice), dok je stanična imunost posredovana limfocitima T. Limfociti se općenito definiraju kao stanice koje specifično prepoznaju antigene i sudjeluju u njihovoj eliminaciji (Shoukry i sur., 2004).

1. 2. Citokini

Citokini su glikoproteini niske molekularne mase koji posreduju u međustaničnoj komunikaciji. Potiču aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, posreduju ili reguliraju imunoreakcije i upalne procese, a mogu djelovati i citotoksično. Prenose informacije među stanicama i važni su medijatori upalnih bolesti. Luče ih mnogobrojne stanice u organizmu, ali većinom imunološke i upalne stanice. Efektorske funkcije ovih proteina su aktivacija i diferencijacija stanice, kemotaksija i proliferacija širokog spektra stanica. Citokine dijelimo na interleukine, interferone, citoksine i čimbenike rasta hematopoetskih kolonija (Andreis i sur., 2010).

1.2.1. Interferoni

Interferoni (IFN) spadaju u skupinu imunostimulirajućih citokina. Predstavljaju prirodne proteine s nespecifičnom regulatornom aktivnošću. Interferoni su ključni citokini koji sudjeluju u antivirusnom odgovoru. Razlikujemo tri tipa interferona (tip I, tip II i tip III) podijeljenih na temelju upotrebe receptora, strukture i biološke aktivnosti. Utječu na rast i diferencijaciju stanica, mijenjaju imunološki odgovor, te inhibiraju replikaciju mnogih virusa uključujući viruse hepatitisa B i C (Pestka i sur., 2004). Interferoni pojačavaju imunološki odgovor stimulirajući aktivnost imunoloških stanica i čineći stanice koje su inficirane virusom podložnijim na odgovor imunološkog sustava. Imunološki odgovor posredovan interferonima uključuje aktivaciju makrofaga, NK stanica (engl. *natural killer*) i citotoksičnih T-limfocita, te produkciju T-pomoćničkih stanica tipa 1. Protuupalno djelovanje sastoji se u inhibiciji produkcije TNF (engl. *tumor necrosis factor*), interleukina (IL)-1 i IL- 8, te stimulaciji produkcije IL-10 (Andreis i sur., 2010).

1.2.2. Interleukin–28B

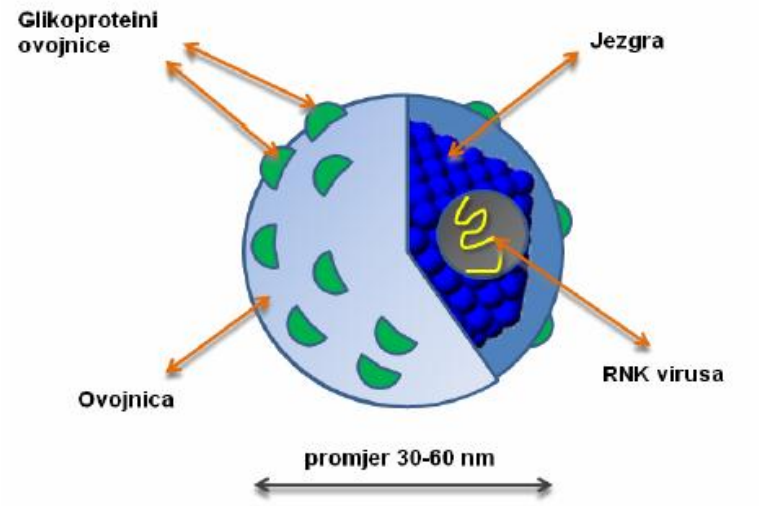
Interleukin-28B (IL-28) je citokin koji se zajedno s IL-29 i IL-28A ubraja u interferon tipa III tj. IFN-λ (Kotenko i sur., 2003, Vilcek, 2003). Interferoni klase I i III sintetiziraju se nakon virusne infekcije i iskazuju snažan antivirusni učinak. Geni koji kodiraju sintezu IFN-λ nalaze se na 19. kromosomu i imaju 4 introna koji se nalaze na pozicijama konzerviranim u genima za sve molekule iz porodice IL-10 sličnih citokina. Biomedicinska istraživanja pokazala su značajnu povezanost između prisutnosti SNP-a rs12979860 i rs809917 koji se nalaze 3kb uzvodno od gena za IL28-B na 19. kromosomu i učestalosti spontane eliminacije virusa te ishoda liječenja kroničnog hepatitisa C. Prva takva istraživanja objavljena su 2009. i 2010. godine kroz četiri neovisna cjelogenomska asocijacijska istraživanja (engl. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS) (Ge i sur., 2009, Suppiah i sur., 2009, Tanaka i sur., 2009, Rauch i sur., 2010).

Polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) predstavlja najčešći oblik varijacije u odsječku DNA. Polimorfizam jednog nukleotida rs12979860 u promotoru genu za IL-28B povećava ekspresiju interferona λ te je jedan od čimbenika koji odlučuju o tijeku zaraze virusom hepatitisa C. U osoba koje su C homozigoti češće dolazi do spontanog izliječenja kao i do izliječenja pomoću antivirusne terapije za razliku od osoba koje su heterozigoti ili T homozigoti. Trajni virološki odgovor (engl. *sustained virologic response*, SVR) kod oboljelih koji su C homozigoti dostiže visokih 70 % u usporedbi s 25-30 % u oboljelih koji su heterozigoti ili T homozigoti. Utjecaj polimorfizma gena za IL-28B primijećen je osobito kod oboljelih s HCV genotipom 1, dok je utjecaj polimorfizma u manjoj mjeri izražen kod oboljelih s genotipom 2 i 3. Dosadašnja istraživanja pokazala su da je polimorfizam gena za IL-28B bolji prediktor trajnog virološkog odgovora u usporedbi s viremijom u serumu prije početka liječenja, stupnjem fibroze, dobi i spolom bolesnika. Biološka i klinička značajnost genotipa IL-28B dokazana je i u bolesnika s HIV/HCV koinfekcijom (Poljak i sur., 2013).

1.3. Virus hepatitisa C

Virus hepatitisa C je jednolančani, pozitivno usmjereni RNA virus s lipidnom ovojnicom. Virusna čestica ima sferičan oblik te je veličine oko 60 nm. Nukleokapsida je promjera 30 nm, ovijena lipidnom ovojnicom u kojoj su usidreni proteini (slika 1.). Pripada rodu *Hepacivirusa* iz porodice *Flaviviridae* te zaražava hepatocite i limfocite (Penin i sur., 2004). Virus hepatitisa C otkriven je 1989. godine (Choo i sur., 1989). Njegovim je otkrićem razjašnjena etiologija velikog broja posttransfuzijskog hepatitisa dotad nepoznatog uzroka. Specifična anti-HCV protutijela nađena su u 70-90 % bolesnika s posttransfuzijskim „non-A", „non-B" hepatitisom. Osim virusa hepatitisa C, postoje i drugi tzv. hepatotropni virusi koji mogu izazvati hepatitis pa razlikujemo viruse hepatitisa A, B, D, E te hepatitisa G. (Hoofnagle, 2002).

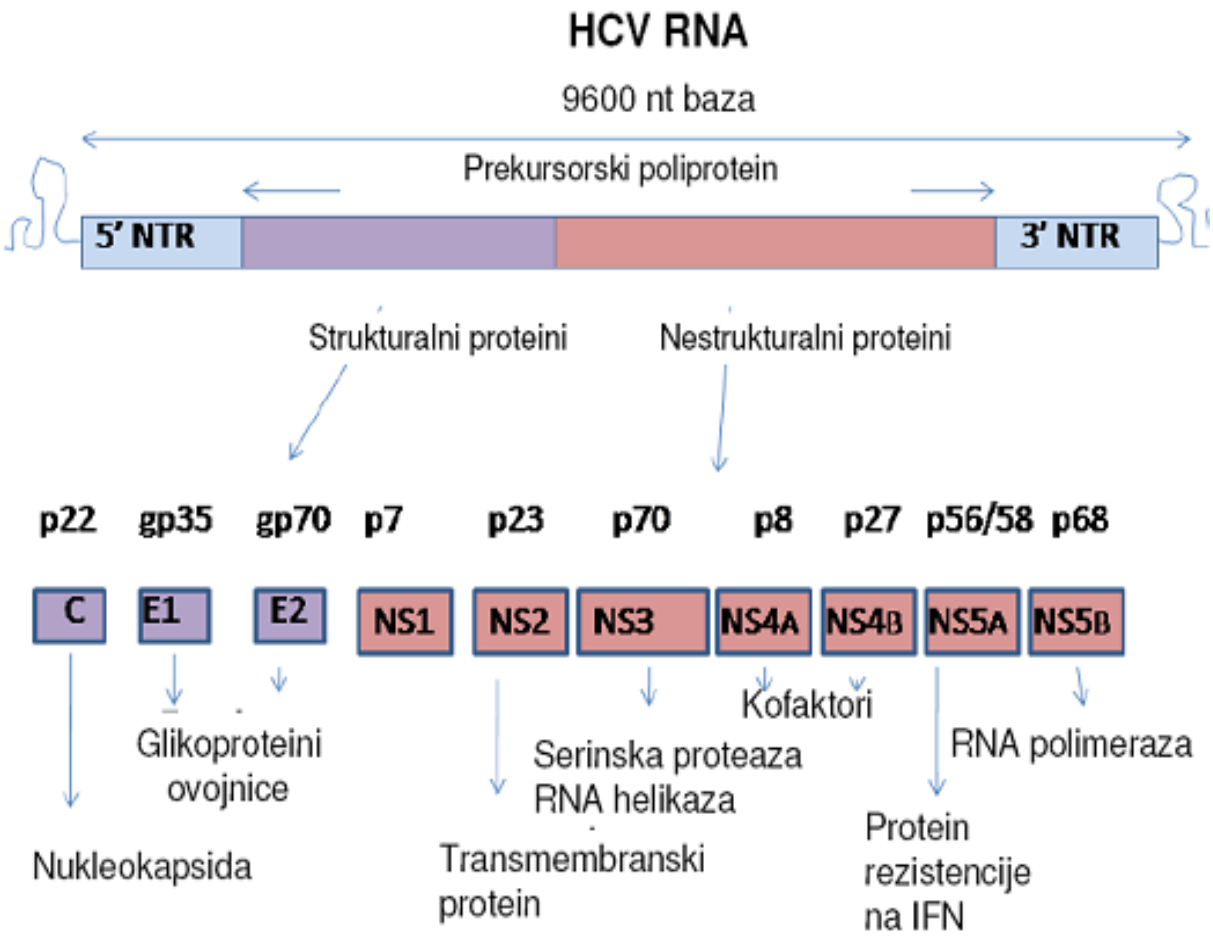
Hepatitisom C zaraženo je 2,2 % svjetske populacije, odnosno više od 170 milijuna ljudi u svijetu (Naggie, 2012). Glavni put prijenosa HCV-a je putem zaražene krvi dok se rjeđe može prenijeti i spolnim odnosom te tijekom poroda sa zaražene majke na dijete (perinatalni put). Inicijalna faza HCV-a naziva se akutnom infekcijom. Akutni HCV obično traje 2-12 tjedana (Ozaras, Tahan, 2009). Dio osoba zaraženih virusom spontano će eradicirati virus tijekom akutne faze infekcije dok će oko 80 % zaraženih razviti kroničnu infekciju. Tijek infekcije ovisi o genotipu virusa kao i o genetici zaražene osobe.



Slika 1. Izgled čestice HCV-a. Virusna čestica je sferična oblika, veličine oko 60 nm. Nukleokapsida je promjera 30 nm, ovijena lipidnom ovojnicom na kojoj se nalaze glikoproteinski izdanci (preuzeto s http://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_C_virus)

1.4. Morfološke karakteristike i organizacija genoma HCV-a

Virusi iz porodice *Flaviviridae* dijele niz temeljnih i strukturnih virioloških obilježja. Nukleokapsida je ikozaedarske strukture, obavijena lipidnom ovojnicom na kojoj se nalaze glikoproteinski izdanci. Genom HCV-a čini jednolančana pozitivna (+) RNA s genomom od 9600 nukleotida koja sadrži tri regije: kratku nekodirajuću regiju (engl. *nontranslanted region,* NTR) na 5' kraju, veliko otvoreno područje kodiranja (engl. *open reading frame,* ORF) i kratku nekodirajuću regiju na 3' kraju (Slika 2.). Produkt prevođenja velikog otvorenog područja kodiranja je poliprotein od 3000 aminokiselina koji se posttranslacijski cijepa pomoću virusnih i staničnih proteaza u 10 proteina. Tri strukturna proteina su protein nukleokapside (C) te dva glikoproteina ovojnice (E1 i E2). Ukupno je pet nestrukturnih proteina (NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B), većinom enzima koji sudjeluju u procesu umnožavanja te proteini (p7 i NS2) koji imaju ulogu u sastavljanju infektivnih viriona (Tablica 1.) (Moradpour, Penin, 2013). Strukturne proteine od nestrukturnih dijeli kratki peptid p7. U području E2 proteina nalaze se dvije hipervarijabilne regije (HVR1, HVR2) koje su podložne genskim mutacijama, a samim time su i mjesto najveće mogućnosti virusnog izbjegavanja obrambenim mehanizmima imunološkog sustava zaraženog pojedinca. Zbog svoje varijabilnosti, glikoproteini ovojnice (E1 i E2) najmanje su pouzdani kao ciljno mjesto lijekova, dok je inhibicija funkcije proteina NS3 te NS5 ciljno mjesto potencijalnih antivirusnih terapija (Basu i sur., 2004).



