

# Mutacije virusa hepatitisa C u hipervarijabilnoj regiji 1 i razvoj kvazispecijesa u bolesnika s kroničnim hepatitisom C

---

Hrstić, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2008

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:439506>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Irena Hrstić**

**Mutacije virusa hepatitisa C u  
hipervarijabilnoj regiji 1 i razvoj  
kvazispecijesa u bolesnika s kroničnim  
hepatitisom C**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2008.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju Klinike za unutrašnje bolesti KBC Zagreb i u Zavodu za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Voditelj rada: prof. dr. Boris Vucelić, FACP, FRCG

Zahvaljujem se prvenstveno mojem mentoru prof. dr. Vucelić Borisu na beskonačnom strpljenju, osobito na konkretnim komentarima u pravim trenucima.

Beskrajno hvala prof. dr. Grahovac Blaženki što je uzorke analizirala u Zavodu za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Posebno joj hvala na intelektualnom doprinosu te neiscrpoj i poticajnoj energiji. Hvala i njezinim suradnicima, posebno Mohar Bojani.

Zahvalna sam i dr. Kolarić Branku na statističkoj obradi rezultata.

Hvala gospodi Perković Frani i Stazić Vladimiru, te tvrtki Roche d.o.o koji su financijski pripomogli izradu ove disertacije.

Na kraju, ali ne manje važno, hvala članovima Zavoda za gastroenterologiju KBC Zagreb, koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada, posebno dr. Radić Davoru na tehničkoj pomoći.

Hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci. Disertaciju posvećujem mami i tati.

# SADRŽAJ

Popis skraćenica

<b>1. <u>Uvod</u></b>	<b>1</b>
1.1. Prirodni tijek bolesti	2
1.2. Biološke karakteristike virusa hepatitisa C	4
1.3. Životni ciklus virusa hepatitisa C	6
1.4. Zemljopisna različitost virusa hepatitisa C	8
1.5. Kvazispecijesi virusa hepatitisa C	11
1.5.1. Konzervirane regije genoma	13
1.5.2. Varijabilne regije genoma	13
1.5.3. Funkcionalne posljedice kvazispecijesa virusa hepatitisa C	14
1.5.4. Dinamika kvazispecijesa virusa hepatitisa C	14
1.5.4.1. Kvazispecijesi tijekom samog čina zaraze	14
1.5.4.2. Kvazispecijesi pri akutnoj infekciji	15
1.5.4.3. Kvazispecijesi tijekom kronične infekcije	16
1.5.4.4. Kvazispecijesa tijekom antivirusnog liječenja	16
1.5.5. Metode određivanja kvazispecijesa virusa hepatitisa C	18
1.6. Prediktori terapijskog odgovora	20
<b>2. <u>Obrazloženje teme</u></b>	<b>22</b>
2.1. Očekivani znanstveni doprinos	24
<b>3. <u>Materijali i metode</u></b>	<b>26</b>
3.1. Ispitanici	26
3.2. Metode	28
3.2.1. Rutinska analiza seruma	28

3.2.2. Definicija virusa	29
3.2.3. Analiza kvazispecijesa	29
3.2.4. Patohistološka analiza	40
3.3. Statističke metode	41
<b>4. Rezultati</b>	<b>43</b>
4.1. Osnovne karakteristike ispitanika	44
4.2. Bazalni HCV kvazispecijesi	49
4.2.1. Parametri bazalnih kvazispecijesa	49
4.2.2. Usporedba parametara bazalnih kvazispecijesa i varijabli ispitanika	55
4.2.2.1. Kvazispecijesi i demografske varijable ispitanika	55
4.2.2.2. Kvazispecijesi i biokemijska aktivnost bolesti	56
4.2.2.3. Kvazispecijesi i virusne karakteristike	57
4.2.2.4. Kvazispecijesi i histološko oštećenje	59
4.2.3. Klinička primjena određivanja parametara kvazispecijesa u jednoj točki (bazalnom vremenu)	59
4.2.3.1. Kvazispecijesi i ETVR	59
4.2.3.2. Kvazispecijesi i SVR	61
4.3. Parni kvazispecijesi	63
4.3.1. Parametri parnih kvazispecijesa	63
4.3.2. Usporedba parametara kvazispecijesa bazalnog i parnog uzorka	67
4.3.3. Usporedba bazalnih parametara kvazispecijesa prema terapijskom odgovoru	70
4.4. Usporedba ostalih varijabli ispitanika u odnosu na ETVR i SVR	73

**5. Rasprava 75**

**6. Zaključci 89**

**7. Literatura 91**

**8. Dodatak**

Sažetak na hrvatskom jeziku

Sažetak na engleskom jeziku

Popis slika, grafikona i tablica

Životopis

## POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA

<b>A</b>	površina ( <i>engl. „Area“</i> )
<b>aa</b>	aminokiselina
<b>ALT</b>	alanin aminotransferaza
<b>Anti-HCV</b>	protutijela na HCV
<b>AST</b>	aspartat aminotransferaza
<b>C</b>	citozin
<b>cDNK</b>	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
<b>d.f.</b>	stupnjevi slobode
<b>DGGE</b>	gradijent denaturacije elektroforezom na gelu ( <i>engl. „Denaturing gradient gel electrophoresis“</i> )
<b>DHPLC</b>	denaturalizacija tekućom kromatografijom ( <i>engl. „Denaturing high-performance liquid chromatography“</i> )
<b>ETVR</b>	virološki odgovor na kraju liječenja ( <i>engl. „End of treatment viral response“</i> )
<b>F</b>	fibroza
<b>G</b>	gvanin
<b>H</b>	visina ( <i>engl. „High“</i> )
<b>H<sub>2</sub>O</b>	voda
<b>HAV</b>	virus hepatitisa A
<b>HBV</b>	virus hepatitisa B
<b>HCV RNK</b>	ribonukleinska kiselina hepatitisa C virusa
<b>HCV</b>	virus hepatitisa C
<b>HDMA</b>	analiza taljenja DNK visoke rezolucije ( <i>engl. „High-resolution DNA melting analysis“</i> )
<b>Huh7</b>	rekombinantne stanične kulture hepatocita
<b>HVR</b>	hipervarijabilna regija ( <i>engl. „Hypervariable region“</i> )
<b>HZJZ</b>	Hrvatski Zavod za javno zdravstvo
<b>IFN</b>	interferon
<b>IRES</b>	unutarnje mjesto ulaska u ribosom ( <i>engl. „Internal ribosome entry“</i> )
<b>IU/mL</b>	internacionalne jedinice po mililitru
<b>IVO</b>	intravenozna ovisnost
<b>KBC</b>	Klinički bolnički centar
<b>kg</b>	kilogram

<b>KHC</b>	kronični hepatitis C
<b>mcg</b>	mikrogram
<b>mg</b>	miligram
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	magnezijev klorid
<b>min</b>	minuta
<b>MU</b>	miliona jedinica
<b>nm</b>	nanometar
<b>NS</b>	nestrukturalni proteini
<b>NTR</b>	nekodirajuća regija ( <i>engl. „Nontranslated region“</i> )
<b>°C</b>	stupnjevi Celzijusa
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>ORF</b>	otvoreni okvir za čitanje ( <i>engl. „Open reading frame“</i> )
<b>p</b>	razina statističke značajnosti
<b>p.p.</b>	portalni prostor
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerazom ( <i>engl. „Polymerase chain reaction“</i> )
<b>PEG</b>	polietilen glikol
<b>RdRp</b>	RNK-ovisna RNK polimeraza ( <i>engl. „RNA-dependent RNA polymerase“</i> )
<b>Rib</b>	ribavirin
<b>RNK</b>	ribonukleinska kiselina
<b>rpm</b>	okretaja u minuti
<b>s</b>	sekunda
<b>s.c.</b>	subkutano
<b>SD</b>	standardna devijacija
<b>SPSS</b>	statistički program za analizu podataka
<b>SSCP</b>	konformacijski polimorfizam jednolančane DNK ( <i>engl. „Single-strand conformational polymorphism analysis“</i> )
<b>Std</b>	standardni
<b>SVR</b>	virološki odgovor nakon završenog liječenja ( <i>engl. „Sustained viral response“</i> )
<b>TGCE</b>	temperaturni gradijent kapilarnom elektroforezom ( <i>engl. „Temperature gradient capillary electrophoresis“</i> )
<b>Tm</b>	temperatura taljenja ( <i>engl. „Melting temperature“</i> )
<b>W</b>	širina ( <i>engl. „Wide“</i> )
<b>%</b>	postotak



$\infty$	beskonačno
<	manje
>	više
$\mu\text{L}$	mikrolitar
$\bar{X}$	srednja vrijednost
$\Sigma$	ukupno

## 1. UVOD

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća znanstvenici su otkrili testove za identifikaciju virusa hepatitisa A (HAV) i virusa hepatitisa B (HBV) iz seruma oboljelih (1). Usprkos tome, testirajući serume bolesnika s poslije-transfuzijskim hepatitisom veliki broj slučajeva ostao je nerazjašnjen te su oni svrstani u skupinu bolesnika sa „non-A, non-B“ hepatitisom. Do preokreta dolazi tek sredinom '80-ih godina kada je višegodišnji istraživački rad pod vodstvom Daniel W. Bradleya, konačno urodio plodom te je identificiran mali ribonukleinski (RNK) virus s ovojnicom (2). U travnju 1989. objavljena su dva značajna rada o načinu izolacije komplementarne deoksiribonukleinske kiseline (cDNK) iz „non-A, non-B“ klona kao i vrsti testa koji učinkovito detektira cirkulirajuća protutijela na „non-A, non-B“ virus (3,4). Od tada se „non-A, non-B“ virus naziva virus hepatitisa C (HCV). Početkom '90-ih godina identifikacijski testovi postali su komercijalno dostupni. Rutinskim testiranjem banaka transfuzijskih centara pokrenuta je lavina sve većeg broja novo otkrivenih zaraženih pojedinaca.