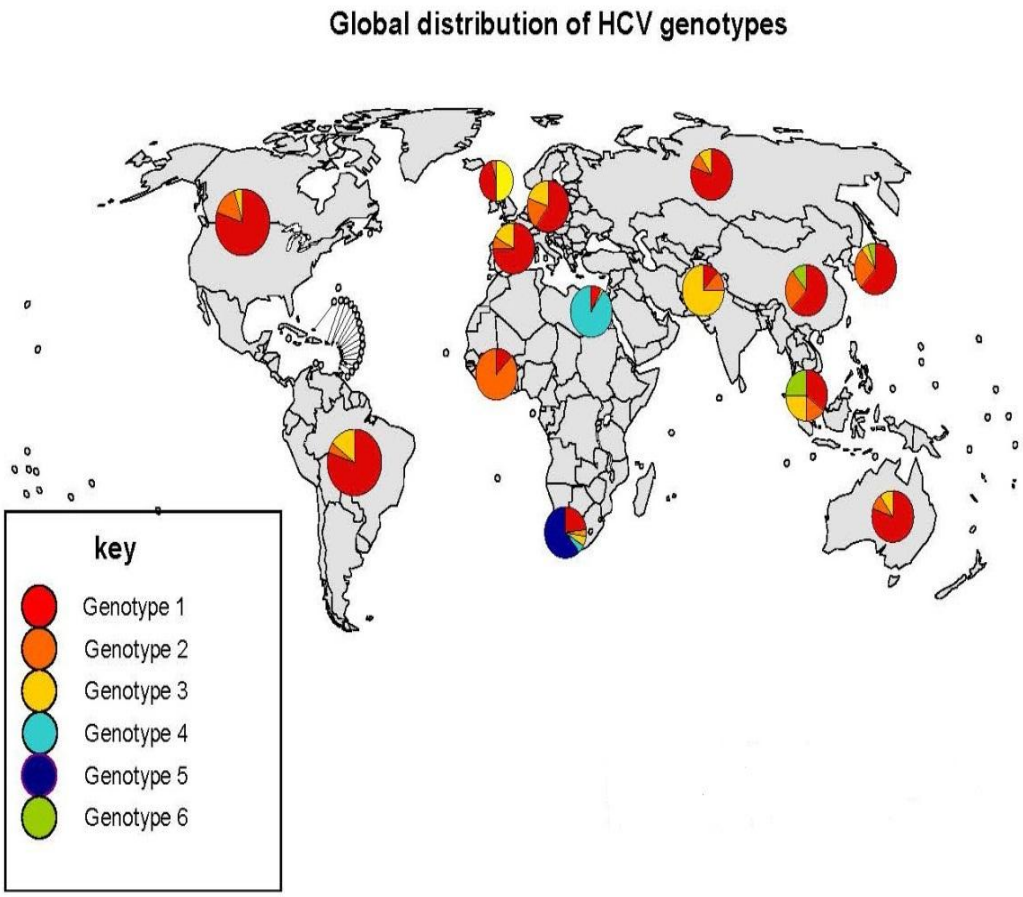
Slika 2. Prikaz genoma HCV-a koji čini jednolančana pozitivna (+) RNA veličine ~9.6 nukleotida koja sadrži tri regije: kratku nekodirajuću regiju na 5' kraju, veliko otvoreno područje kodiranja (engl. open reading frame, ORF) i kratku nekodirajuću regiju na 3'kraju. (preuzeto s http://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_C_virus)

Tablica 1. Funkcija proteina virusa hepatitisa C (Bennet i sur., 2015)

Protein	**MT**	**Funkcija**
Core (C)	21 kd	Sudjeluje u tvorbi kapside. Regulira translaciju, RNA-replikaciju i sklapanje čestica
F-protein ili ARFP	16-17 kd	Nepoznata
Glikoprotein ovojnice 1 (E1)	35 kd	Transmembranski glikoprotein virusne ovojnice. Adsorpcija, endocitoza posredovana receptorom.
Glikoprotein ovojnice 2 (E2)	70 kd	Transmembranski glikoprotein virusne ovojnice. Adsorpcija, endocitoza posredovana receptorom.
p7	7 kd	Oblikuje ionski kanal u endoplazmatskom retikulumu. Esencijalan u oblikovanju infektivnih viriona.
NS2	21 kd	Dio NS2-NS3-proteaze koja katalizira cijepanje poliproteinske preteče između NS2 i NS3
NS3	70 kd	NS2-NS3-serin proteaza, cijepanje HCV-proteina. ATPaza/helikaza, spajanje i odmotavanje virusne RNA.
NS4A	4 kd	Kofaktor NS3-NS4-proteaze, replikacija genoma
NS4B	27 kd	Presudna u replikaciji. Potiče membransku mrežu endoplazmatskog retikuluma tijekom HCV-replikacije.
NS5A	56 kd	Višefunkcionalni fosfoprotein. Sadržava regiju koja određuje osjetljivost na interferon (engl. INF-α *sensitivity-determining region*, ISDR). ISDR ima važnu ulogu u odgovoru na liječenje s pomoću INF-α.
NS5B	66 kd	Virusna RNA-polimeraza ovisna o RNA. NS5B je enzim koji nema sposobnost prepoznavanja pogrešno umetnutih nukleotida (pogreška na svakih 10^3 i nukleotidu po generaciji)

1.5. Genotipovi HCV-a

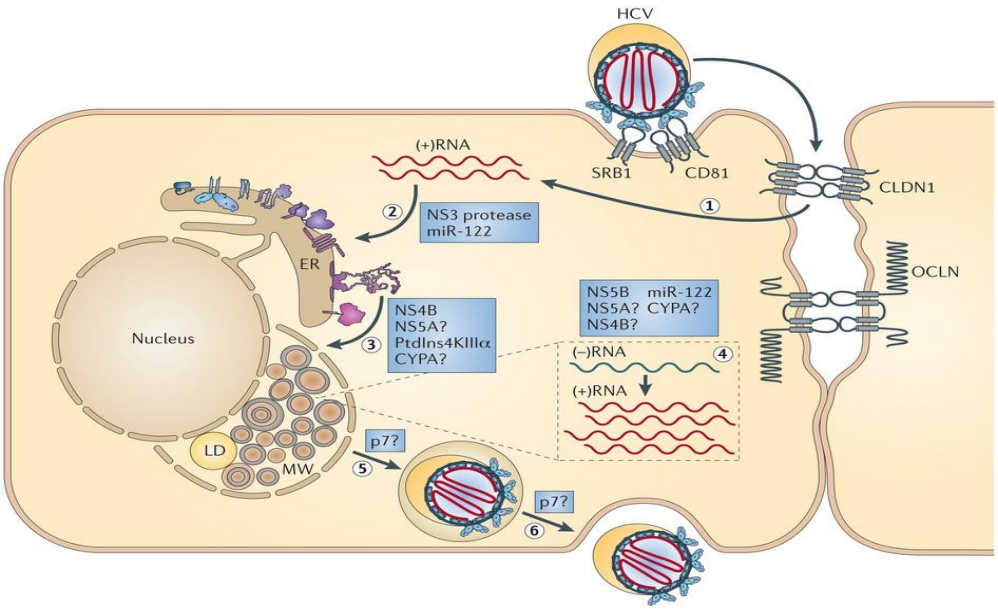
Prema najnovijoj klasifikaciji genotipovi HCV-a dijele se na 7 genotipova te na 67 podtipova (Smith i sur., 2014). Genotip 7 nađen je kod pacijenata u Kongu (Murphy i sur., 2007). Prema navodima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) moguće je postojanje čak 11 genotipova HCV-a. Pojedini se genotipovi u nukleotidnom slijedu razlikuju 31-33 %, dok se podtipovi razlikuju oko 20-25 %. Izolati HCV-a iz različitih dijelova svijeta pokazuju značajnu genetsku različitost. Genske varijacije posljedica su velike brzine umnožavanja virusa, izostanka djelotvornog popravka RNA te nemogućnošću RNA polimeraze da prepozna pogrešno umetnute nukleotide tijekom umnožavanja. Za određivanje genotipa koriste se 5' nekodirajuća regija te NS-5 regija virusa. Neki su genotipovi ograničeni na određena geografska područja (genotipovi 4-6), dok su drugi (genotipovi 1-3) široko rasprostranjeni. Genotip 1 (podtipovi 1a i 1b) najzastupljeniji je genotip u svijetu. Genotip 2 nalazimo u Mediteranskoj regiji, genotip 3 je rasprostranjen među intravenskim korisnicima droga, genotip 4 nalazi se uglavnom u Egiptu, genotip 5 gotovo isključivo u Južnoj Africi, te genotip 6 u jugoistočnoj Aziji (Hong Kong, Makau i Vijetnam) (Slika 3.) (Lindenbach i sur., 2007). Istraživanje provedeno na području Republike Hrvatske pokazalo je da su najčešći genotipovi 1 (58, 8 %) i 3 (35,6 %). Učestalost genotipova 2 i 4 je niska, a genotipovi 5 i 6 nisu detektirani. Najzastupljeniji podtipovi su 1b, 3a i 1a uz manje regionalne razlike (Vince i sur., 2006). Podaci o rasprostranjenosti HCV genotipova ukazuju na virusno podrijetlo, na migracije stanovništva, te na putove prijenosa bolesti, ali ujedno daju podatke važne za proučavanje virusne replikacije, tijek bolesti, antivirusnu terapiju, te za razvoj cjepiva (Poljak i sur., 2013).



Slika 3. Globalna razdioba genotipova (1-6) virusa hepatitisa C, dok je genotip 7 nađen samo u nekoliko slučajeva u Kongu (preuzeto s http://hepcbc.ca/wpcontent/uploads/2012/08/GlobalDist_HCV_genotypes.jpg)

1.6. Životni ciklus HCV-a

HCV se umnožava prvenstveno unutar hepatocita, a može inficirati i B limfocite, dentritičke stanice i ostale periferne mononuklearne stanice (Kondo, Shimosegawa, 2013). Umnožavanje HCV-a započinje vezanjem virusa za stanične receptore (Slika 4.). Neki se receptori nalaze na različitim stanicama, dok su drugi specifični za pojedinu vrstu stanica. Dosad dokazane molekule koje se vežu s HCV-om su CD81, lipoproteinski receptor niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*, LDL), čistački receptor tipa B (engl. *scavenger receptor B type*, SR-BI), lektini C-tipa: DC-SIGN (engl. *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin*) i L-SIGN (engl. *liver/lymph nodespecific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*) (Poccia, Agrati, 2003, Reynolds i sur., 2008). Novija istraživanja potvrdila su postojanje novih receptora klaudina-1 te okludina (Liu i sur., 2009).



Slika 4. Prikaz umnožavanja virusa hepatitisa C: (1) vezanje HCV-a za stanični receptor i ulazak u stanicu; (2) konformacijske promjene proteina HCV-a i otpuštanje HCV RNA u citoplazmu; (3) prevođenje u poliprotein pomoću IRES-a; (4) replikacija RNA; (5) sastavljanje HCV-a; (6) sazrijevanje HCV-a i izlazak iz stanice (preuzeto s http://www.nature.com/nrmicro/journal/v11/n7/fig_tab/nrmicro3046_F2.html)

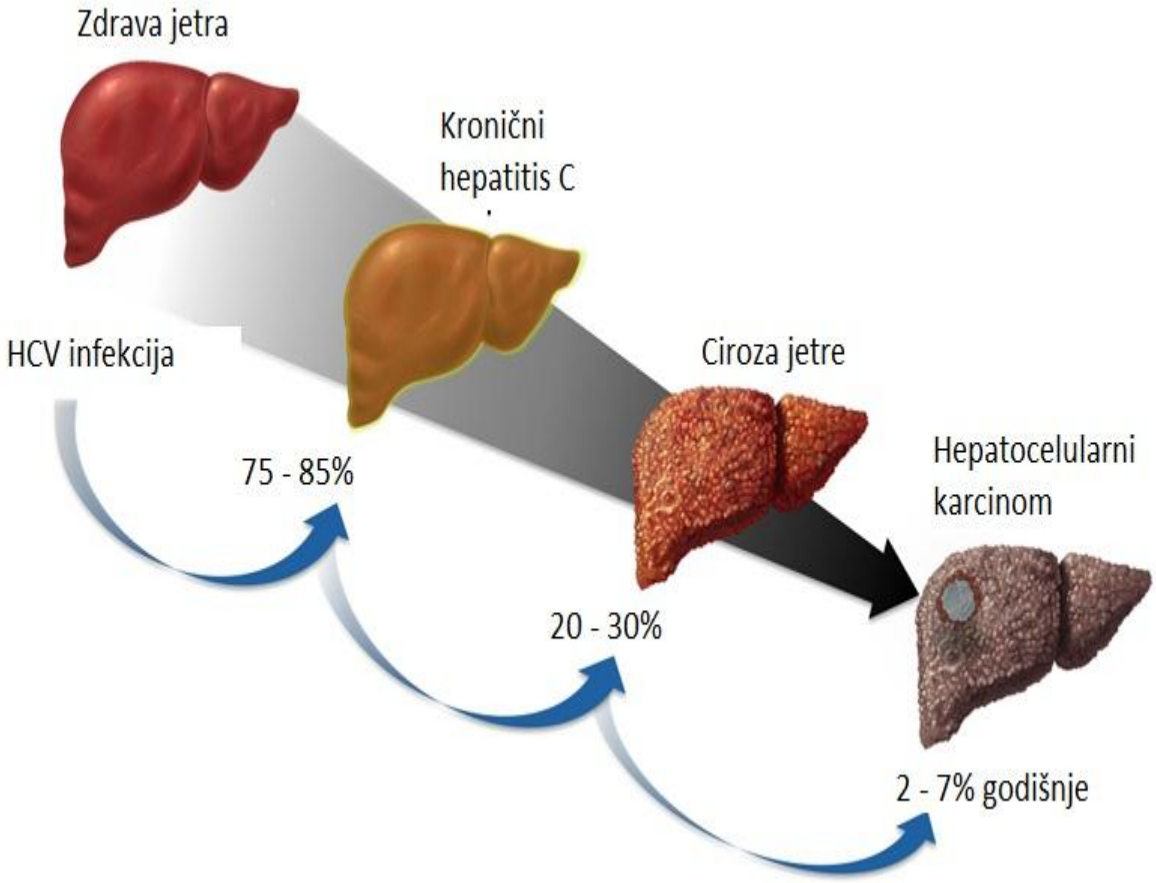
Većina saznanja o životnom ciklusu HCV-a utemeljena je na *in vitro* istraživanjima. Virus ulazi u stanicu posredovanom endocitozom (Aly i sur., 2012). Zbog niskog pH u endosomu dolazi do konformacijskih promjena proteina ovojnice, fuzije virusa s membranom endosoma (djelovanjem E1) te otpuštanja RNA u citoplazmu (Flint i sur., 1999). Po završetku translacije i replikacije proteini ovojnice s virusnom RNA formiraju nukleokapsidu nakon čega se virusne čestice otpuštaju iz stanice domaćina (Moradpour, Penin, 2013). HCV RNA na 5' kraju sadrži kompleksnu strukturu tzv. IRES (engl. *internal ribosomal entry site*) koja se veže na podjedinicu ribosoma 40S i omogućuje početak translacije. Genom djeluje kao mRNA i prevodi se u poliprotein. Strukturni se proteini cijepaju pomoću staničnih proteaza (signalna peptidaza), a nestrukturni proteini pomoću virusne NS2-NS3 proteaze i NS3 serinske proteaze. Nestrukturni proteini NS3-NS5B se spajaju i tvore kompleks replikaze na intracitoplazmatskim membranama koja kodira sintezu negativnog lanca RNA, a on služi kao kalup za sintezu pozitivnog lanca genoma. Novosintetizirana genomska RNA spaja se s proteinom kapside i tvori nukleokapsidu. Virus dobiva ovojnicu pupanjem kroz intracelularne vezikule, a iz stanice se oslobada egzocitozom ili lizom (McLauchlan i sur., 2002, Op De Beeck i sur., 2001).

1.7. Imunopatogeneza HCV infekcije

Infekcija HCV-om zabilježena je u gotovo svim dijelovima svijeta. Smatra se da se godišnje HCV-om zarazi oko tri do četiri milijuna ljudi. Udio oboljelih je značajno viši u afričkim područjima i zapadnim dijelovima Tihog oceana nego u Sjevernoj Americi i Europi. Procjenjuje se da je u Europi HCV-om zaraženo oko 4 milijuna ljudi (Brown, 2005).
Za potvrdu postojanja HCV infekcije je nužno dokazivanje prisutnosti anti-HCV protutijela ili HCV antigena. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), godišnje se registrira oko 400 slučajeva zaraze HCV-om.

Hepatociti su primarno mjesto umnožavanja virusa i sadrže veliku količinu HCV-RNA (108-1011 kopija/gram tkiva), što je dokazano hibridizacijom *in situ*. Virus se nalazi u citoplazmi hepatocita i ne ugrađuje se u genom stanice domaćina (Lindenbach i sur., 2007). Genetski se materijal virusa hepatitisa C javlja rano tijekom HCV infekcije i prisutan je u organizmu tijekom akutne i kronične infekcije te je jasan dokaz infekcije HCV-om. Nespecifični odgovor na HCV infekciju uključuje NK (engl. *natural killer*) stanice, aktivaciju komplementa, interferon te produkciju citokina. Aktivirane dendritične stanice induciraju diferencijaciju T limfocita u virus specificne CD4+ i CD8+ limfocite T. Specifični imuni odgovor uključuje staničnu (citotoksični T-limfociti; CTL) i humoralnu imunost (protutijela) (Billerbeck i sur., 2007).

Akutna HCV infekcija u većini slučajeva (>80 %) protječe bez simptoma. Prosječno vrijeme do pojave protutijela specifičnih za HCV iznosi 8 do 9 tjedana. Kronični hepatitis C karakterizira aktivno umnožavanje virusa u trajanju duljem od šest mjeseci. Istraživanja su pokazala da više od 80 % osoba s akutnom HCV infekcijom ne uspijeva eradicirati virus što dovodi do uspostavljanja kronične infekcije koja može dovesti do fibroze i ciroze jetre (oko 25 %) te hepatocelularnog karcinoma (2-7 %) (Slika 5.) (Hoofnagle, 1997, Vince, 2005). Nakon izlaganja HCV-u imunološke stanice sakupljaju se u jetri u pokušaju kontrole virusne replikacije, te ipak u većini slučajeva uspostavlja se kronična infekcija. U ovoj fazi imunološki odgovori imaju istovremeno i koristan i štetan učinak na domaćina. Patogeneza jetrenog oštećenja najvjerojatnije je posljedica izravnog citopatskog učinka virusnih proteina i imunoloških mehanizama posredovanih citotoksičnim limfocitima i citokinima. (Wald i sur., 2007).



Slika. 5. Prikaz promjena na jetri uzrokovanih kroničnim HCV-om. Više od 80 % osoba s akutnom HCV infekcijom ne uspijeva eradicirati virus što dovodi do uspostavljanja kronične infekcije koja može dovesti do fibroze i ciroze jetre (oko 20-30 %) te hepatocelularnog karcinoma (2-7 %).
(preuzeto s http://www.hepatitisc.uw.edu/doc/34-1/natural-history-following-initial-infection-hcv.jpg)

1.8. Put prijenosa HCV-a

Virus hepatitisa C najčešće se unosi u ljudski organizam preko krvi (transfuzija krvi ili krvnih derivata), te krvlju onečišćenim nesterilnim iglama i špricama. Početkom godine 1993. u Hrvatskoj je uvedeno obvezno testiranje krvi dobrovoljnih davatelja na anti-HCV protutijela, i od tada su transfuzije kao uzročnik prijenosa HCV-a epidemiološki gotovo isključene. Danas se HCV najčešće prenosi korištenjem krvlju kontaminiranog pribora prilikom intravenskog uzimanja droga. Jedan od mogućih puteva prijenosa je i korištenjem inficiranog pribora prilikom tetoviranja ili *body piercinga* (Clarke, Kulasegaram, 2006).

Pored ovih češćih načina prijenosa HCV se rjeđe može prenijeti i spolnim odnosom te tijekom poroda sa zaražene majke na dijete (Indolfi, Resti, 2009, Thomas i sur., 2005). Rizik od seksualnog prijenosa HCV-a je veći ako je osoba istovremeno zaražena virusom humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV) (Verucchi i sur., 2004). Do perinatalnog prijenosa HCV-a dolazi u oko 5 % slučajeva, što ovisi o stupnju viremije zaražene majke u vrijeme poroda (Indolfi, Resti, 2009). Rizik je otprilike dvostruko veći ako je majka istovremeno zaražena HCV-om i HIV-om.

Prema podatcima iz literature, u čak 30-50 % zaraženih ne može se sa sigurnošću utvrditi put prijenosa HCV-a (Thomas i sur., 2005).

1.9. Dijagnostika i liječenje HCV infekcije

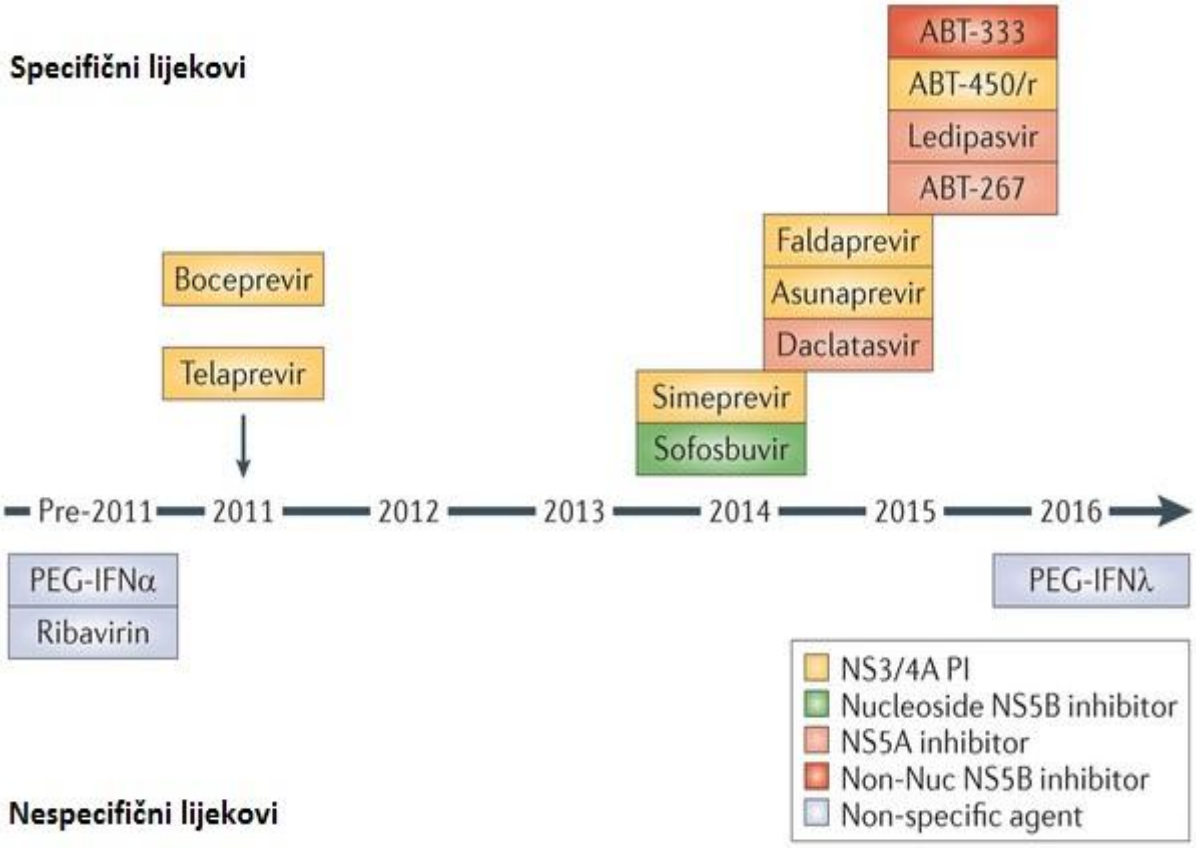
Dijagnostički testovi dijele se na serološke testove kojima se dokazuju anti-HCV protutijela, te na molekularne testove kojima se u inficirane osobe dokazuje, određuje i obilježuje HCV-RNA. Serološkim testovima utvrđuje se o kojem se virusnome hepatitisu radi te se procjenjuje je li hepatitis akutan ili kroničan (Grahovac, Hadžisejdić, 2006).

Testiranje za HCV započinje određivanjem specifičnih protutijela probirnim enzimskim imunotestovima. Probirni serološki testovi najnovije generacije osim anti HCV prepoznaju i antigen virusne kapside. Pozitivan anti-HCV probirni test ukazuje da je osoba bila u kontaktu s HCV-om, ali samo na temelju anti-HCV protutijela ne može se razlučiti je li riječ o aktivnom ili preboljelom hepatitisu C. U takvim slučajevima potrebno je napraviti testiranje na prisutnost HCV RNA, bez prethodnog potvrdnog testiranja na anti-HCV. Dokaz HCV RNA u serumu bolesnika odraz je aktivne replikacije virusa u jetri, što je znak aktivne infekcije. Metode za dokazivanje HCV RNA (ili antigena virusne kapside) također se upotrebljavaju kao probirne metode pri testiranju darivatelja krvi u nekim razvijenim zemljama, za dokazivanje HCV infekcije u bolesnika na hemodijalizi te u dojenčadi anti-HCV

pozitivnih majki. Potvrdni anti-HCV (RIBA, imunoblot) testovi koriste se samo kao dodatni testovi koji potvrđuju ili isključuju značenje reaktivnih rezultata probirnih enzimskih imunotestova u osoba koje su HCV RNA negativne (Poljak i sur., 2013).