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije infekcija HCV-om ima pandemijske razmjere. Pretpostavlja se da je kronično zaraženo oko 2,2% svjetske populacije (oko 170 miliona ljudi) a njih oko 5 miliona obitava u zapadnoj Europi (5). Godišnje se registrira 3 do 4 miliona novo zaraženih pojedinaca (6). Za razliku od drugih hepatotropnih virusa (HAV, HBV, Epstein-Barr virus, citomegalovirus) velika većina zaraženih HCV-om oboljet će od kronične bolesti a time imati i predispoziciju za razvoj komplikacija bolesti. HCV je uzrok 27% ciroza i 25% hepatocelularnih karcinoma u svijetu (7).

Od otkrića, pa sve do danas istraživanja HCV-a ne jenjavaju. Nažalost, zaostaju mnoge nepoznanice zbog kojih još uvijek nema apsolutno učinkovitog lijeka za oboljele kao niti cjepiva za nezaražene pojedince. Dobro poznavanje prirodnog tijeka kronične infekcije HCV-om nemoguće je bez dobrog poznavanja biologije virusa, posebno razvoja njegovih modifikacija kroz vrijeme.

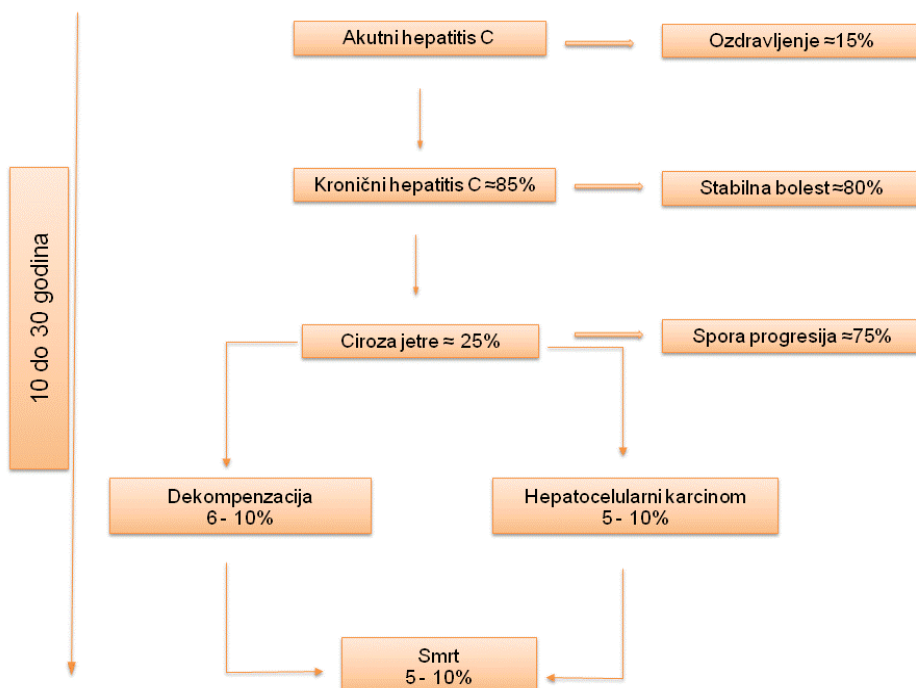
### **1.1. Prirodni tijek bolesti**

Istraživanje prirodnog tijeka HCV infekcije metodološki je ograničeno iz nekoliko razloga: 1. izuzetno se rijetko prepoznaje početak akutne infekcije; 2. velika većina kronično oboljelih je asimptomatskog tijeka pa tako i neprepoznata godinama; 3. progresija kronične bolesti nije praćena adekvatnom kliničkom slikom te također ostaje neprepoznata.

Vrijeme inkubacije nakon akutne izloženosti virusu je prosječno 7 tjedana (raspon 4-20 tjedana). Do pojave genskog materijala virusa u krvi (ribonukleinska kiselina hepatitis C virusa, HCV RNK) dolazi 10-14 dana nakon zaražavanja. To je ujedno i prvi test koji postaje pozitivan (8). Prosječno vrijeme do pojave protutijela na HCV (anti-HCV) iznosi 8-9 tjedana. Klinički je akutna faza simptomatska i prepoznatljiva ikterusom samo u trećine zaraženih. Laboratorijski je karakterizirana povišenim aminotferazama i do 10 puta iznad normalnih vrijednosti (9). U slučaju spontanog ozdravljenja postepeno dolazi do normalizacije laboratorijskih i kliničkih parametara kao i do eliminacije genskog materijala virusa iz krvi. Prema dosadašnjim saznanjima HCV infekcija spontano nestaje nakon akutne faze samo u oko 15%

zaraženih, raspon od 10 do 50% (9-11). Ovako velika varijabilnost udjela spontane eliminacije najvjerojatnije je posljedica utjecaja više čimbenika: načina zaraze, veličine i tipa inokuluma kao i kliničke prezentacije (12). Nažalost, većina bolesnika (do 85%) ipak će razviti kroničnu bolest koju karakterizira aktivno umnažanje virusa duže od 6 mjeseci. Klinički je tijek kroničnog hepatitisa C (KHC) varijabilan, najčešće progresivan. Pretpostavlja se da manje od 20% bolesnika tijekom bolesti ima nespecifične simptome tipa umora, dok aminotransferaze fluktuiraju od normalnih do tek blago povišenih (13). Prirodni tijek, od akutne izloženosti virusu do završne faze kronične bolesti jetre prikazan je na grafikonu 1.

Grafikon 1. Prirodni tijek bolesti

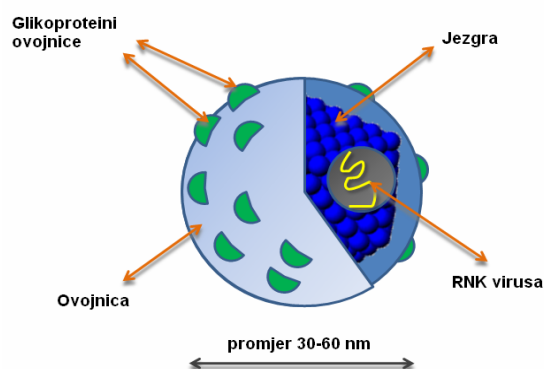


## 1.2. Biološke karakteristike virusa hepatitisa C

Analiza strukture HCV komponenti okosnica je za razumijevanje molekularnog mehanizma infekcije HCV-om, umnažanja kao i interakcije sa staničnim komponentama domaćina (14). Iako je prošlo 20 godina od identifikacije HCV-a, kompletna virusna čestica još uvijek nije sa sigurnošću vizualizirana.

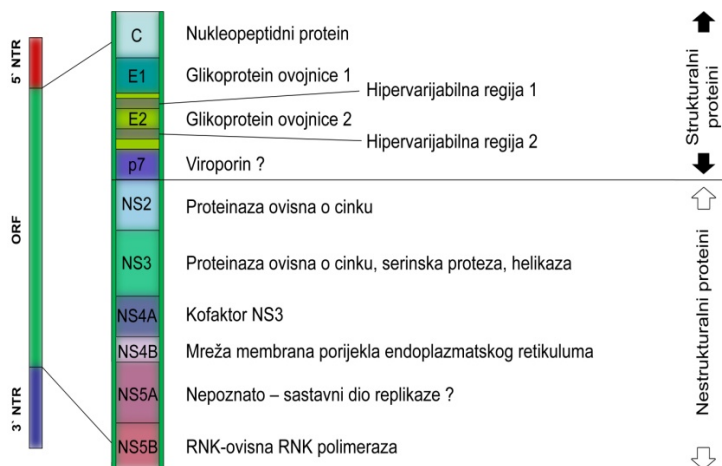
HCV je jednolančani, pozitivno usmjereni RNK virus s ovojnicom. Svrstava se u rod *hepacivirusa*, porodice *Flavivirida*, promjera veličine 30-60 nm (slika 1.).

Slika 1. Izgled čestice HCV-a (15, adapt)



Genom se sastoji od 5' i 3' nekodirajućih regija (NTR, engl. „*Nontranslanted region*“) između kojih se nalazi otvoreni okvir za čitanje (ORF, engl. „*Open reading frame*“). Čini ga oko 9600 baza koje kodiraju poliprotein od 3010 do 3033 aminokiselina (aa), slika 2. Broj aa ovisi o genotipu virusa.

Slika 2. Genom HCV-a (16, adapt)



Uloga pojedinih proteina tek je djelomično razjašnjena (8).

Područje 5'-NTR djeluje kao unutarnje mjesto ulaska u ribosom (IRES, *engl. „Internal ribosome entry“*) i kontrolira početak prevođenja genoma (17). Poliprotein čine strukturalni i nestrukturalni proteini.

**Strukturalni proteini: C protein** koji regulira apoptozu hepatocita, interferira s intracelularnim metabolizmom lipida i lipoproteina te utječe na nastanak steatoze. Glikoproteini ovojnice jesu **E1** i **E2**. Još od otkrića HCV-a poznato je da se u području E2 glikoproteina nalaze dvije hipervarijabilne regije, **HVR 1** i **HVR2** (HVR, *engl. „hypervariable region“*). One čine područje najpodložnije genskim mutacijama a samim time mjesto najveće mogućnosti virusnog izbjegavanja obrambenim mehanizmima imunološkog sustava zaraženog pojedinca (18). Strukturalne proteine od nestrukturalnih dijeli kratak peptid **p7** koji vjerojatno pripada viroporinima. Moguća mu je uloga i u sazrijevanju i oslobađanju virusa (19).