Genotipizacija HCV-a i određivanje viremije u serumu dio su obvezne predterapijske obrade bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Suvremena terapija hepatitisa C sastoji se od kombinirane primjene pegiliranog interferona i ribavirina, u 2011. godini odobreni su također boceprevir te telaprevir kao inhibitori NS3/4A proteaze HCV-a te 2013. godine inhibitor proteaze simeprevir i sofosbuvir kao inhibitor polimeraze. Boceprevir, telaprevir, simeprevir i sofosbuvir koriste se u kombinaciji s pegiliranim interferonom i ribavirinom što predstavlja trojnu terapiju (Pawlotsky, 2014). U Hrvatskoj u liječenju kroničnog hepatitisa C primjenjuju se dva komercijalno dostupna pegilirana interferona koji imaju podjednaku učinkovitost i intenzitet nuspojava: pegilirani interferon alfa-2a (Pegasys®) i pegilirani interferon alfa-2b (PegIntron®) uz paralelnu primjenu ribavirina (Vince i sur., 2009). U ispitivanju su i mnogobrojni novi lijekovi kao inhibitori HCV proteaze i polimeraze, albumin interferon, te nukleozidni inhibitori (Slika 6.) (Manns, von Hahn, 2013).

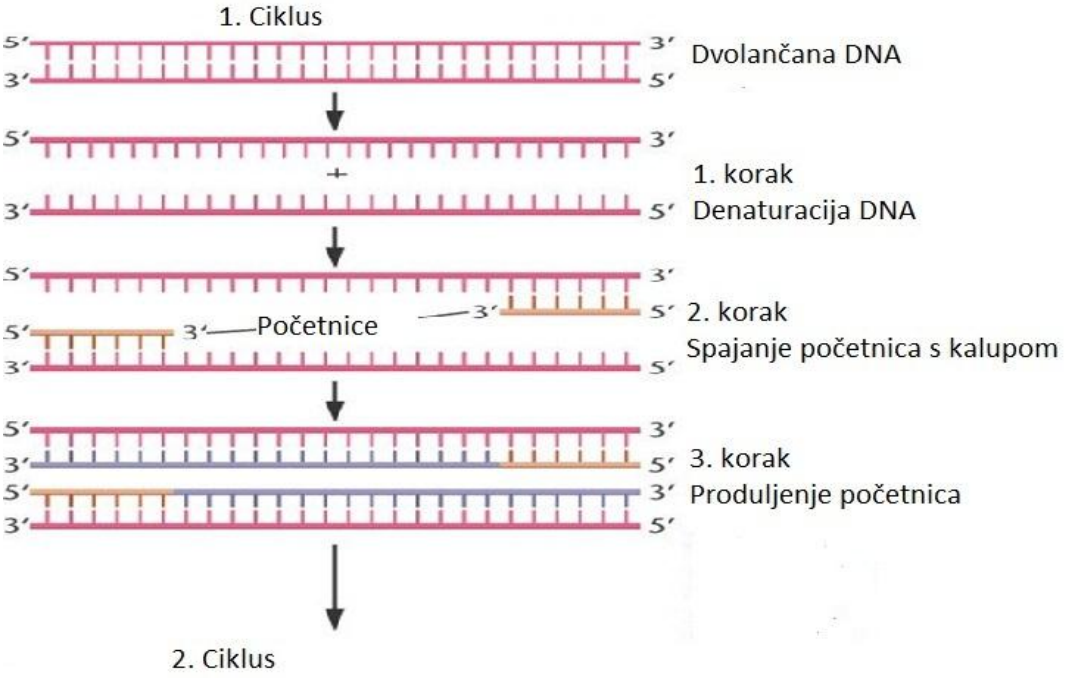
Mehanizam djelovanja interferona sastoji se u sprječavanju vezanja virusa na stanice, indukciji proteinske kinaze, smanjenju razine virusne RNA te stimulaciji citotoksičnih limfocita T i NK stanica. Pegilirani interferon alfa iskazuje antivirusni i imunomodulacijski učinak dok ribavirin inhibira sintezu virusne RNA i potiče nastanak Th1 tip odgovora (Ghany i sur., 2009). Trajni virološki odgovor (engl. *sustained viral response*, SVR) definira se odsutnošću virusa u krvi 6 mjeseci nakon završetka terapije i on iznosi oko 40-50 % za genotip 1 te 80 % za genotip 2 i 3. Brzi virusni odgovor (engl. *rapid viral response*, RVR) određuje se nakon 4 tjedna terapije i može biti prediktor potrebnog trajanja terapije. Bazalni čimbenici o kojima ovisi ishod liječenja su HCV-genotip, stupanj fibroze i steatoze, bazalna viremija, indeks tjelesne mase, prisutnost inzulinske rezistencije, dob, spol, rasa i koinfekcija HIV-om (Poljak i sur., 2013).



Slika 6. Shematski prikaz odobrenih lijekova za liječenje HCV infekcije te lijekova u stadiju istraživanja (preuzeto s http://www.nature.com/nrd/journal/v12/n8/images_article/nrd4050-f4.jpg)

1.10. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda koja omogućuje umnažanje određenog fragmenta nukleinske kiseline prema kalupu (izoliranoj DNA ili RNA). Reakcijsku smjesu čine termostabilna polimeraza, oligonukleotidne početnice duge 20-ak baznih parova, deoksinukleozid trifosfati (dNTP-ovi), dvovalentni kationi (Mg ili Mn), pufer za održavanje pH te DNA kao kalup za umnažanje. Optimizacija uvjeta PCR metode je proces u kojem je potrebno optimizirati tri glavna elementa reakcije: denaturaciju DNA kalupa, spajanje početnica sa kalupom te produljenje početnica polimerazom (slika 7.). Dvolančani DNA kalupi denaturiraju se na temperaturi od otprilike 96 °C, vezanje početnica odvija se na temperaturi od otprilike 56 °C, dok se produljivanje lanca događa pri temperaturi od otprilike 72 °C. Broj ciklusa potreban za amplifikaciju ovisi o broju kopija kalupa DNA prisutnih u početnoj reakciji i učinkovitosti produljenja početnica i amplifikacije. Ukoliko je ciljni fragment RNA potrebno je napraviti lančanu reakciju polimeraze reverznom transkripcijom. Lančana reakcija polimeraze sa reverznom transkripcijom odvija se u tri koraka: vezanje početnica, produljivanje lanca polimerazom te stvaranje cDNA.



Slika. 7. Faze PCR-a koje obuhvaćaju denaturaciju DNA, spajanje početnica s kalupom te produljenje početnica

(preuzeto s http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch19/PCR.html)

Postoje kvalitativni i kvantitativni PCR testovi. U kvalitativnom testu postoji granična vrijednost ispod koje se rezultati smatraju negativnima, a iznad pozitivnima. Kvantitativni testovi imaju gornju i donju granicu detekcije, te u rasponu između njih je moguće detektirati količinu produkta. Kvantifikacijski standard pomoću kojeg određujemo količinu ciljnog fragmenta je DNA poznate koncentracije (Scott i Gretch, 2007).

Detekcija produkta dobivenih klasičnim PCR-om je kvalitativna te se odvija na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. PCR produkti mogu se vidjeti nakon elektroforeze, bojanja etidijum bromidom, te obasjavanja UV svijetlom. Produkt je potrebno obojiti kako bi se mogao vizualizirati te je potrebno koristiti standardne markere kako bi se odredila veličina fragmenta. Hibridizacija obuhvaća postupak denaturacije dvolančane DNA u jednolančanu i detekciju jednolančane DNA s obilježenim, komplementarnim probama DNA. Jednolančani biotinizirani produkti vežu se za specifične oligonuleotidne probe vezane za nitrocelulozu trakicu na kojoj su probe za 6 genotipova HCV-a. Oligonukleotidne probe su specifične za 5' netranslatiranu regiju (engl. *5' untranslated region*, 5' UTR) te središnju regiju (engl. *core region*).

Kod metode PCR-a u stvarnom vremenu produkti reakcije obilježeni su fluorescentnom bojom i analiziraju se istovremeno dok i nastaju. Ovakvu metodu karakterizira širok dinamički raspon kvantifikacije i visoka analitička osjetljivost. Nespecifičan način detekcije PCR produkta, pri kojem se detektira bilo koji fragment umnožen tijekom PCR-a, odvija se korištenjem boja (etidij bromid, SYBR Green) koje interkaliraju u DNA. Specifična detekcija PCR produkta odvija se pomoću specifičnih proba na koje su vezani fluorokromi. Danas se najčešće koristi nekoliko reagensa s fluorescentnim signalom: probe FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*), probe s formom ukosnice („molecular beacon“), probe TaqMan te Škorpion početnice („Scorpion primers“). Probe koje se zasnivaju na FRET tehnologiji rade po principu da molekula koja je donor fluorofora apsorbira ekscitacijsku energiju te ju predaje akceptoru fluorofora preko interakcije dipol-dipol. Kada se donor i akceptor cijepanjem razdvoje, fluoroscentna proba mijenja sekundarnu strukturu ili položaj na lancu što rezultira povećanjem flouroscencije (Zhang, 2003). Probe koje imaju formu ukosnice na jednom kraju imaju vezanu signalnu molekulu (engl. reporter), a na drugom kraju prigušujuću boju (engl. quencher). Kad se proba veže na DNA, signalna molekula i prigušivač se razdvajaju čime više nije moguće emitiranje svjetlosti određene valne duljine. Probe TaqMan koriste egzonukleaznu aktivnost polimeraze da bi odvojili signalnu molekulu od prigušivača razgrađujući pritom probu. Kod Škorpion početnica na početnicu je vezana proba

u formi ukosnice koja na dva različita kraja ima signalnu molekulu i prigušivač. Tijekom vezanja na jednoj strani početnice se ukosnica razdvaja i veže na komplementarnu DNA, a na drugoj polimeraza nastavlja lanac. „*Simple Probe*“ su specifičan tip hibridizacijskih probi koje mogu detektirati mutacije i SNP. Obično ovakve probe su dizajnirane da specifično hibridiziraju s ciljnom sekvencom koja sadrži SNP od interesa. „*Simple Probe*“ jače fluoresciraju vezane na komplementarnu DNA nego samostalno u otopini. Povećanjem temperature prema Tm probe se odvajaju od komplementarnog lanca te se fluorescencija smanjuje. Kao rezultat, promjene u fluorescenciji baziraju se samo na hibridizacijskom statusu probe (Kengkate i sur., 2014).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je odrediti utjecaj genotipa virusa te polimorfizma rs12979860 gena za IL-28B na inicijalnu viremiju u osoba s kroničnom infekcijom virusom hepatitisa C. Koncentraciju virusne RNA u serumu ispitanika prije početka terapije odrediti ću metodom kvantitativne reverzne transkripcije s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR) te ću ju usporediti s polimorfizmom rs12979860 gena za IL-28B te genotipom virusa. Polimorfizam rs12979860 gena za IL-28B odrediti ću metodom reverzne transkripcije s lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR), dok ću genotip virusa hepatitisa C odrediti metodom reverzne hibridizacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Odjelu za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, od ožujka 2014. do lipnja 2014. U istraživanje je uključeno 89 osoba zaraženih HCV-om. Uzorci zaraženih osoba prikupljeni su u okviru rutinskih dijagnostičkih postupaka.

3.2. Biološki uzorci

Biološki uzorci uzimani su venepunkcijom u sterilnu epruvetu volumena 6 ml. Uzorci seruma su centrifugirani 10 minuta na 3500 rpm-a. Uzorci seruma i pune krvi pohranjeni su na – 20 °C do testiranja.

3.3. Reagensi i otopine

3.3.1. Reagensi i otopine za izolaciju ljudske DNA

QIAamp DNA Mini Kit:

- Pufer za lizu, sadrži gvanidin klorid (Buffer AL)
- Pufer za ispiranje, koncentrat u koji se dodaje apsolutni etanol (Buffer AW1)
- Pufer za ispiranje, koncentrat u koji se dodaje apsolutni etalnol, a sadrži natrijev azid (Buffer AW2)
- Pufer za ispiranje, sadrži 10 mM Tris-Cl i 0.5 mM EDTA, pH 9.0 (Buffer AE)
- Proteinaza K, proteaza koja cijepa peptidnu vezu proteina na karboksilnom kraju hidrofobnih, alifatskih i aromatskih aminokiselina
- Kolone za izolaciju DNA, sadrže membranu od silikagela; *QIAamp Spin Column*
- Kolekcijske epruvete; *QIAgen collection tubes*

3.3.2. Reagensi i otopine za PCR u stvarnom vremenu

- Redestilirana, deionizirana, autoklavirana voda
- Otopina magnezija Mg_2+ 25 Mm (Roche Diagnostic, Germany)
- Reakcijska smjesa; sadrži početnice i probe (pohrana na 4° C) (TIB Molbiol, Germany)
- Smjesa koja sadrži polimerazu i dNTP; Roche Master (Roche Diagnostic, Germany)
- Kontrole (C homozigot, CT heterozigot, T homozigot); sadrže 10^5 ciljnih molekula u 5 μL otopine (TIB Molbiol, Germany)

3.3.3. Reagensi i otopine za kvantitativni RT-PCR

Abbott RealTime HCV Amplification Reagent Kit

- Puferska otopina s termostabilnom polimerazom rTth
- HCV oligonukleotidni reagens; sintetski oligonukleotidi (4 početnice i 2 probe) i dNTP-i u puferskoj otopini
- Aktivacijski reagens; 30 mM otopina manganovog (II) klorida
- Interna kontrola; negativna ljudska plazma koja nije reaktivna u testu antitijela HCV-a, HIV-1/2, HIV p24 antigena i HBs Antigena
- Vanjske kontrole: negativna, niskopozitivna i visokopozitivna
- Magnetske staklene čestice, pozitivno nabijene za vezanje nukleinskih kiselina pri izolaciji; HCV *Magnetic Glass Particles reagent Cassette*

3.3.4. Reagensi i otopine za određivanje genotipa

- Streptavidin-konjugirana alkalna fosfataza (CONJ 100x)
- Razrijeđeni konjugat u fosfatnom puferu (CONJ DIL)
- Denaturacijska otopina koja sadrži natrijev hidroksid (1.7 %) (DENAT SOLN)
- Hibridizacijska otopina za ispiranje koja sadrži natrijev klorid i natrijev citrat s detergentom (HYB/SW SOLN)
- Koncentrirana otopina za ispriranje koja sadrži fosfatni pufer s 0.5 % 2-kloracetilamidom, NaCl i detergent (RINSE SOLN 5X)
- Pufer natrijevog fosfata s 0.01 % SDS-a (Stringent Wash Otopina)
- Supstratni pufer koji sadrži TRIS pufer s 0.1 % 2-kloracetilamidom, $MgCl_2$ i NaCl (SUBS BUF)
- Nitrocelulozne trakice s oligonukleotidnim probama (Innogenetics)
- Destilirana, deionizirana voda

3.4. Oprema, računalni programi i potrošni materijal

- miješalica za epruvete Vortex Vibromix (Tehtnica, Slovenija)
- epruvete za uzimanje krvi (Becton Dickinson, USA)
- automatske pipete (Thermo, Eppendorf)
- nastavci za automatske pipete (Eppendorf)
- ultracentrifuga K3K0 (Sigma)
- Pasteur-pipete (Eppendorf)
- aparat za inkubaciju uzoraka; *Termomixer comfort* (Eppendorf)
- termociklički amplifikator za PCR u stvarnom vremenu; *LightCycler 2.0 Instrument* (Roche, Germany)
- staklene kapilare za PCR u stvarnom vremenu; *LightCycler Capillaries* (20µl); (Roche, Gemany)

- Vodena kupelj; *Ika Ter 2 Temperierbad*
- Platforma za miješanje; *Mini Rocking Platform* (Biometra)
- Termociklički amplifikator za PCR u stvarnom vremenu; *Abbott m2000rt* uređaj (Abbott, USA)
- Reakcijska pločica s 96 jažica za PCR u stvarnom vremenu; 96-*well optical Reaction Plate* (Abbott, USA)

3.5. Metode

3.5.1. Izolacija ljudske DNA

Za izolaciju DNA korišten je komercijalno dostupan komplet za izolaciju iz krvi i tjelesnih tekućina QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka). U 20 µl proteaze QIAGEN dodano je 200 µl uzorka te 200 µl pufera za lizu stanica (Buffer AL). Potrebno je vorteksirati 15 sekundi kako bi se osigurala učinkovita razgradnja, odnosno kako bi se pufer i uzorak temeljito izmiješali te kako bi se dobila homogena otopina. Otopina je inkubirana 10 minuta na 56 °C. Nakon inkubacije u uzorak je dodano 200 µl etanola (98 %) te je uzorak ponovno vorteksiran 15 sekundi. Ukupni volumen od 620 µl prebačen je u kolonu QIAmp Mini spin s membranom od silikagela koja veže negativnu DNA. Uzorak je centrifugiran 1 minutu na 8000 rpm-a. Zatim je dodano 500 µl pufera za ispiranje AW1 u kolonu te je ponovo postavljeno na centrifugiranje (8000 rpm-a). Kao sljedeći korak dodan je pufer za ispiranje AW2 te je uzorak postavljen na centrifugiranje na 14 500 rpm-a u 3 minute. Nakon svakog centrifugiranja kolona je prebačena u novu kolekcijsku tubicu. Zatim slijedi centrifugiranje bez dodavanja ičega 1 minutu na 14 500 rpm-a kako bi se s kolone odstranili svi ostatci pufera za ispiranje koji sadrži etanol te na taj način može inhibirati djelovanje polimeraze i onemogućiti kasniju PCR metodu. Kolona je prebačena u epruvetu Eppendorf te je dodano 200 µl pufera za eluciju DNA AE koji služi za otpuštanje DNA s kolone. Nakon jednominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorak je centrifugiran 1 minutu na 8000 rpm-a. Dobiveni izolat se pohranjuje na – 20 °C.

3.5.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Detekcija polimorfizma rs12979860 gena za IL-28B postignuta je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*) te analizom krivulje temperature taljenja (engl. *the melting temperature*, Tm) na uređaju LightCycler. Korišten je specifični PCR u stvarnom vremenu gdje se detekcija produkta vrši pomoću specifičnih proba na koje su vezani fluorokromi. Za detekciju polimorfizma rs12979860 gena za IL-28B korištene su „*Simple Probe*" koje jače fluoresciraju vezane na komplementarnu DNA nego samostalno u otopini. Povećanjem temperature prema temperaturi taljenja probe se odvajaju od komplementarnog lanca te se fluorescencija smanjuje.

Za pripremu reakcijske smjese koristen je *Roche MasterMix* komplet. Volumen od ukupno 15 µl je dovoljan za detekciju jednog uzorka, a volumeni pojedinih sastojaka su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz sastojaka reakcijske smjese za jedan uzorak (15 µL) potrebne za detekciju polimorfizma gena za IL-28B metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

SASTOJCI REAKCIJSKE SMJESE	**VOLUMEN SASTOJKA**
Redestilirana voda (PCR *grade* H_2O)	**9,4 µL**
Otopina Mg^{2+} (25 mM)	**1,6 µL**
Početnice i probe (Reakcijska smjesa, TIB MolBiol)	**2,0 µL**
Smjesa polimeraze, dNTP (*Roche Master*)	**2,0 µL**
UKUPNO	**15 µL**

Za detekciju polimorfizma jednog nukleotida korišteni su uzorci izolirane ljudske DNA te tri vrste kontrola (C homozigot, T homozigot i heterozigot). Koncentracija izolirane ljudske DNA iznosi 2 – 5 ng/μL (detekcija testa iznosi >1 ng/μL genomske DNA). Reakcijska smjesa se priprema za najmanje četiri uzorka, ali se volumen potreban za reakciju uvijek množi s brojem za jedan većim od ukupnog broja uzoraka. U metalni blok se umetnu staklene kapilare, po jedna za svaki uzorak i kontrole. Za PCR koriste se posebno dizajnirane staklene kapilare koje omogućuju korištenje vrlo malog volumena reakcijske smjese. Zbog velikog omjera površine prema volumenu kapilare, one omogućuju vrlo brze promjene temperature, a time i brze cikluse umnažanja. Kapilare se slažu isključivo dotičući gornji prošireni dio. U svaku kapilaru dodano je 15 μL reakcijske smjese i 5 μL izolirane ljudske DNA odnosno pripremljene kontrole. Kapilare se oprezno protresu kako bi se tekućina spustila u uži dio kapilare te se zatim umetnu u „karusel“ koji se postavlja u uređaj LightCycler. LightCycler je brzi PCR uređaj u kombinaciji s mikrovolumnim fluorimetrom. Na uređaju LightCycler potrebno je optimizirati uvjete PCR-a. Uvjeti PCR-a prikazani su u tablici 3. Umnoženi PCR produkti detektirani su mjerenjem fluorescencije koja nastaje uporabom specifičnih hibridizacijskih proba. Dobivene vrijednosti temperature taljenja prikazane su grafički u obliku krivulje taljenja pri čemu C homozigot ima vršnu vrijednost pri otprilike 59 °C, heterozigot ima dvije vršne vrijednosti pri otprilike 51 °C i 59 °C dok T homozigot jednu vršnu vrijednost pri otprilike 51 °C.

Tablica 3. Uvjeti odvijanja PCR-a na uređaju LightCycler

Progr. korak	**Denaturacija**	**Ciklusi**			**Otapanje**			**Hlađenje**
Analiza:		Umnažanje			Krivulja topivosti			
Ciklusi:	1	45			1			1
Temperatura [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Trajanje [mm:ss]	10:00	00:05	00:10	00:15	00:20	00:20	00:00	00:30

3.5.3. Kvantitativni RT-PCR

Broj kopija RNA virusa hepatitsa C u plazmi određen je kvantitativnim RT-PCR testom *The Abbott RealTime* HCV (USA) prema uputama proizvođača. Test ima automatsku izolaciju uzoraka na *Abbott m2000rt* uređaju. Svrha izolacije uzoraka je izdvojiti ciljne molekule RNA za umnažanje te ukloniti potencijalne inhibitore umnažanja iz uzoraka. Ciljna sekvenca za ovaj test je visoko konzervirana regija 5'*utr* genoma HCV-a. Ciljna sekvenca interne kontrole dobivena je iz gena hidroksipiruvat reduktaze bundeve (*Cucurbita pepo*). Termociklički amplifikator za PCR u stvarnom vremenu (*Abbott m2000sp*) je automatizirani sustav koji koristi magnetske mikročestice na koje se veže HCV RNA. Nukleinske kiseline se zatim eluiraju s magnetskih čestica. Eluati se prenose na ploču s 96 jažica (engl. 96 Deep-Well Plate). Interna kontrola uzima se kroz cijeli postupak pripreme uzorka zajedno s kalibratorima, kontrolama i uzorcima. Kao vanjske kontrole u reakciji umnažanja koriste se negativna kontrola, nisko pozitivna te visoko pozitivna kontrola. Reakcije reverzne transkripcije i PCR umnažanja koriste termostabilnu rekombinantnu rTth DNA polimerazu. U prisustvu mangana i određenim puferskim uvjetima DNA polimeraza ima aktivnost reverzne polimeraze i polimeraznu aktivnost. Nakon reverzne transkripcije slijedi umnažanje gdje se kao produkt stvara amplikon, a u narednim ciklusima broja amplikona se povećava. Uz kontrole i HCV-kvantitativni standard, softver navedenog uređaja prema kalibracijskoj krivulji odredi visinu virusnog titra. Broj kopija HCV RNA izražen je u IU/ml sukladno međunarodnom standardu (NIBSC Code 96/798). Test određuje koncentraciju HCV RNA u rasponu od 12 - 100 000 000 kopija/mL.

3.5.4. Određivanje genotipa metodom reverzne hibridizacije

Metoda se sastoji od četiri koraka: denaturacije uzoraka, hibridizacije uzoraka, ispiranja nitroceluloznih trakica te razvijanja obojenog taloga dodatkom supstrata. U svaku kadicu se dodaje 10 µL denaturacijske otopine (DENAT SOLN) te 10 µL uzorka odnosno kontrole čime je omogućen proces denaturacije. Proces denaturacije odvija se na sobnoj temperaturi u trajanju od oko 5 minuta. Proces hibridizacije počinje dodavanjem 5 mL prethodno zagrijane hibridizacijske otopine za ispiranje (HYB/SW SOLN) u kadice te uranjanjem obilježenih nitroceluloznih trakica, koje se sterilnom pincetom prenesu u kadice. Nitrocelulozne trakice koje se koriste u ovom setu sastoje se od 3 linije koje označavaju kontrolu te 22 paralelne linije na kojima se nalaze DNA probe koje sadržavaju sekvence specifične za HCV

genotipove. Kadice se premjeste u vodenu kupelj na inkubiranje 60 minuta na 50 °C uz brzinu miješanja od 80 RPM-a. Po završetku inkubacije dodaje se 2 mL hibridizacijske otopine za ispiranje (HYB/SW SOLN) kako bi se omogućilo ispiranje trakica. Postupak ispiranja se ponavlja dva puta. Postupak inkubacije se ponavlja, ali u trajanju od 30 minuta. Nakon hibridizacije i ispiranja streptavidin-konjugirana alkalna fosfataza se dodaje i veže za biotinizirane hibride koji su se prethodno formirali. Ispiranjem u 2ml pufera natrijevog fosfata (STRINGENT WASH) u vodenoj kupelji uklone se svi nespecifično vezani amplifikati, a za dodatno ispiranje koristi se otopina za ispiranje s fosfatnim puferom (RINSE SOLN). Na biotin amplifikata veže se streptavidin konjugiran s alkalnom fosfatazom inkubacijom na platformi za miješanje 30 minuta nakon čega se ponovno ispire otopinom za ispiranje s fosfatnim puferom (RINSE SOLN). Sljedećom inkubacijom od 30 minuta na platformi za miješanje dodan je supstrat pomiješan sa supstrat puferom te je došlo do reakcije alkalne fosfataze sa supstratom. Na taj način su mjesta vezanja amplifikata na probe na trakicama postala vidljiva. Trakice se isperu nekoliko puta destiliranom vodom te se time zaustavi reakcija. Inkubacija s BCIP/NBT kromogenom daje ljubičasti talog i rezultati se vizualno interpretiraju. Pozitivne linije na trakici očitane su pomoću kartice INNO LIPA.

3.6. Statističke metode

Za statističku obradu podataka korišteni su programi Microsoft Excell (Microsoft) i Statistica (Microsoft). Korišten je statistički test Kruskal-Wallis ANOVA.