**Nestrukturalni proteini** (NS) jesu od NS2 do NS5B i imaju ulogu u umnažanju virusa. Za proteolizu nestrukturalnih proteina služe **NS2/NS3** cink-ovisna proteinaza te **NS3** serinska proteinaza. Potonja za djelovanje treba kofaktor, **NS4A**. Funkcija **NS4B** proteina malo je poznata. Predstavlja integralni protein endoplazmatskog retikuluma koji, pak, s endoplazmatskim retikulumom stanice domaćina stvara mrežu i služi kao područje interakcije virusne RNK i proteina stanice domaćina tijekom umnažanja virusa (20). **NS5A** je višefunkcionalni serinski polifosforilirani protein. Ispitivanjem njegove funkcije u staničnim kulturama zaključeno je da njegove adaptacijske mutacije značajno pojačavaju učinak umnažanja virusa te da je u interakciji s različitim staničnim proteinima (21). **NS5B** je RNK-ovisna RNK polimeraza (RdRp, *engl. „RNA-dependent RNA polymerase“*) (22). Svi navedeni proteini potencijalne su ciljne točke za razvoj učinkovitih lijekova (NS5B za inhibitore polimeraza, NS3 za inhibitore proteza). Zbog svoje varijabilnosti, glikoproteini ovojnice (E1 i E2) najmanje su pouzdani kao ciljno mjesto lijekova.

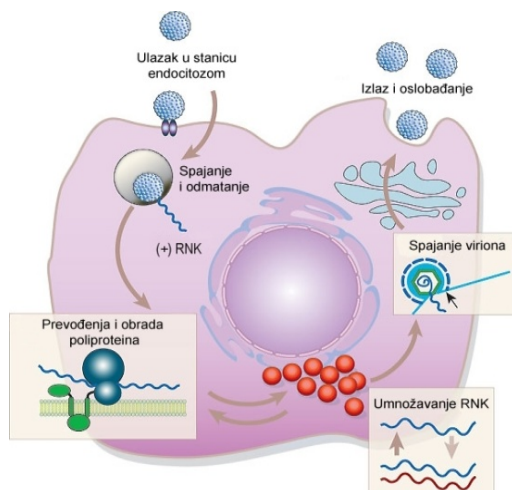
### **1.3. Životni ciklus virusa hepatitisa C (slika 3)**

Zaraznost HCV-a je pH-ovisna te vjerojatno zbog toga ograničena na hepatocit (23). Prema novijim saznanjima HCV se molekularnim testovima može naći i u drugim stanicama. Potonje potkrijepljuje činjenica da se HCV RNK može naći u mononuklearima u čak do 70% bolesnika s okultnom HCV infekcijom. Okultnu infekciju karakterizira prisustvo HCV RNK u jetri uz odsustvo i HCV RNK i anti-HCV u serumu tih istih bolesnika (24). Tako mononukleari mogu biti rezervoar za reaktivaciju

bolesti po prestanku liječenja, no njegovo prisustvo u njima ne uzrokuje bolest. Ne manje važno, umnažanje HCV tijekom zaraze dokazano je i u dendritičkim stanicama. Dendritičke stanice služe za prezentiranje antigena i sudjeluju u primarnom imunološkom odgovoru domaćina. Kao rezervoar virusa i one su jedan od čimbenika perzistiranja infekcije (25).

Saznanja o životnom ciklusu HCV-a temelje se uglavnom na *in-vitro* istraživanjima jer nema dobrog životinjskog modela kao niti u potpunosti učinkovite kulture stanica za ispitivanja *in vivo*. Prekretnicu u istraživanjima predstavljaju sistemi za umnažanje dobiveni genetskim inženjeringom: „replicon“ sistemi ili rekombinantne stanične kulture hepatocita (*Huh7*) (21,26-28). Sastoje se minimalno od nestrukturalnih regija HCV RNK (od NS3 do NS5B) ili od kompletnog genoma, sve dobiveno genetskim inženjeringom.

Slika 3. Životni ciklus HCV-a (29, adapt)



HCV ulazi u stanicu tako što se glikoproteinom ovojnice (E2) veže za CD81 receptor hepatocita. Zajedno s receptorima lipoproteina niske gustoće čini HCV-receptor kompleks te time endocitoza biva potpomognuta (30,31).



Umnažanje HCV-a u stanici katalizira RdRp. U zaraženoj stanici ona se smješta uz perinuklearnu membranu, povezuje s ostalim nestrukturalnim proteinima i staničnim elementima te je stvoren kompleks za umnažanje. Polimerizacijom nastaju komplementarne RNK ovojnice. Negativno usmjerene RNK predstavljaju međuprodukt koji služi kao osnova za pozitivno usmjerenu virusnu RNK. Konačni proizvod obavlja ovojnica te nastaje ili novi virion ili signalna RNK za sintezu HCV-a.

#### **1.4. Zemljopisna različitost virusa hepatitisa C**

Ubrzo nakon otkrića HCV-a, početkom devedesetih godina prošlog stoljeća uočeno je da njegov genom pokazuje značajne različitosti sekvenci. Razlog je najvjerojatnije u velikom virusnom obrtaju te, stoga, u nemogućnosti adekvatnog čitanja izmjena NS5B RdRp. Sekvencioniranjem uzastopnih uzoraka u kronično zaraženih pojedinaca izmjerena je prosječna učestalost mutacije od  $1,44 \times 10^{-3}$  izmjena baza nukleotida po jednoj lokalizaciji na genomu u godini dana (32). Posljedično brzini mutacija, do danas je u svijetu poznato oko 90 vrsta virusa a međusobno se razlikuju prema rasporedu aa.

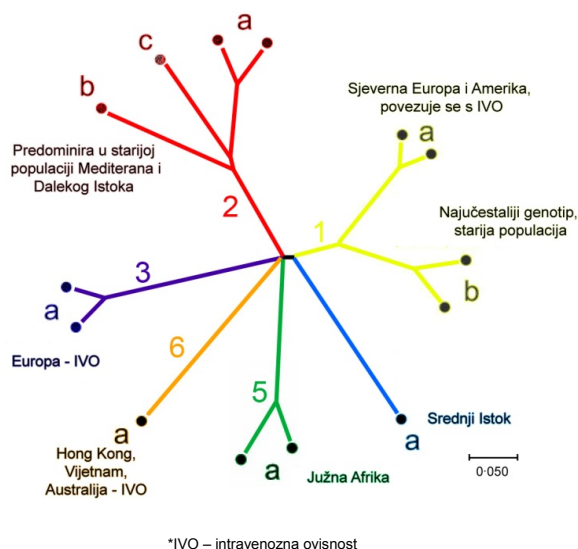
U cilju ujednačavanja oznaka različitih tipova i podtipova godine 1994. prihvaćen je model klasifikacije HCV-a. Prema glavnom filogenetskom stablu razlikuje se 6 glavnih tipova, nazvanih **genotipovi**. Označavaju se arapskim brojkama od 1 do 6 (33). Novija saznanja ukazuju da, vrlo vjerojatno, postoji 11 genotipova, od 1 do 11, no zbog nedovoljnih dokaza o razlikama ovi se novo-

otkriveni genotipovi još uvijek grupiraju u ishodišta već poznatih genotipova, kako slijedi: **1**; **2**; **3= 3+10**; **4**; **5**; **6= 6+7+8+9+11** (34). Između pojedinih genotipova razlika rasporeda aa u nukleotidnom slijedi iznosi 31-33% (35). Slijedeći nivo raznolikosti obuhvaća **podtipove** pojedinih genotipova koji se označavaju malim slovima „od a do c“. Međusobna različitost podtipova istog genotipa je 20-25% (35).

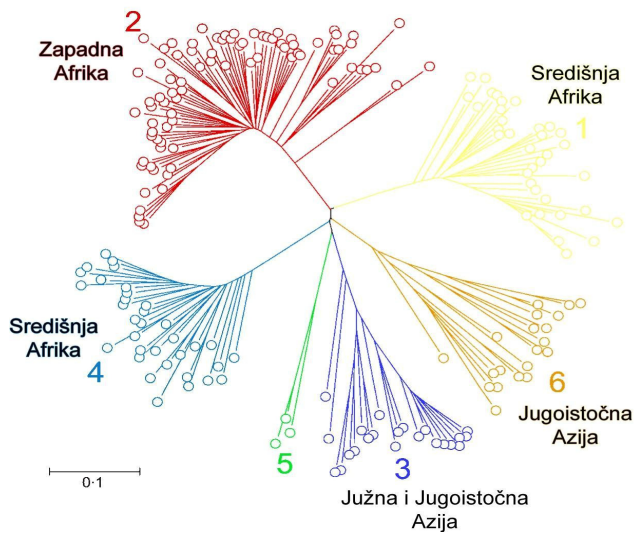
Ovakova podjela važna je zbog epidemiološkog praćenja jer se različita filogenetska stabla nalaze u razvijenim i nerazvijenim područjima svijeta (Slika 4a i 4b). Pretpostavlja se da je HCV značajno duže prisutan u Afričkoj i Azijskoj populaciji što je glavni uzrok velike filogenetske širine u nerazvijenim zemljama (36). U svakom zemljopisnom području obitava virus koji je najpogodniji za preživljenje uzevši u obzir okolišne čimbenike.

Ne manje važno, genetsko određivanje virusa potrebno je i poradi različite osjetljivosti genotipova na dostupne terapijske protokole.

Slika 4a. Filogenetsko stablo razvijenih zemalja (36, adapt.)



Slika 4b. Filogenetsko stablo nerazvijenih zemalja (36, adapt.)



Prevalencija glavnih genotipova i podtipova u Hrvatskoj odgovara onoj utvrđenoj u južnoj i istočnoj Europi (37). Predominira infekcija genotipovima 1 (58,8%) i 3 (35,6%). Analizirajući i podtipove genotip 1b nalazi se u 37,4% a genotip 1a u 13,1% zaraženih. Genotipovi 2 i 4 u Hrvatskoj su vrlo rijetki (2,2% i 3,4%) dok genotipovi 5 i 6 nisu uopće detektirani. U posljednjih desetak godina mijenja se udio pojedinih genotipova. Globalno se, učestalije nego ranije, viđa infekcija virusom genotipa 3a što je povezano s promjenom dominantnog načina zaraze. Korisnici opojnih droga postaju danas osnovni rezervoar HCV-a (38). I u Hrvatskoj se zamijećuje mijenjanje trenda dominantnog genotipa. Udio infekcije genotipom 3 godine 1998. bio je 26,1% dok aktualno udio iznosi 35,6% (37,39).

### 1.5. Kvazispecijesi virusa hepatitisa C

HCV u zaraženom pojedincu obitava u formi **kvazispecijesa**. Oni čine genetski različitu ali usko povezanu skupinu oblika virusa nastalih kroz vrijeme kao posljedica promjena (mutacija) (40). Nekoliko je osnovnih pojmova u molekularnoj biologiji koji obilježavaju kvazispecijese: složenost (*engl. „complexity“*) i raznolikost (*engl. „diversity“*).

**Genetičku složenost** predstavlja ukupan broj genetičkih oblika (klonova) unutar skupine (populacije) kvazispecijesa. Obično se izražava kroz postotak (proporciju) podudarnosti među detektiranim klonovima u jednoj točki u jednom pojedincu čime se dijele u homogenije i heterogenije kvazispecijese.

**Genetičku raznolikost** čini kvaliteta detektiranih razlika (varijacija) u sekvencama klonova koje nastaju mutacijom na jedan od slijedećih načina: umetanje (*engl. „insertion“*), gubitak (*engl. „deletion“*) ili zamjena (*engl. „substitution“*) bilo tranzicijom, bilo tranverzijom nukleotida. Raznolikost određuje ranjivost populacije.

Do mutacija može doći na bilo kojem dijelu genoma HCV-a ali sve nemaju klinički značaj. U svakom virusnom genomu postoje **više postojana (konzervirana)** i **manje postojana (varijabilna)** područja. Važnost stvorene mutacije, a time i potpuno nove virusne čestice (kvazispecijesa), ovisi o ulozi proteina na kojem se mutacija dogodila. Teoretski, mutacije se događaju nasumce ali njihovo generiranje i postojanost u mikro-okolišu ovisit će o prednostima ili nedostacima promjene. Naime, HCV se prilagođava mikro-okolišnim uvjetima radi preživljavanja. Do promjena okolišnih uvjeta može doći spontano (djelovanje obrambenog sustava domaćina) ili

inducirano (antivirusno liječenje; pridružene bolesti domaćina). HCV „ne dozvoljava“ veće odnosno značajne mutacije u područjima potrebnim za njegovo funkcioniranje, u konzerviranim područjima. S druge strane, mutacijama u varijabilnim regijama, klinički gledano, izbjegava imunološkom odgovoru domaćina ili antivirusnom liječenju. Ovim obrambenim mehanizmima virus dugotrajno obitava u domaćinu. Sposobnost stvaranja kvazispecijesa omogućuje mu bolje preživljavanje jer istodobnim prisustvom različitog genetskog materijala te sposobnošću brzim mutacijama generira populaciju koja je sposobna preživjeti u svim uvjetima mikro-okoliša.

Ova teoretska pretpostavka o vremenski i pozicijski nasumce nastalim mutacija potvrđena je i praktično, u replikon sistemima te *Huh7* staničnim linijama (41-44). Produljavanjem vremena obitavanja u replikon sistemima virus aktivira prilagodbene mehanizme na brojnim pozicijama u genomu čime dalje pojačava kapacitet umnažanja. Mehanizmi prilagodbe stvoreni u replikon sistemima nisu bili djelotvorni, dapače bili su smrtonosni za virus nakon prijenosa infektivne cDNK u čimpanzu (45). Opažanja uvrđena ispitivanjem na *in-vitro* modelima ne podrazumijeva i apsolutnu podudarnost događaja u zaraženom domaćinu. U najbližem humanom modelu, *in-vitro* zaraženim staničnim linijama hepatocita *Huh7*, dokazane su mutacije virusa slučajnom zamjenom nukleotida kao i činjenica da interferon-alfa smanjuje opseg tih mutacija inhibicijom RdRp (46).

Zaključno, varijabilne regije genoma se ipak kontrolirano mijenjanju kako bi se očuvala biološka funkcija proteina koje sintetiziraju te su time ipak djelomično i konzervirane. Nasuprot tomu, konzervirane regije genoma toleriraju određene promjene, posebno one koje poboljšavaju funkciju proteina koje sintetiziraju, pa su time ipak djelomično i varijabilne.

### *1.5.1. Konzervirane regije genoma*

Konzervirane regije toleriraju tek sporadične izmjene aa na specifičnim mjestima jer se novonastale ne-istoznačne (nekomplementarne) regije eliminiraju negativnom selekcijom. To se posebno odnosi na NS5A protein (izuzev V3 podpodručja), NS3 proteinazu, NS3 helikazu i RdRp (47,48). Funkcionalni dio 5'-NTR HCV genoma, IRES, također postoji u vidu kvazispecijesa. No, na minimalno moguće stvorene mutacije u ovom području aktiviraju se kompenzatorni mehanizmi ispravka krivo sparenih baza aa (49).

### *1.5.2. Varijabilne regije genoma*

Varijabilne regije dobro toleriraju izmjene aa. Jedna od takvih regija u genomu HCV je područje od 27 aa N-terminalnog dijela E2 glikoproteina ovojnice, nazvana hipervarijabilna regija 1, HVR1. Navedena regija različita je među genotipovima kao i podtipovima istog genotipa. Intenzivne izmjene aa posebno se zbivaju tijekom akutne infekcije HCV-om. U kroničnoj infekciji, HVR1 kvazispecijesi genetski su vrlo složeni i vrlo brzo nastaju bilo spontano bilo inducirano (50-52). HVR1 regija ciljno je mjesto neutralizacije HCV-a te su nastale mutacije vrlo vjerojatno posljedica djelovanja neutralizirajućih protutijela. Ostale varijabilne regije jesu: HVR 2 u E2 regiji glikoproteina ovojnice, recetno utvrđena HVR 3 u E2 regiji glikoproteina ovojnice te V3 regija smještena na C-terminalnom dijelu NS5A proteina (53).

### 1.5.3. Funkcionalne posljedice kvazispecijesa virusa hepatitisa C

*In vivo* i *in vitro* istraživanjima pokazalo se da izmjene pojedinačnih aa ili cijelih nukleotidnih sekvenci uzrokuje kvantitativnu razliku funkcije virusnih proteina. Osnovno mjesto umnažanja HCV-a je hepatocit no ima dokaza da se može umnažati i u drugim stanicama, primjerice u polimorfonuklearima. Nadalje, postoje dokazi da se različite varijante virusa mogu naći ovisno o mjestu (tkivu) umnažanja u istog zaraženog pojedinca (54,55). Svaka novostvorena varijanta virusa u pojedinačnoj matičnoj stanici za umnažanje može se dalje distribuirati i zaražavati nove stanice novom virusnom varijantom. Funkcionalnost razvijene mutacije najviše ovisi o mjestu gdje je mutacija nastala u genomu, odnosno je li se dogodila u području strukturalnih ili ne-strukturalnih proteina.

### 1.5.4. Dinamika kvazispecijesa virusa hepatitisa C

#### 1.5.4.1. Kvazispecijesi tijekom samog čina zaraze

Količina unesenog virusa tijekom zaraze (inokulum) sadrži određenu vrstu i količinu kvazispecijesa porijekla izvora zaraze. Razvojem infekcije u primatelju virusa (domaćinu) dolazi do selekcije određenih varijanta na nekoliko razina: tijekom ulaska HCV-a u hepatocit, tijekom umnažanja u hepatocitu ili u kasnijoj inter-reakciji s imunološkim sustavom domaćina. U konačnici reakcija imunološkog sustava domaćina odgovorna je za postizanje ravnoteže između virusa i domaćina a kvaliteta ravnoteže odgovorna je za nastanak i/ili progresiju bolesti.

Moguće su i superinfekcije ali i miješane infekcije različitim genotipovima do u 25% zaraženih (56-58). Moguće objašnjenje je primjerice u akutnoj izloženosti višestrukim virusima. Navedeno se ranije često viđalo, prije uvedenog rutinskog probira, u bolesnika s koagulopatijom koji su primali faktore zgrušavanja krvi proizvedene od više zaraženih dobrovoljaca. Danas se miješane infekcije učestalije viđaju u korisnika opojnih droga ili u bolesnika na programu kronične hemodijalize (57,59,60). Genetska povezanost ali i različitost kvazispecijesa domaćina i izvora zaraze jasno je dokazana pri vertikalnom prijenosu, u djece rođene od HCV pozitivnih majki. Dokazano je da nastanak kvazispecijesa prethodi imunološkom odgovoru djeteta zaraženog vertikalnim prijenosom (61). Također je registrirano da se, u tom verzikalnom prijenosu, kvazispecijesi mogu razvijati i do 10 godina nakon akutne izloženosti te da je razvoj novih mutacija učestalije povezan s porastom alanin aminotransferaze (ALT) (62).

#### 1.5.4.2. Kvazispecijesi pri akutnoj infekciji

U oko 15% akutno zaraženih pojedinaca može doći do spontane eliminacije virusa te infekcija ne prelazi u kroničnu. Dosadašnja saznanja o mutagenoj sposobnosti HCV-a i razvoju kvazispecijesa ne objašnjavaju u potpunosti razloge sposobnosti spontanog izlječenja. Prema studiji Patrizie Farci iz 2000. godine izgleda da sposobnost spontanog izlječenja ne ovisi direktno (ili samo) o vrsti kvazispecijesa već o učinkovitosti imunološkog sustava domaćina za kontrolom tijeka akutne infekcije (63). U situaciji idealnog odgovora imunološkog sustava domaćina kvazispecijesi domaćina postaju sve homogenija grupa te u konačnici virus bude uklonjen dominantno aktivacijom celularnog imunološkog odgovora.