4. REZULTATI

4.1. Podaci o ispitanicima

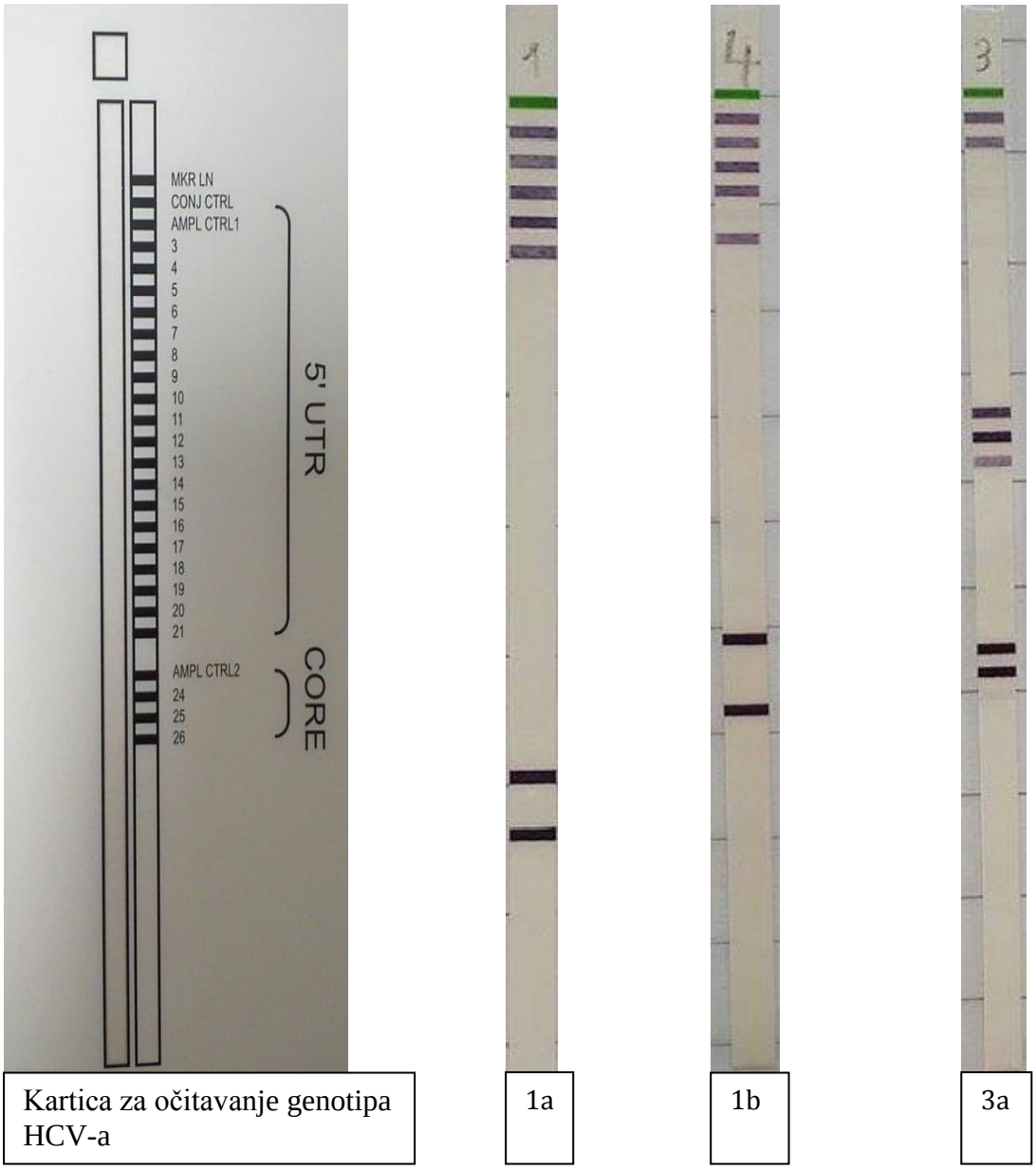
Istraživanje je obuhvatilo 89 osoba zaraženih virusom hepatitisa C. Od ukupnog broja ispitanika bilo je 28 ženskih i 61 muški ispitanik.

4.2. Analiza genotipova virusa HCV-a

Metodom reverzne hibridizacije određen je genotip virusa hepatitisa C (Slika 8). Hibridizacija je obuhvaćala postupak denaturacije dvolančane DNA u jednolančanu i detekciju jednolančane DNA s obilježenim, komplementarnim probama DNA. Najzastupljeniji genotip u ovom istraživanju bio je genotip 1 (79,8 %). Rezultati zastupljenosti pojedinih genotipova prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Genotipizacija HCV-a metodom reverzne hibridizacije

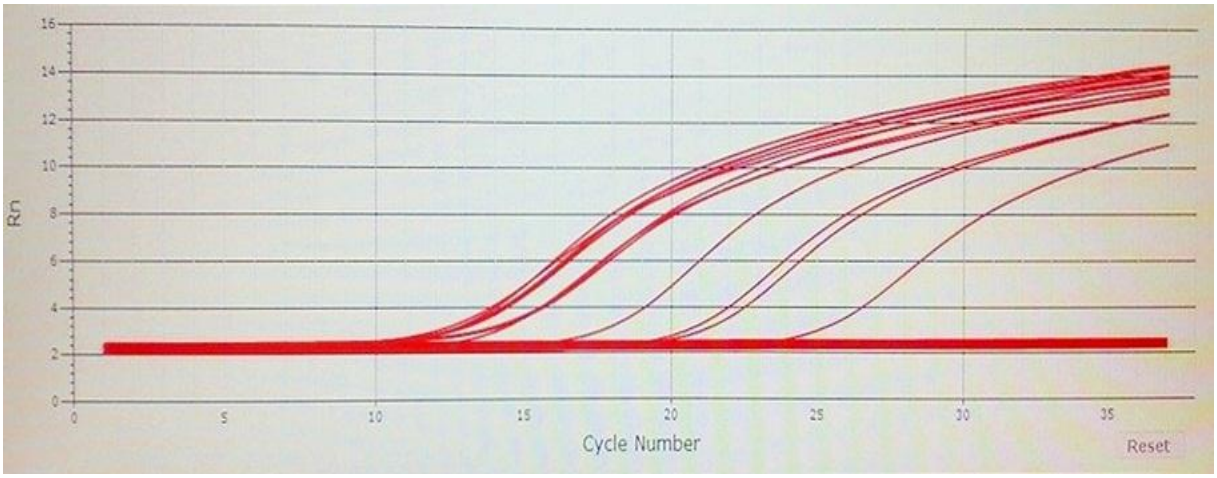
Genotip HCV-a		**Broj ispitanika**	**%**
Genotip 1		**71**	**79,8**
	1	10	14,1
	1a	33	46,5
	1b	28	39,4
Genotip 2		1	**1,1**
Genotip 3		15	**16,9**
	3a	15	16,9
Genotip 4		2	**2,2**
Ukupno		**89**	**100**



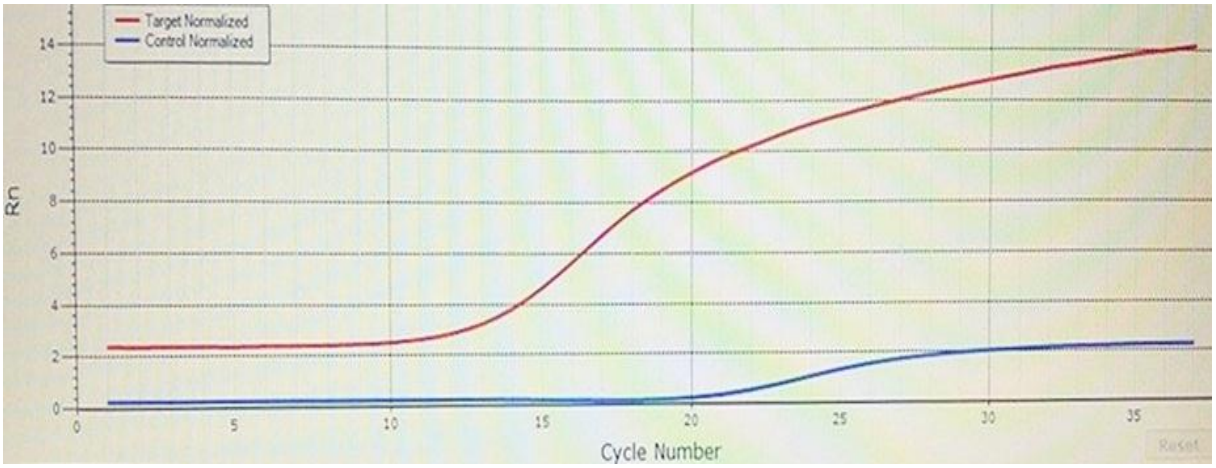
Slika 8. Prikaz pozitivnih linija na nitroceluloznim trakicama za ispitanike s genotipom 1a, 1b i 3a očitanih pomoću INNO LIPA kartice. Nitrocelulozne trakice sastoje se od 3 linije koje označavaju kontrolu te pozitivnih linija koje označavaju DNA probe koje sadržavaju sekvencu specifičnu za HCV genotipove. Ispitanik s genotipom 1a ima pozitivne linije na mjestima 3, 4, 5 i 25, ispitanik s genotipom 1b na mjestima 3, 4, 6, 23 i 26 te ispitanik s genotipom 3a na 13, 14 i 15.

4.3. Rezultati viremije

Broj kopija HCV RNA u plazmi određen je kvantitativnim RT-PCR testom. Uz kontrole i HCV kvantitativni standard, softverom uređaja (The Abbott m2000rt) prema kalibracijskoj krivulji određena je visina virusnog titra. (Slika 9). Broj kopija HCV RNA izražen je u IU/ml (Slika 10).



Slika 9. Amplifikacijska krivulja za ciljne fragmente u kvantitativnom RT-PCR testu pri čemu je vidljiv porast fluorescencije kroz vrijeme. Na osi x prikazan je broj ciklusa, a na osi y je Rn vrijednost (fluorescencija reporter boje podijeljena s fluorescencijom referentne fluorescentne boje).



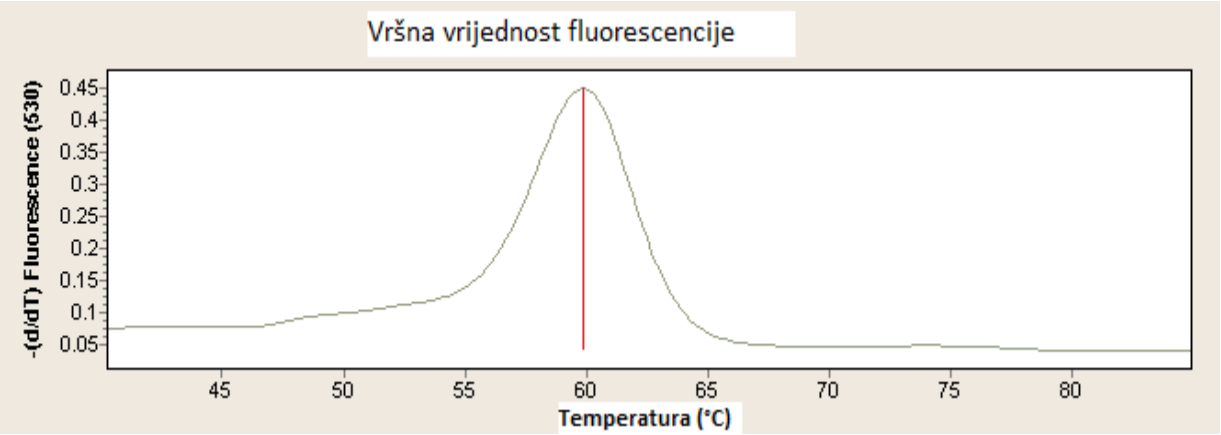
Slika 10. Amplifikacijske krivulje ciljnog fragmenta (crvena krivulja) te interne kontrole (plava krivulja) u kvantitativnom RT-PCR testu za ispitanika s visinom virusnog titra od 2 052 825 IU/ml

4.4. Analiza polimorfizma jednog nukleotida za IL-28B

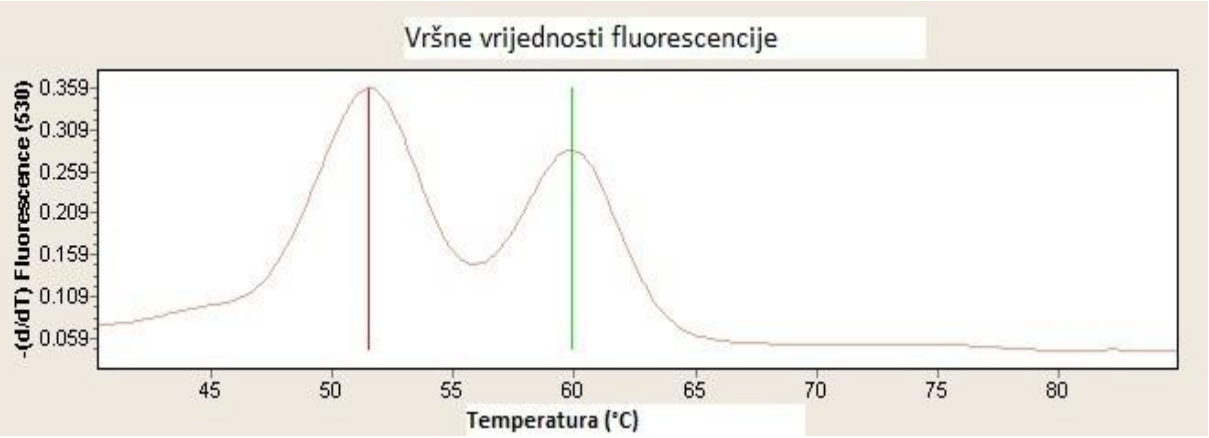
Metodom PCR-a u stvarnom vremenu detektiran je polimorfizam rs12979860 gena za IL-28B te su dobivene vrijednosti temperature taljenja (Tm) prikazane su grafički u obliku krivulje taljenja.