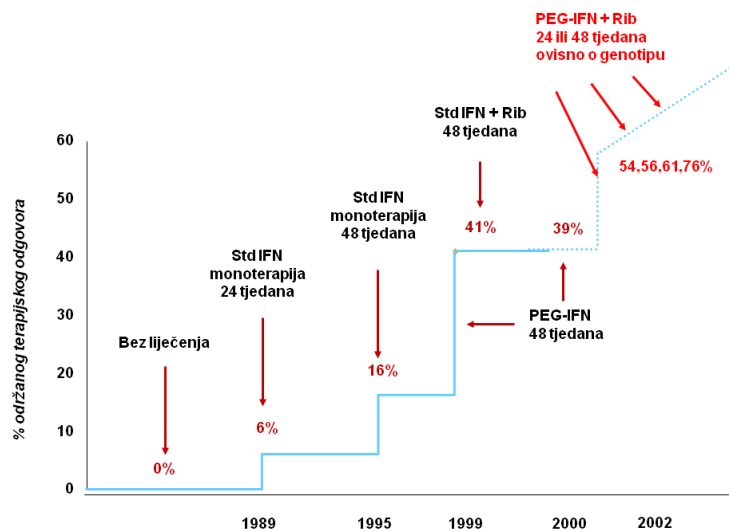
#### 1.5.4.3. Kvazispecijesi tijekom kronične infekcije

U slučaju kronične infekcije čini se da složenost i različitost kvazispecijesa ima ulogu u podržavanju kao i brzini progresije te razvoja komplikacija bolesti (64). Međutim, dosadašnja saznanja nisu u potpunosti istoznačna. Veća je vjerojatnost da je postojanje kvazispecijesa posljedica a ne uzrok kronične infekcije. Očekivano je da će u slučaju infekcije duljeg trajanja postojati sve složeniji i sve različitiji oblici kvazispecijesa. Jasan dokaz ove tvrdnje za sada ipak ne postoji, što se povezuje s nepostojanjem dovoljno senzitivnih dijagnostičkih metoda za otkrivanje posebno intrahepatičnih vrsta kvazispecijesa.

#### 1.5.4.4. Kvazispecijesi tijekom antivirusnog liječenja

Od otkrića HCV-a primjenjivani su različiti protokoli liječenja, grafikon 2. U samom početku liječenje se sastojalo u monoterapiji standardnim oblicima interferona-alfa (std. IFN-alfa) u različitim dozama (3 ili 5 miliona jedinica, MU) i u različitim frekvencijama aplikacije (svakodnevno ili svaki drugi dan). Ovakovim se protokolom učinkovita eliminacija virusa postizala tek u petine liječenih. Sredinom '90-ih godina prošlog stoljeća započeto je liječenje kombinacijom std. IFN-alfa i ribavirina (Rib). Učinkovitost ovog protokola bila je veća. Uspješna eliminacija virusa postignuta je, ovisno o dužini liječenja, u maksimalno trećine liječenih. Daljna ispitivanja prvenstveno su bazirana na poboljšanju molekule interferona-alfa. Pegilacijom molekule IFN-alfa (dodatak polietilen glikola, PEG IFN-alfa) postignuta je ujednačena serumska koncentracija IFN-alfa. Uz dodatak Rib postignut je veći napredak u učinkovitosti liječenja.

Grafikon 2. Napredak u liječenju KHC



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

Od početnih 6% izlječenih, danas je moguće izlječiti i do 2/3 novootkrivenih zaraženih pojedinaca (65-68). Današnji terapijski standard u liječenju KHC predstavlja kombinacija PEG IFN-alfa i Rib kroz 24 ili 48 tjedana, ovisno o genotipu virusa. Ovakovim protokolom izlječenje se postiže, ovisno o genotipu, u 54-76% liječenih. Preostala trećina do polovica neizlječenih ima, usprkos terapiji, trajno aktivnu bolest uz mogućnost progresije prema komplikacijama bolesti odnosno razvoju ciroze jetre.

Pretpostavlja se da upravo kvazispicijesi mogu biti jedan od prediktivnih čimbenika za učinkovitost liječenja. Do sada je poznato da će pojedinci zaraženi homogenijim tipom HCV-a s većom vjerojatnosti biti učinkovito izlječeni kombinacijom std. IFN-alfa i Rib (38).

Kombinacija PEG IFN-alfa i Rib postaje standardni protokol liječenja 2002. godine. Od ranije poznati pozitivni prediktivni faktori za izlječenje (utvrđeni na

prethodnim protokolima) istražuju se i za ovaj protokol. Kvazispecijesi, odnosno preterapijska genetska osnova HCV-a ima određenu prediktivnu vrijednost (69). Rezultati dosadašnjih ispitivanja nisu jednoznačni (70-73). Prema talijanskoj studiji Abbate i suradnika, složenost (kompleksnost) kvazispecijesa neovisan je prediktivan faktor za postizanje ranog terapijskog odgovora ali se pozitivna predikcija gubi u procjeni učinka liječenja na kraju terapije (70,71). Farci i suradnici ispitivali su različitost (diverzifikaciju), za razliku od ranije spomenutog istraživanja, no nisu dokazali da preterapijska diverzificiranost ima prediktivnu vrijednost za izlječenje. Oni su dokazali da dostizanje homogenosti kvazispecijesa tijekom liječenja ima prediktivnu vrijednost za izlječenje (72). Francuska grupa ispitivača na čelu sa Sandresom nije potvrdila pozitivnu prediktivnu vrijednost ni složenosti niti različitosti kvazispecijesa u liječenih pojedinaca (73).

#### *1.5.5. Metode određivanja kvazispecijesa virusa hepatitisa C*

Kvazispecijesi se mogu otkriti kloniranjem reverzne transkripcije pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR = „polymerase chain reaction“). No, ovakovo sekvencioniranje 15-20 neovisnih klonova (određivanje slijeda aa) izrazito je skupo i vremenski zahtjevno te time nepraktično za širu uporabu, posebno kliničku primjenu. Stoga se danas koriste dostupnije metode: SSCP (konformacijski polimorfizam jednolančane DNK, *engl. „Single-strand conformational polymorphism analysis“*), DGGE (gradijent denaturacije elektroforezom na gelu, *engl. „Denaturing gradient gel electrophoresis“*), DHPLC (denaturalizacija tekućom kromatografijom, *engl. „Denaturing high-performance liquid chromatography“*), TGCE (temperaturni gradijent kapilarnom elektroforezom, *engl. „Temperature gradient capillary*

*electrophoresis*”) (74-77). I potonje metode tehnički su zahtjevne primarno zbog automatizacije ali i potrebe višestrukog procesuiranja uzorka čime se povećeva rizik kontaminacije.

Taljenje DNK visokom rezolucijom (*engl. „High-resolution DNA melting analysis“*) nova je metoda uvedena u praksu 2002. godine. Uglavnom se koristila za genotipizaciju virusa i detekciju mutacija u konzerviranim regijama. Primjena joj je sve popularnija stoga što ne zahtjeva posebno procesuiranje uzorka, analiza uzorka je brza a ukupna cijena obrade značajno je manja od ranije navedenih metoda. Metoda se zasniva na fluorescenciji posebnih boja koje se vežu za dvolančanu DNK. Senzitivnost joj je velika te može detektirati i nanograme dvolančane (ne-denaturirane, odnosno nerastaljene) DNK (78). Uzorak pomiješan s fluoresceirajućom bojom postepeno se zagrijava. Intenzitet fluorescencije ovisi o količina prisutne ne-denaturirane DNK. Pojačavanjem temperature postepeno dolazi do denaturacije DNK (taljenje) čime postepeno dolazi i do opadanja fluorescencije. Temperatura taljenja ( $T_m$ , *engl. „Melting temperature“*) ovisi o količini guanin i citozin (GC) veza u dvolančanoj DNK ali i o njezinoj duljini.  $T_m$  čini samo jednu točku, odnosno samo onu temperaturu na kojoj je denaturirano 50% DNK, odnosno još uvijek fluoresceira samo 50% početnog uzorka. Puno više informacija dobiva se iz krivulje taljenja (*engl. „Melting curve“*). Oblik krivulje taljenja sve više se koristi kao indikator homogenih odnosno heterogenih formi dvolančane DNK. Detekcija mutacija ovisi o taljenju tih heterogenih formi jer one iskrivljuju oblik krivulje taljenja homozigota (78).

## 1.6. Prediktori terapijskog odgovora

Usprkos dosadašnjem terapijskom napretku i nadalje gotovo 40% liječenih pojedinaca s KHC ne bude izlječeno. Osnovni cilj svakog terapijskog protokola je izlječenje što u slučaju KHC podrazumijeva **trajnu** eliminaciju virusa iz seruma registrirano molekularnom dijagnostikom. Obzirom na termine koji će se koristiti u daljnjem tekstu disertacije potrebno je prvenstveno objasniti njihovo značenje.

Terminološki terapijski učinak se izražava:

1. Biokemijskim parametrima = **biokemijski odgovor**; označava ga normalizacija aminotransferaza za pojedince koji su u preterapijskom periodu imali patološke vrijednosti.
2. Virusnim parametrima = **virološki odgovor**; podrazumijeva nemjerljivost HCV RNK.

Primarni cilj svakog primjenjenog protokola je postizanje virološkog odgovora kao i njegovo održavanje i nakon prekinutog liječenja. Ovisno o vremenskoj točki u kojoj je virološki odgovor postignut dijeli se na:

1. Odgovor na kraju terapije = ETVR (*engl. „End of treatment viral response“*)
2. 6 mjeseci NAKON završetka terapije = SVR (*engl. „Sustained viral response“*) što predstavlja konačni cilj svakog terapijskog protokola.

Bolesnici u kojih se liječenjem eliminira virus u potpunosti kolokvijalno se nazivaju „**responderi**“. Suprotno, oni bez postignutog terapijskog odgovora nazivaju

se „**nonresponderi**“. Pojedinci u kojih je HCV RNK nemjerljiv u točki ETVR ali opetovano postaje mjerljiv u točki SVR nazivaju se „**relapseri**“.

Kako su današnji terapijski protokoli skupi ali i bremeniti nuspojavama, nedvojbeno bi bilo važno već u preterapijsko vrijeme prepoznati pojedince koji neće učinkovito odgovoriti na planirani protokol liječenja, odnosno, koji neće postići SVR. Do danas je registrirano više takovih parametara koji pojedinačno pozitivno prediktivno utječu na postizanje ETVR i/ili SVR:

1. **Karakteristike domaćina:** dob, spol, rasa, fibroza pri biopsiji jetre;
2. **Karakteristike virusa:** genotip virusa, viremija

Visina viremije i genotip najučestalije su dokazani kao pozitivni prediktivni faktori (79). Pojedini parametri potvrđeni su i na našoj populaciji bolesnika. Pozitivnu prediktivnu vrijednost imaju (80):

1. Za ETVR: dob mlađa od 40 godina, ženski spol, viremija niža od  $2,0 \times 10^6$  kopija/ml te odsustvo fibroze
2. Za SVR: dob mlađa od 40 godina, viremija niža od  $2,0 \times 10^6$  kopija/ml te odsustvo fibroze.

Prisustvo 3 ili više pozitivna prediktivna čimbenika statistički je značajno različito između respondera i nonrespondera. Interesantno je napomenuti da se ranijim istraživanjem u našoj grupi nije dokazala pozitivna prediktivna vrijednost za genotip virusa iako duljina trajanja liječenja ovisi upravo o njemu. Nasuprot tome našim istraživanjem smo dokazali da je složenost kvazispacijesa neovisan prediktivan čimbenik (81).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) u Hrvatskoj se godišnje prijavljuje oko 200 zaraženih HCV-om i približno isti broj kroničnih nosilaca virusa. Procijenjuje se da ima oko 1% HCV pozitivnih osoba u općoj populaciji te stoga Hrvatska spada u zemlju niske prevalencije što ne umanjuje značaj problema vezanih uz HCV i KHC.

Problematika u svezi HCV-a može se svesti na nekoliko činjenica:

- do sada NIJE vizualizirana kompletna virusna čestica
- nema modela za *in vivo* istraživanja
- nepoznat je životni ciklus virusa kao i stanični receptori putem kojih HCV ulazi u stanicu domaćina
- nepotpuno se poznaje funkcija proteina genoma HCV-a
- virus je izrazito mutagen
- virus ima veliku sposobnost prilagodbe staničnom okruženju što uvjetuje perzistiranje infekcije u domaćinu ali i u vanjskom okruženju
- rezervor virusa često su polimorfonukleari što je dokazano u okultnih infekcija

Činjenice da ne postoji apsolutno učinkovito liječenje i da još uvijek ne postoji cjepivo čine infekciju HCV-om predmetom brojnih istraživanja. Kronična infekcija javlja se u 75% zaraženih što tu populaciju čini podložnom za progresiju bolesti ka cirozi odnosno nastanku hepatocelularnog karcinoma.

Nakon zaraze, odnosno unosa inokuluma, za razvoj kronične infekcije najvjerojatnije je odgovoran neadekvatan imunološki odgovor domaćina. Pretpostavlja se da kvazispecijesi imaju ulogu u održavanju kroniciteta zaraze. Nedvojbeno je da HCV u pojedinca postoji kao dinamička skupina kvazispecijesa. Isto je tako nedvojbeno da HCV trajnom mutagenom aktivnosti izbjegava učinkovito djelovanje liječenja. Upravo stoga detekcija kvazispecijesa, procjena njihove kliničke značajnosti kao i dinamičke promjene imaju važnu ulogu u boljem poznavanju biologije virusa.

Brojna istraživanja provode se posljednjih godina u svrhu procjene kliničke značajnosti kvazispecijesa. Osnovno neodgovoreno pitanje je, može li određivanje kvazispecijesa, ili njihove dinamike kroz vrijeme izdvojiti grupu pojedinaca koja neće zadovoljavajuće odgovoriti na dostupne terapijske protokole.

INOKULUM – HCV kvazispecijes



HCV kvazispecijes različit u broju složenosti ili različit u sadržaju

Sukladno iznesenim činjenica postavljeni su ciljevi istraživanja.

***Opći cilj:***

1. definirati kvazispecijese u serumu pojedinog ispitanika.



**Specifični ciljevi:**

- A) utjecaj kvazispecijesa na težinu bolesti
- B) karakteristike kvazispecijesa u odnosu na:
  - 1. spol bolesnika
  - 2. dob bolesnika
  - 3. genotip virusa
  - 4. visinu viremije
  - 5. biokemijsku aktivnost
  - 6. histološku aktivnosti
  - 7. stadij fibroze
- C) utjecaj HCV kvazispecijesa na učinkovitost primijenjenog terapijskog protokola
- D) dinamika kvazispecijesa u liječenoj i neliječenoj grupi bolesnika
- E) procjena kliničke svrsishodnosti određivanja kvazispecijesa u bolesnika s KHC.

**2.1. Očekivani znanstveni doprinos**

Primoinfekcija je u samom početku određena genotipom virusa koji ostaje nepromijenjen tijekom svih faza bolesti. Genotipski nivo različitosti jasno utječe na terapijski učinak te se zna da bolesnici s genotipom 1 značajno slabije reagiraju na antivirusno liječenje. Kvazispecijesi su do sada vrlo malo istraženi. Tek se posljednjih nekoliko godina uvidjela njihova uloga u tijeku i ishodu infekcije i liječenja.

U Hrvatskoj dominira zaraza genotipom 1b a zadnjih se godina povećava učestalost zaraze genotipom 3a. Posljednje vrijeme sve se više govori o individualnom pristupu liječenju bolesnika s KHC iako nisu jasno definirani parametri na osnovu kojih bi se donosile odluke.

Očekuje se da će rezultati ovog istraživanja razjasniti kliničku ulogu kvazispecijesa u bolesnika s KHC kao i njihovu prediktivnu vrijednost u procjeni terapijskog odgovora te time omogućiti individualnost pristupa liječenju. Korištena metoda za određivanje kvazispecijesa tek se zadnjih nekoliko godina koristi za genotipizaciju ali nije korištena za procjenu mutacija u hipervarijabilnim regijama. Nadalje, procjena uzroka ili dinamike kvazispecijesa mogla bi pridonijeti istraživanjima u razvoju cjepiva.

Nije nevažno spomenuti da metodološki gledano ovaj tip istraživanja nije do sada proveden u svijetu a tako niti na populaciji hrvatskih bolesnika. Rezultati istraživanja omogućili bi optimiziranje terapije za svakog oboljelog ponaosob čime bi se smanjili troškovi kao i eliminirala mogućnost pojave nuspojava u pojedinaca.

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

#### ***3.1. Ispitanici***

U ovo prospektivno ispitivanje uključeni su bolesnici s dokazanim KHC koji su upućeni u hepatološku ambulantu Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb – Rebro s ciljem liječenja osnovne bolesti. Kod svih bolesnika dijagnoza KHC postavljena je standardnim postupkom: 1. dokaz postojanja infekcije kvalitativnim testom; 2. određivanje viremije kvantitativnim testom te 3. genotipizacija HCV-a. Uobičajenim testovima, prije početka liječenja isključeno je postojanje druge aktivne kronične bolesti jetre koja bi bila kontraindikacija za antivirusno liječenje (ostali virusni hepatitisi, autoimune bolesti jetre, nasljedne metaboličke bolesti jetre).

Ukupno je uključeno 109 ispitanika u dobi od 18 do 71 godinu; 64 muškarca i 45 žena. U svih bolesnika se prije početka liječenja učinila biopsija jetre zbog procjene histološke aktivnosti bolesti i stadija fibroze. U ispitivanoj grupi biopsija je učinjena u 104 bolesnika dok je njih petero imalo kontraindikaciju za istu obzirom na pridruženu nasljednu koagulopatiju (hemofilija).

Istraživanje ima za cilj određivanje kvazispicijesa u trenutku postavljanja dijagnoze te nakon 6 mjeseci u neliječenoj skupini odnosno na kraju liječenja u grupi nonrespondera. U trenutku postavljanja dijagnoze uzorak je uzet u svih 109 ispitanika.

U drugom određivanju kvazispecijesa, pri uzimanju parnog uzorka, ispitanici su podijeljeni u 2 grupe obzirom na terapijsku varijablu:

- Neliječeni ispitanici, **grupa 1 = 40 ispitanika**. U ovoj grupi ispitivana je promjena kvazispecijesa kroz vrijeme.
- Liječeni ispitanici, **grupa 2 = 69 ispitanika**. U ovoj skupini ispitanika procijenjen je učinak liječenja na promjenu kvazispecijesa. Drugi uzorak bilo je moguće dobiti samo u 23 ispitanika obzirom da je u njih 46 postignut ETVR te virus nije bio detektabilan.

Ispitanici su liječeni standardnim terapijski protokolom:

- **32 ispitanika** liječena su prije 2002. godine kada je standardni terapijski protokol bio: std. IFN-alfa 3 MU s.c. (subkutano) svaki drugi dan i Rib svakodnevno ovisno o tjelesnoj težini. Dnevna doza Rib u bolesnika s manje od 75 kilograma (kg) bila je 1000 miligrama (mg), dok u onih s težinom većom od 75 kg je bila 1200 mg;
- **37 ispitanika** liječena su nakon 2002. godine kada je standardni terapijski protokol postao: PEG IFN-alfa 180 mikrograma (mcg) 1xtjedno s.c. i Rib ovisno o tjelesnoj težini (kako je napisano za prethodni protokol).

Svi ispitanici bili su upoznati s protokolom i ciljevima istraživanja, a prije uključivanja potpisali su informirani pristanak. Ispitivanje se provodilo sukladno etičkim načelima i Deklaracijom iz Helsinkija iz 1975. godine te njezinim izmjenama iz 1983. godine. Provođenje ispitivanja odobrilo je Etičko povjerenstvo KBC Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Grupu novootkrivenih neliječenih ispitanika činili su bolesnici koji su se nalazili na listi čekanja liječenja a potreba uzimanja parnog uzorka nakon 6 mjeseci nije odgađala početak liječenja.