Ispitanici kojima je Tm pri otprilike 59 °C su C homozigoti (Slika 11.), heterozigoti imaju Tm pri otprilike 51 °C i 59 °C (Slika 12.), a T homozigoti imaju Tm pri otprilike 51 °C (Slika 13.).

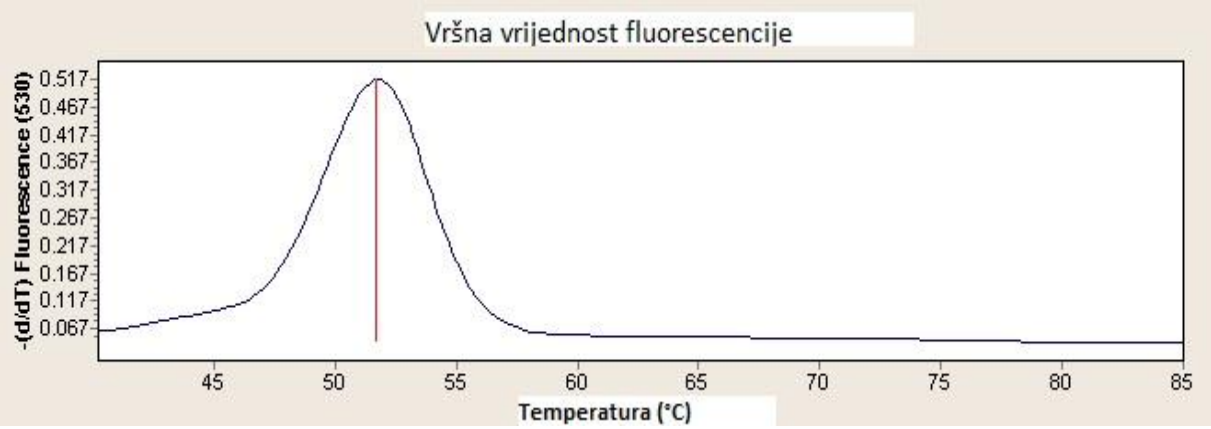
Od ukupno 89 ispitanika u istraživanju 26 je C homozigota (29,2 %), 54 ispitanika su heterozigoti (60,7 %), a T homozigota je 9 (10,1 %) (Tablica 5).



Slika 11. Grafički prikaz krivulje temperature taljenja (Tm) s vršnom vrijednošću fluorescencije pri 59,86 °C za ispitanika koji je C homozigot pri analizi polimorfizma jednog nukleotida za IL-28B



Slika 12. Grafički prikaz krivulje temperature taljenja (Tm) s dvije vršne vrijednosti fluorescencije pri 51,50 °C te 59,89 °C za ispitanika koji je CT heterozigot pri analizi polimorfizma jednog nukleotida za IL-28B



Slika 13. Grafički prikaz krivulje temperature taljenja (Tm) s vršnom vrijednošću fluoroscencije pri 51,68 °C za ispitanika koji je T homozigot pri analizi polimorfizma jednog nukleotida za IL-28B

Tablica 5. Analiza polimorfizma rs12979860 gena za IL-28B

	C homozigoti	**Heterozigoti**	**T homozigoti**
Broj ispitanika	26	54	9
Ukupni postotak	29,2%	60,7%	10,1%

4.5. Statistička analiza učestalosti viremije i polimorfizma IL-28B

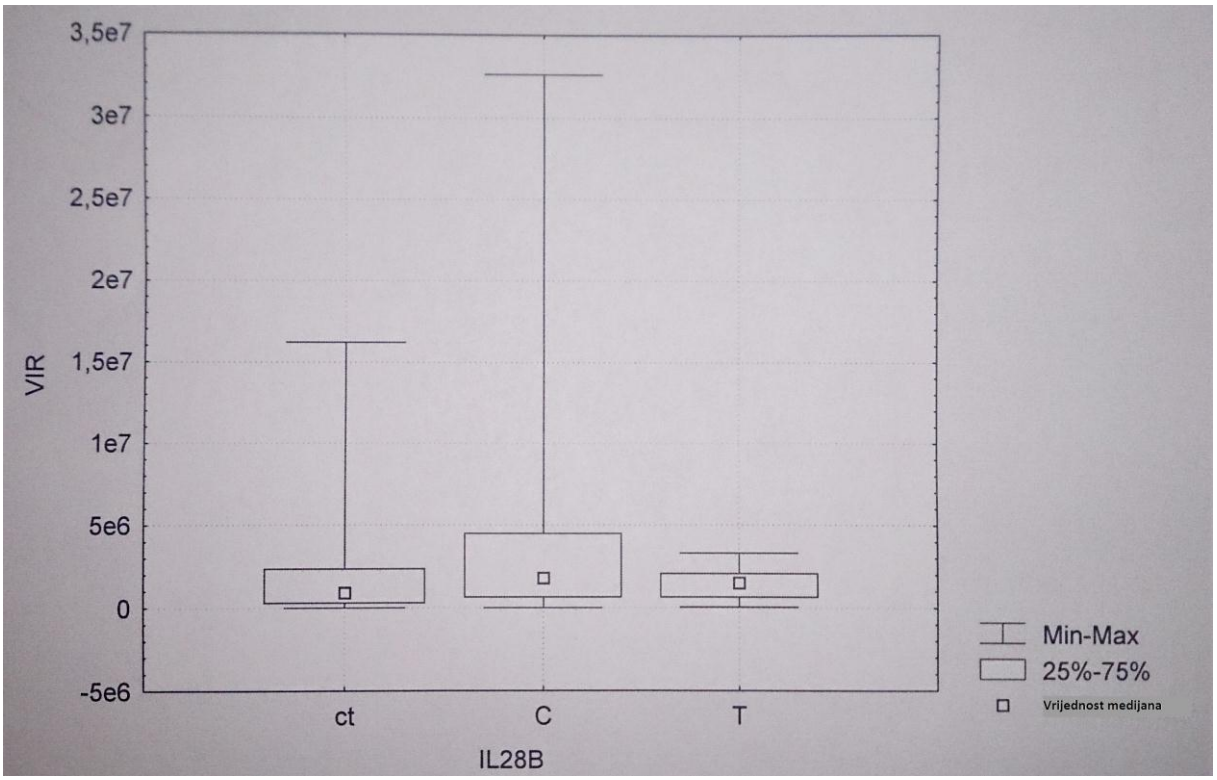
Kruskal-Wallis testom uspoređene su vrijednosti inicijalne viremije u osoba zaraženih virusom hepatitisa C sa C homozigotom, CT heterozigotom i T homozigotom. Test nije pokazao statistički značajne razlike među navedenim grupama ($p = 0,3478$)

Na slici 14. prikazana je učestalost genotipova (C homozigot, CT heterozigot i T homozigot) u odnosu na viremiju kod osoba zaraženih virusom hepatitisa C.

Medijan (± standardna devijacija) broja kopija HCV RNA u plazmi za CT heterozigote iznosi 2 277 000 IU /ml HCV RNA plazme, 1 329 000 IU /ml HCV RNA plazme za C homozigote te 399 000 IU /ml HCV RNA plazme za T homozigote (tablica 6).

Tablica 6. Usporedni Kruskal Wallis test viremije s polimorfizmom IL 28B

	Nezavisna varijabla: IL 28B	
Zavisna varijabla: Inicijalna viremija	**Broj ispitanika N**	**Medijan broja kopija HCV RNA**
CT	**56**	**2277 000**
C	**26**	**1329 000**
T	**9**	**399 000**



Slika 14. Učestalost C homozigota, CT heterozigota i T homozigota u odnosu na opseg viremije kod osoba zaraženih virusom hepatitisa C. Na osi x prikazani su C homozigoti, CT heterozigoti i T homozigoti dok su na osi y prikazane vrijednosti viremije izražene u heksadecimalnom zapisu.

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje analizira povezanost genotipa HCV-a, polimorfizma rs12979860 gena za IL-28B i viremije u serumu osoba s kroničnim hepatitisom C. Od ukupno 89 ispitanika u istraživanju 26 je C homozigota (29,2 %), 54 ispitanika su heterozigoti (60,7 %), a T homozigota je 9 (10,1 %). Usporedbom triju grupa utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika među grupama u odnosu na inicijalnu viremiju kod kronične infekcije virusom hepatitisa C. Međutim, četiri neovisna cjelogenomska asocijacijska istraživanja (GWAS) pokazala su značajnu povezanost između prisutnosti SNP-a rs12979860 i rs809917 koji se nalaze u blizini gena za IL-28B i učestalosti spontane eliminacije virusa te ishoda liječenja kroničnog HCV-a s pegiliranim interferonom alfa i ribavirinom. U osoba koje su spontano eliminirale HCV, učestalost C genotipa SNP-a rs12979860 u blizini gena za IL-28B bila je dvostruko veća u usporedbi s osobama u kojih je uspostavljena kronična infekcija. Thomas i suradnici su 2009. godine proveli istraživanje u kojem su pokazali da kod C homozigota dolazi do češćeg spontanog izliječenja u odnosu na osobe koje su heterozigoti ili T homozigoti. Analizom frekvencije genotipova utvrđeno je da osobe s C genotipom imaju 3 puta veću vjerojatnost izliječenja u odnosu na osobe s genotipom te T genotipom.

Interferoni su ključni citokini koji sudjeluju u antivirusnom odgovoru. Sintetiziraju se se tijekom virusne infekcije i iskazuju snažan indirektan antivirusni učinak (Kotenko, 2011). Polimorfizam jednog nukleotida rs12979860 u promotoru genu za IL-28B povećava ekspresiju interferona λ te je jedan od čimbenika koji odlučuju o tijeku zaraze virusom hepatitisa C.

Genotip IL-28 (posebice C genotip SNP-a rs12979860) je važan prediktor postizanja trajnog virološkog odgovora tijekom dvojne i trojne terapije kroničnog hepatitisa C te važan prediktor virusne kinetike u bolesnika liječenih individualnim pristupom liječenja (Vince i sur., 2013). Thompson i suradnici su 2010. proveli istraživanje pri kojem su utvrdili veću učestalost postizanja trajnog virološkog odgovora u bolesnika s kroničnim hepatitisom C zaraženih genotipom 1 s obzirom na detekciju C ili T alela na poziciji SNP rs12979860. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je trajni virološki odgovor dokazan u 69 % bolesnika koji su bili C homozigoti za SNP rs12979860. Postotak trajnog virološkog odgovora u heterozigota i T homozigota za SNP rs12979860 bili su značajno manji (33 % i 27 %) u usporedbi s C homozigotima. U bolesnika bijele rase, SVR je postignut u 69 % C homozigota, 33 %

heterozigota i 27 % T homozigota za SNP rs12979860. U bolesnika crne rase, SVR je postignut u 48 % C homozigota, 15 % heterozigota i 13 % T homozigota za SNP rs12979860. Ovim istraživanjem je pokazano da su značajno niži postotci trajnog virološkog odgovora kod pripadnika crne rase, u odnosu na bijelu rasu, no to se povezuje sa značajno nižom učestalosti polimorfizma rs12979860 C homozigota u osoba crne rase (Poljak i sur., 2013).

Utjecaj polimorfizma za SNP rs12979860 u manjoj je mjeri izražen kod oboljelih s genotipom 2 i 3. Međutim, IL-28 može imati ulogu u nekih pacijenata, posebice onih koji ne pokazuju brzi virološki odgovor. Nekoliko istraživanja, uključujući i početno GWAS istraživanje nisu pokazali nikakvu jasnu povezanost između IL-28 i trajnog virološkog odgovora kod osoba s genotipom 2 ili 3. Nasuprot tome, Mangia i suradnici su 2012. proveli istraživanje kojim su pokazali povezanost između heterozigota i trajnog virološkog odgovora u skupinama s genotipom 2 ili 3. Razlike između pojedinih skupina genotipova bile su upravo kod osoba koje nisu pokazale brzi virološki odgovor.

Frekvencije pojedinih genotipa za rs12979860 razlikuju se među različitim etničkim skupinama. Melis i suradnici su 2011. proveli istraživanje frekvencije genotipa za T homozigote i heterozigote uključujući četiri etničke grupe: bijelce, azijate, populaciju Bliskog istoka, Latinoamerikance te Afroamerikance. Heterozigota najviše je među populacijom azijata (89 %), T homozigota među Afroamerikancima (57 %).