Dvojna kombinirana terapija std. ili PEG IFN-alfa uz Rib standardni je terapijski protokol liječenja bolesnika s KHC u svijetu a odobren je i u Hrvatskoj.

### **3.2. Metode**

U svakoj ispitivanoj vremenskoj točki ispitanicima uzet je serum:

1. za hematološku analizu;
2. za koagulacijske parametre;
3. za biokemijsku aktivnost i
4. za definiciju virusa i kvazispecijesa.

#### **3.2.1. Rutinska analiza seruma**

Kod svih ispitanika učinjena je kompletna krvna slika, broj trombocita, protrombinsko vrijeme, bilirubin, ALT, aspartat aminotransferaza (AST), gama glutamiltransferaza, alkalna fosfataza, glukoza, kolesterol, trigliceridi, urati te serumsko željezo.

### 3.2.2. Definicija virusa

Virus je definiran molekularnom dijagnostikom:

- kvalitativni dokaz infekcije metodom polimerazne lančane reakcije (PCR) (COBAS Amplicor HCV RNA test, v2.0, Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ)
- viremija se odredila kvantitativnim RT-PCR testom (COBAS Amplicor TM - HCV Monitor test, v2.0, Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ)
- genotip je određen metodom INNO-LIPA HCV II (Innogenetics N.V., Ghent, Belgija).

### 3.2.3. Analiza kvazispecijesa

Kvazispecijesi su analizirani metodom taljenja DNK visoke rezolucije. Navedena metoda ne zahtjeva sekvencioniranje nukleotida i upravo u tom pojednostavljenju je njezina prednost.

Uzeti uzorci seruma (aliquoti) čuvani su na  $-30^{\circ}\text{C}$  do trenutka izvođenja metode. Navedeni način čuvanja uobičajen je, i često se koristi, posebno u retrospektivnim analizama seruma posebnog istraživanačkog interesa.

- **IZOLACIJA RNK:**

Izolacija HCV RNK rađena je komercijalnim kitovima za izolaciju (NUCLEOSPIN RNA VIRUS, Macherey-Nagel, Njemačka) iz seruma dobivenih centrifugiranjem pune krvi na 2500 okretaja/min kroz 15 minuta. RNK je izolirana iz 150 µL seruma po preporukama proizvođača.

- **REVERZNA TRANSKRIPCija RNK (RT-PCR)**

Izolirana HCV RNK se postupkom reverzne transkripcije prepisuje u komplementarnu DNK (cDNK) koja potom služi kao ciljna molekula u PCR-u. Reverzna transkripcija rađena je komercijalnim kitovima TAKARA RNA PCR KIT (AMV) Ver.3.0 (TAKARA BIO INC, Japan).

Reakcijska shema reverzne transkripcije malo je izmjenjena od one koju preporuča proizvođač te je za 1 uzorak bila:

MgCl <sub>2</sub>	= 6,0 µL
10X RT pufer	= 3,0 µL
dNTP	= 3,0 µL
Rnase inhibitor	= 0,5 µL
AMV reverzna transkriptaza	= 0,5 µL
Primer „Random 9 mers“	= 1,0 µL
	<b>Σ 14,0 µL</b>
<u>RNK</u>	<u>1- 16 µL (DEPC H<sub>2</sub>O prema količini RNK)</u>
<b>Ukupan volumen reakcijske smjese</b>	<b>= 30,0 µL</b>

Pripremljena reakcijska mješavina s dodanim uzorcima RNK pipetirana je u 0,2 mL PCR epruvete te stavljena u PCR uređaj (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc, SAD).

Reverzna transkripcija rađena je po slijedećem programu:

#### **RT-PCR**

- 1) 30°C = 10 minuta
- 2) 45°C = 25 minuta
- 3) 95°C = 5 minuta
- 4) 4°C = 5 minuta.

Konačni proizvod reverzne transkripcije je cDNK koja potom služi za umnažanje (amplifikaciju) HVR1 regije HCV-a.

- **AMPLIFIKACIJA HVR1 REGIJE HCV** = hipervarijabilna regija HCV-a u području E2/NS1 regije HCV genoma

Amplifikacija je rađena u **dvije faze** (nested PCR):

1. **FAZA** = *amplifikacija s početnicama HVR1 i HVR4 (klasični PCR)* rađena je s rekombinantnom Taq-polimerazom – TaKaRa Taq™ (TAKARA BIO INC, Japan).



Reakcijska shema za PCR po kojoj je učinjena ova faza amplifikacije HVR1 regije je sljedeća:

10X PCR pufer	= 5,0 $\mu$ L
dNTP	= 4,0 $\mu$ l
Taq polimeraza	= 0,3 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	= 33,7 $\mu$ L
Početnica HVR1	= 1,0 $\mu$ L
Početnica HVR4	= 1,0 $\mu$ L
	$\Sigma$ 45,0 $\mu$ L
cDNK	= 5,0 $\mu$ L
<b>Ukupan volumen reakcijske smjese</b>	<b>= 50,0 <math>\mu</math>L</b>

Sekvenca početnice HVR 1 = 5'-CTGGGGAGTCCTGGCGGGCCTTGC-3'

Sekvenca početnice HVR 4 = 5'-GGTGTGGAGGGAGTCATTGCAGTT-3'

Konačni produkt = 250 parova baza.

Amplifikacija je rađena na klasičnom PCR uređaju kao i reverzna transkripcija (PTC-100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc, SAD). Pripremljena reakcijska mješavina s dodanim uzorcima cDNK pipetirana je u 0,2 mL PCR epruvete, te stavljena u PCR uređaj.

Amplifikacija je rađena po slijedećem programu:

#### **HVR1-HVR4**

- |           |                     |
|-----------|---------------------|
| 1) 95°C   | = 3 min             |
| 2) 94°C   | = 30 s              |
| 3) 50°C   | = 45 s              |
| 4) 72°C   | = 45 s              |
| 5) gotovo | = 2 do 35 (ciklusa) |
| 6) 72°C   | = 7 minuta          |
| 7) 4°C    | ∞                   |

Nakon završene prve faze dobiveni PCR produkti pohranjeni su na +4°C.

#### **2. FAZA = amplifikacija s početnicama HVR2 i HVR11 (Real-Time PCR).**

Prije pripremanja reakcijske smjese za ovu fazu, PCR produkti iz prve faze su razrijeđeni u omjeru 1:10 (10 µL PCR produkta prve faze + 90 µL sterilne destilirane H<sub>2</sub>O). Metoda je rađena na Real-Time PCR uređaju Light Cycler 1.5 (proizvođač ROCHE, Švicarska) uz reagens SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time, TAKARA BIO INC, Japan).

Reakcijska smjesa za Real-Time PCR bila je slijedeća:

Syber-green mix	= 10,0 µL
dH <sub>2</sub> O	= 4,2 µL
Početnica HVR2	= 0,4 µL
Početnica HVR11	= 0,4 µL
	<b>Σ 15,0 µL</b>
<b>Razrijeđani PCR produkt prve faze</b>	<b>= 5,0 µL</b>

Sekvenca početnice HVR 2 = 5'-TCCATGGTGGGGAACTGGGC-3'

Sekvenca početnice HVR 11 = 5'-CAGGGCAGTCCTGTTGATGTGCCA-3'

Konačni produkt = 195 parova baza.

Pripremljena reakcijska mješavina s dodanim razrijeđenim PCR produktom prve faze pipetirana je u kapilare specifične za Light-Cycler uređaj. Kapilare s PCR miksom su kratko centrifugirane u mini centrifugi (*engl. „short spin”*) kroz nekoliko sekundi na 1000-2000 rpm). Kapilare su zatim zatvorene i postavljene u kružni nosač (*engl. „carrusel”*) Light-cycler uređaja.

Program po kojem je rađen Real-Time PCR je slijedeći:

**DENATURACIJA (1 ciklus)**

95°C          30 s          20°C/min

**AMPLIFIKACIJA (45 ciklusa) = analitička metoda – kvantifikacija**

95°C          10 s          20°C/min

50°C          20 s          20°C/min

72°C          20 s          20°C/min          jednokratno

**TALJENJE (1 ciklus) = analitička metoda – krivulje taljenja**

95°C          30 s          20°C/min

50°C          20 s          20°C/min

65°C          15 s          20°C/min

95°C          0 s          0.05°C/min          trajno

**HLAĐENJE (1 ciklus)**

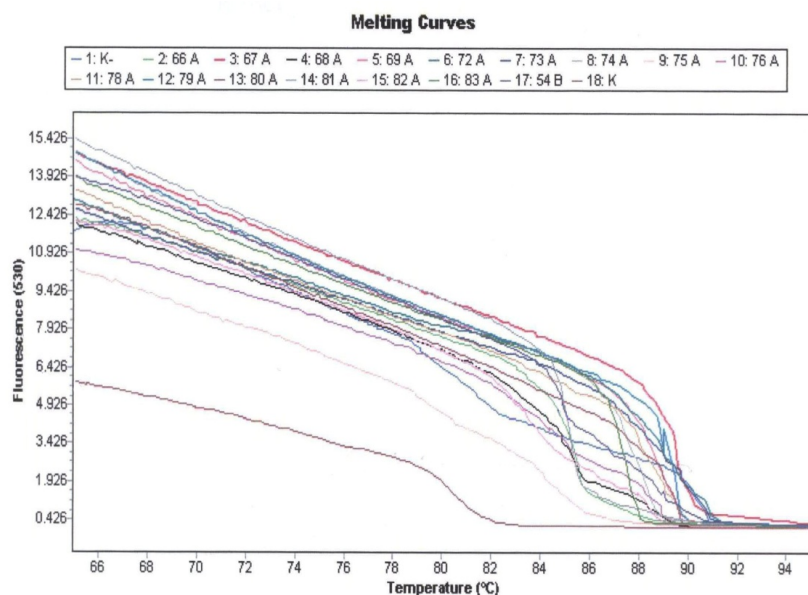
40°C          30 s          20°C/min

Nakon svakog ciklusa napravljena je analiza temperatura taljenja PCR produkta (engl. „*melting curve analysis*“). Rezultati analiza kao i krivulje taljenja pohranjeni su u originalnom računalnom programu.