Istraživanjima se također pokušala utvrditi povezanost polimorfizma gena za IL-28 i s drugim virusima osim HCV-a. Maureen i suradnici su 2010. godine istraživali povezanost progresije bolesti i IL-28 genotipa kod infekcije HIV-om i HBV-om. Genotipizirali su 226 osoba s kroničnim hepatitisom B te 384 osobe koje su kronično zaražene HBV-om no nemaju simptome bolesti jetre. Nije bila zabilježena značajna razlika između navedenih skupina bolesnika (21,5 % vs. 16,9 %). Istraživanje je također pokazalo da nema povezanosti između progresije bolesti i IL-28 genotipa u HIV zaraženih osoba. Utjecaj polimorfizma na ekspresiju HIV infekcije nije još uvijek dovoljno razjašnjen.

Vince i suradnici 2006. objavili su rezultate desetogodišnjeg retrospektivnog istraživanja rasprostranjenosti genotipa virusa hepatitisa C u Hrvatskoj. Većina pacijenata uključenih u istraživanje bili su zaraženi genotipovima 1 (58,8 % pacijenata) i 3 (35,6 %). 37,4 % pacijenata bilo je zaraženo subtipovima 1b dok je infekcija subtipom 1a dokazana u 13,1 % bolesnika. Broj pacijenata s genotipovima 2 i 4 (2,2 % i 3,4 %) bili su vrlo mali. U istraživanoj skupini pacijenata nisu dokazani genotipovi 5 i 6 HCV-a. Nasuprot tome, u

istraživanju provedenom u ovom diplomskom radu zabilježena je još viša zastupljenost genotipa 1 (79,8 % pacijenata) pri čemu je 46,5 % pacijenata bilo zaraženo subtipom 1a, 39,4% subtipom 1b te 14,1 % subtipom 1 (zbog nemogućnosti utvrđivanja subtipa). 16,9 % pacijenata bilo je zaraženo genotipom 3, dok je vrlo mali broj pacijenata bio zaražen genotipovima 2 i 4 (1,1 % i 2,2 %).

Kao rizični čimbenici koji utječu na tijek infekcije virusom hepatitisa C navode se starija dob pri stjecanju infekcije (više od 40 godina), muški spol, prekomjerno konzumiranje alkohola i koinfekcija virusom HIV-a ili HBV-a. Usprkos činjenici da kronični hepatitis C u dijela bolesnika tijekom progresije bolesti dovodi do ciroze jetre i hepatocelularnog karcinoma, u većine bolesnika progresija bolesti je dugotrajna te je u konačnici prognoza u većine bolesnika dobra (Chen, Morgan, 2006).

6. ZAKLJUČCI

1. Analiza polimorfizma gena za IL-28B u osoba s kroničnim hepatitisom C pokazala je da su u ispitivanoj populaciji najčešći CT heterozigoti (60,7 %), zatim slijede C homozigoti te T homozigoti.

2. U ovom istraživanju nisu dokazane statistički značajne razlike među grupama ispitanika s različitim genotipovima IL-28B u odnosu na opseg viremije u trenutku dijagnoze kronične infekcije HCV-om.

3. Genotip 1 HCV-a (79,8 %) je bio najzastupljeniji u osoba s kroničnim hepatitisom C, genotip 3 HCV-a dokazan je u 16,9 % ispitanika dok su genotpovi HCV-a 2 i 4 bili dokazani u vrlo malom broju ispitanika. Genotipovi 5,6 i 7 HCV-a nisu detektirani u ispitanika analiziranih u ovom istraživanju.

7. LITERATURA

Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T (2012.) **In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle.** *Microbiology and Immunology 56: 1348-421*

Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinivić-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D (2010.) **Imunologija.** *Medicinska naklada, Zagreb*

Basu A, Beyene A, Meyer K, Ray R (2004.) **The hypervariable region 1 of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus binds to glycosaminoglycans, but this binding does not lead to infection in a pseudotype system.** *Journal of Virology 78(9): 4478-86*

Bennett JE , Dolin R , Blaser MJ (2015.) **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.** *Churchill Livingstone Philadelphia, Poglavlje 156: Organisation of HCV genome", str. 636–40*

Billerbeck E, Bottler T, Thimme R (2007.) **Regulatory T cells in viral hepatitis.** *World Journal of Gastroenterology 13: 4858-64*

Brown RS (2005.) **Hepatitis C and liver transplantation.** *Nature 36: 73-8*

Chen SL, Morgan TR (2006.) **The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection.** *International Journal of Medical Sciences 3(2): 47-52*

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

Clarke A, Kulasegaram R (2006.) **Hepatitis C transmission -- where are we now?** *International Journal of Medical Sciences 17(2): 74-80*

Flint M, Thomas JM, Maidens CM, Shotton C, Levy S, Barclay WS, McKeating JA (1999.) **Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein.** *Journal of Virology 73(8): 6782-90*

Ge D, Fellay J, Thompson AJ i sur. (2009.) **Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance** *Nature 461: 399-401*

Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB (2009.) **Guidelines. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C.** *Hepatology 46: 1335–74*

Grahovac B, Hadžisejdić I (2006.) **Molecular diagnosis of hepatitis C infection.** *Medicina 42: 132-37*

Hoofnagle JH (2002.) **Course and outcome of hepatitis C.** *Hepatology 36: 21-9*

Hoofnagle JH (1997.) **Hepatitis C: the clinical spectrum of disease.** *Hepatology 26: 15-20*

Indolfi G, Resti M (2009.) **Perinatal transmission of hepatitis C virus infection.** *Journal of Virology 81(5): 836-43*

Kengkate M, Butthep P, Kupatawintu P, Srisuddee A, Chantratita W, Nathalang O. (2014.) **Comparison of a Simple-Probe Real-Time PCR and Multiplex PCR Techniques for HPA-1 to HPA-6 and HPA-15 Genotyping.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis 29: 94-9*

Kondo Y, Shimosegawa T (2013.) **Direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells.** *World Journal of Gastroenterology 19(44): 7889–95*

Kotenko SV (2011.) **IFN-λs.** *Current Opinion in Immunology 23(5): 583-90*

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV i sur. (2003.) **IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex** *Nature Immunology 4: 69-77*

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM (2007.) **Flaviviridae: the viruses and their replication.** *Fields Virology, Philadelphia*

Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T (2009.) **Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection.** *Journal of Virology 83(4): 2011-4*

Mangia A, Mottola L (2012.) **What's new in HCV genotype 2 treatment.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis 32: 135-40*

Manns M, von Hahn T (2013.) **Novel therapies for hepatitis C — one pill fits all?** *Nature Reviews Drug Discovery 12: 595–610*

Maureen P. Martin, Ying Q, James J. Goedert, Shehnaz K. Hussain, Gregory D. Kirk, W. Keith Hoots, Buchbinder S (2010.) **IL28B Polymorphism Does Not Determine Outcomes of Hepatitis B Virus or HIV Infection** *Oxford Journals 202(11): 1749-53*

McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B (2002.) **Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets.** *EMBO Journal 21(15): 3980-8*

Melis C, Fauron G, McMillin EB, Lindsey M, Patricia R (2011.) **Simultaneous Genotyping of rs12979860 and rs8099917 Variants Near the IL28B Locus Associated with HCV Clearance and Treatment Response** *Journal of Molecular Diagnostics 13(4): 446–51*

Moradpour D, Penin F (2013.) **Hepatitis C virus proteins: from structure to function.** *Microbiology and Immunology 369: 113-42*

Murphy DG, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E (2007.) **A new genotype of Hepatitis C Virus originating from Central Africa.** *Hepatology 46(4): 53-72*

Naggie S (2012.) **Management of hepatitis C virus infection: the basics.** *Topics in Antiviral Medicine 20(5): 154-61*

Op De Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J (2001.) **Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins.** *Journal of Virology 82(11): 2589-95*

Ozaras R, Tahan V (2009.) **Acute hepatitis C: prevention and treatment.** *Journal of Virology 7(3): 351-61*

Pawlotsky JM (2014.) **New hepatitis C virus (HCV) drugs and the hope for a cure: concepts in anti-HCV drug development.** *Journal of Virology 34(1): 22-8*

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM (2004.) **Structural biology of hepatitis C virus.** *Hepatology 39: 5-19*

Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004.) **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.** *Immunology Review 202: 8-32*

Poccia F, Agrati C (2003.) **Intrahepatic natural immunity and HCV immunopathogenesis**. *Cell Death Differentation 10(1): 9-12*

Poljak M, Židovec Lepej S, Đaković Rode O (2013.) **Novosti u serološkoj i molekularnoj dijagnostici hepatitisa B i C.** *Acta Medica Croatica 67: 281-90*

Rauch A, Kutalik Z, Descombes P i sur. (2010.) **Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study** *Gastroenterology 138: 1338-45*

Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, Hu K, Grove J, Lalor PF, Adams DH, Balfe P, Hübscher SG, McKeating JA (2008.) **Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue.** *Hepatology 47(2): 418-2*

Scott JD, Gretch DR (2007.) **Molecular Diagnostics of Hepatitis C Virus Infection.** *JAMA 297(7): 724-32*

Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM (2004.) **Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection.** *Hepatology 58: 391-424*

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. (2014.) **Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource.** *Hepatology 59(1): 318-27*

Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G i sur. (2009.) **IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy** *Nature Genetics 41: 1100-4*

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M i sur. (2009.) **Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C** *Nature Genetics 41: 1105-9*

Thomas DL, Ray SC, Lemon SM (2005.) **Hepatitis C. Principles and practice of infectious diseases.** *Elsevier: Churcill Livingstone, Philadelphia*

Thomas D, Thio C, Martin M, Ying Q, Ge D. O'hUigin C i sur. (2009.). **Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus** *Hepatology 461(7265): 798–801*

Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS i sur. (2010.) **Interleukin-29B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus.** *Gastroenterology 139: 120-9*

Verucchi G, Calza L, Manfredi R, Chiodo F (2004.) **Human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfection: epidemiology, natural history, therapeutic options and clinical management.** *Infection 32(1): 33-46*

Vilcek J (2003.) **Novel interferons** *Nature Immunology* 1: 8–9

Vince A. (2005.) **Hepatitis B i C: prirodni tijek bolesti.** *Acta Medica Croatica 59: 389-92*

Vince A, Iscic-Bes J, Zidovec Lepej S, Baca-Vrakela I, Bradaric N, Kurelac I, Vince DB (2006.) **Distribution of hepatitis C genotypes in Croatia- a 10 year retrospective study of four geographic regions.** *International journal Collegium Antropologicum 30: 139–43*

Vince A, Zidovec Lepej S, Kurelac I, Cajic V, Burek V, Dusek D, Budimir J (2009.) **Suvremena dijagnostika i liječenje hepatitisa C.** *Croatian Journal of Infection 29(2): 49–56*

Vince A, Hrstic I, Begovac J i sur. (2013.) **Virusni hepatitis.** *Acta Medica Croatica, 67: 263-72*

Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A (2007.) **Chemokines in hepatitis C virus infection: Pathogenesis, prognosis and therapeutics.** *Cytokine 39: 50-62*

Zhang Y, Zhang D, Chen J, Peng Y, Cao W (2003.) **A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe.** *Nuceic Acids 31: 123*

.

http://huhiv.hr/o-hepatitisu-opsirno/ (pristupljeno 16.01.2015.)

http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/ (pristupljeno 20.01.2015.)

http://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_C_virus (pristupljeno 08.04.2015.)

http://hepcbc.ca/wp-content/uploads/2012/08/GlobalDist_HCV_genotypes.jpg (pristupljeno 16.01.2015.)

http://www.nature.com/nrmicro/journal/v11/n7/fig_tab/nrmicro3046_F2.html (pristupljeno 16.01.2015.)

http://www.hepatitisc.uw.edu/doc/34-1/natural-history-following-initial-infection-hcv.jpg (pristupljeno 20.01.2015.)

http://www.nature.com/nrd/journal/v12/n8/images_article/nrd4050-f4.jpg (pristupljeno 25.03.2015.)

http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch19/PCR.html (pristupljeno 20.01.2015.)

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci: Ime i prezime: Mia Čerina
Rođena: 09. 07. 1990.
Adresa: Put kule 33, 21210 Solin
E-mail adresa: mia.bem@gmail.com

Obrazovanje:

2012.-2015. Prirodoslovno matematički fakultet, odsjek biologija, diplomski smjer Eksperimentalna biologija, modul Fiziologija i imunobiologija (Zagreb)

2009.-2012. Sveučilišni odjel za studije mora, smjer biologija i ekologija mora (Split) Diploma: univ. bacc. biol. et oecol.

2005.-2009. II. gimnazija (Split)

Profesionalno iskustvo:

- Erasmus stručna praksa u Odjelu za pulmologiju i infektivne bolesti, Charité - Universitätsmedizin Berlin (2015.)
- sudjelovanje na Croatian Student Summit-u na Medicinskom fakultetu u Zagrebu (CROSS, 2014.)
- izrada diplomskog rada u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"
- obavljanje prakse na Imunološkom zavodu (Zagreb, 2013.)
- sudjelovanje na studentskom terenu (Murter, 2011.)
- polaganje ronilačkog tečaja u sklopu studentskog terena (Brač, 2009.)

Stipendije: stipendija grada Solina za darovite studente (2010.-2013.)

Osobne vještine i kompetencije:

- napredno poznavanje engleskog jezika
- poznavanje talijanskog jezika
- vladanje Office paketom i drugim standardnim računalnim aplikacijama
- vozačka dozvola B kategorije