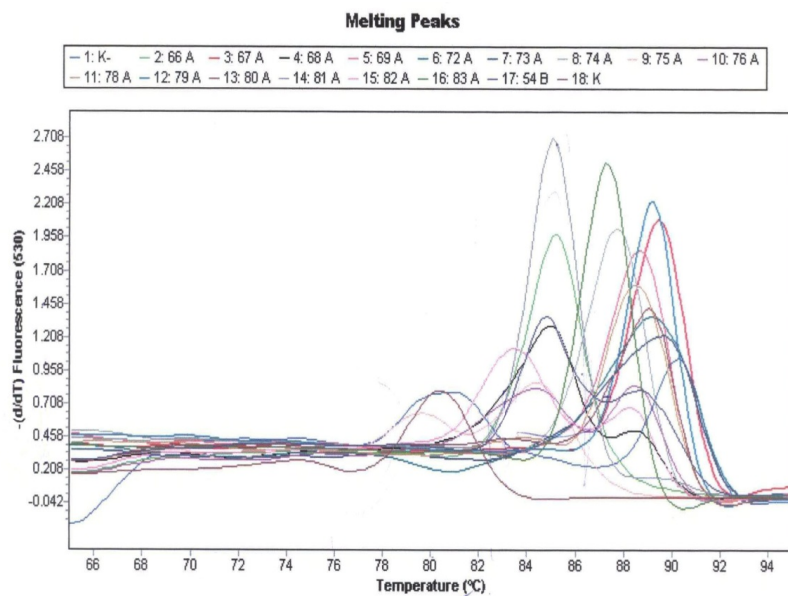
## ANALIZA TEMPERATURA TALJENJA PCR PRODUKTA

Krivulja taljenja (engl. „*melting curve*“) dobiva se spajanjem promjena fluorescencije u odnosu na promjene temperature taljenja, grafikon 3. Uobičajeno se rezultati analize dobivenih parametara prikazuju vrškom taljenja (engl. „*melting peak*“) što predstavlja derivirani oblik krivulje taljenja, grafikon 4.

Grafikon 3. Krivulje taljenja – 16 uzoraka



Grafikon 4. Vrškovi taljenja – 16 uzoraka



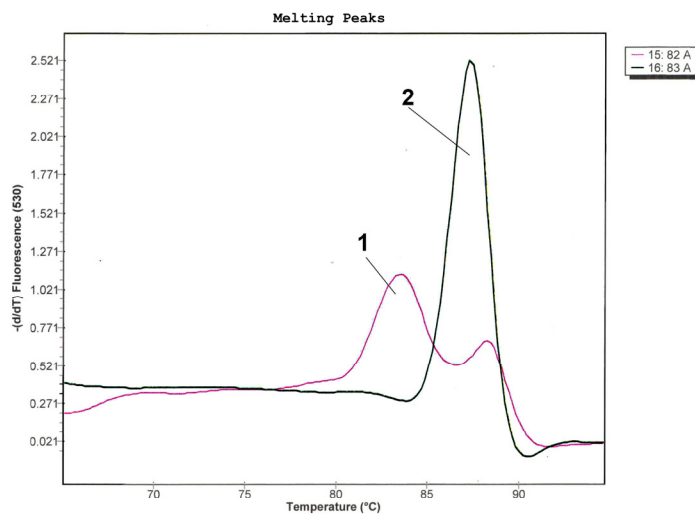
Parametri koji se dobivaju analizom ove metode jesu:

- **T<sub>m</sub>** = **temperatura taljenja** (engl. „Melting temperature“) u kojoj je došlo do denaturacije 50% DNK
- **H** = **visina** (engl. „High“) koju čini omjer fluoresceirajućeg i ne-fluoresceirajućeg dijela DNK u točki T<sub>m</sub>. Jačina fluorescencije ovisi o količini boje koje fluoresceira dok je vezana za nerastaljenu DNK. Jačina fluorescencije opada kako raste temperatura taljenja odnosno kako raste količina denaturirane DNK. Ona je odraz kvantitativnih promjena u odnosu na kvalitetu prisutnih kvazispelijesa.
- **W** = **širina** (engl. „Wide“), koju čini raspon početne i krajnje temperature taljenja. Pretpostavka je da je ona odraz kvalitativnih kvazispelijesa koji imaju zasebne kvantitativne karakteristike. Za pretpostaviti je što je veća širina da je potreban veći temperaturni raspon za početak i kraj denaturacije, odnosno da kvalitativno postoje različiti kvazispelijesi.

- **A = površina** (engl. „Area“), koju određuje površina krivulje dobivena odnosima ranijih parametara ( $T_m$ ,  $W$  i  $H$ ).

Analizirajući parne uzorke jednog ispitanika evidentno je, već vizualno, da se kvazispjecijesi mijenjaju i kvalitativno i kvantitativno. Ukoliko se u krivulji vrškova dobiju dva vrška može se reći da je nakon početnog pada fuorescencije došlo do njezinog ponovnog porasta, odnosno da je došlo do proboja novog kvazispjecijesa te da se radi o heterogenijem obliku kvazispjecijesa, grafikon 5.

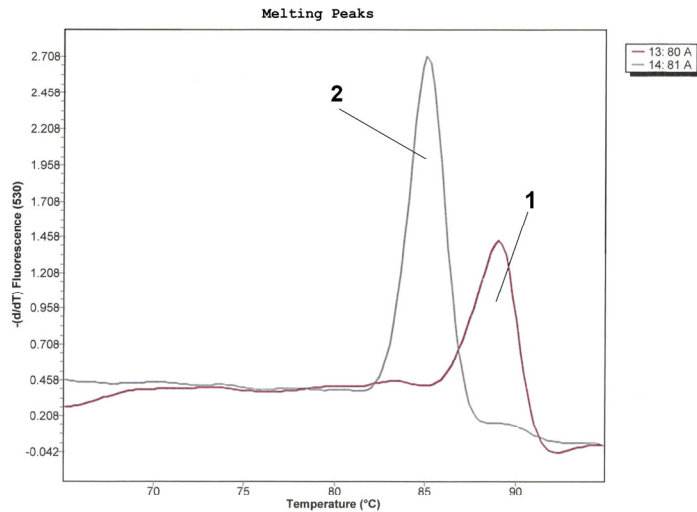
Grafikon 5. Vrškovi taljenja heterogenijeg i homogenijeg kvazispjecijesa (82A i 83A) (bazalni i parni uzorak 1 ispitanika, bez terapije)



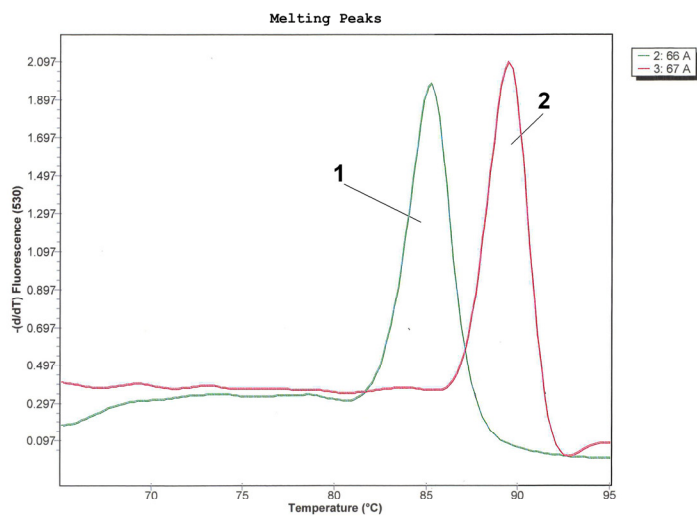
Kada dođe do pomaka može se reći da su se kvazispjecijesi primarno kvalitativno promijenili ali je vrlo vjerojatno došlo i do kvantitativnih promjena. Dakle

došlo je do pomaka početne i završne temperature taljenja ali i  $T_m$ , grafikoni 6 (pomak u lijevo) i grafikon 7 (pomak u desno).

Grafikon 6. Vrškovi taljenja s pomakom ulijevo (80A i 81A) (bazalni i parni uzorak 1 ispitanika, bez terapije)

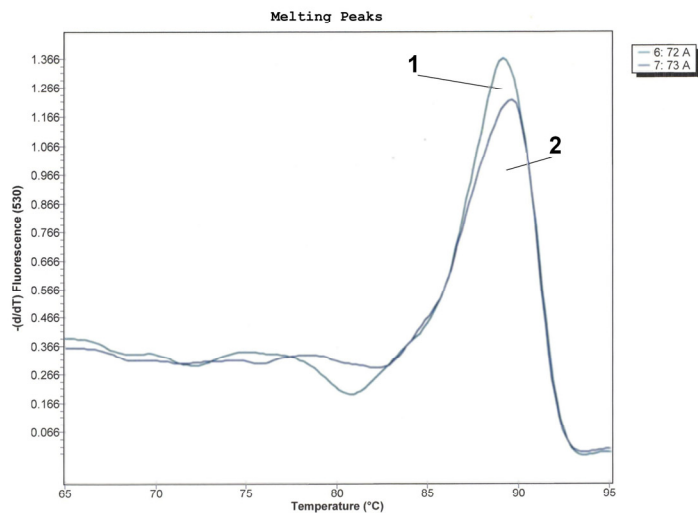


Grafikon 7. Vrškovi taljenja s pomakom u desno (66A i 67A) (bazalni i parni uzorak 1 ispitanika, bez terapije)



Moguća je i varijanta bez pomaka u širini kroz vrijeme, ali, kako je ranije rečeno uvijek se registrira barem minimalna promjena, grafikon 8.

Grafikon 8. Vrškovi taljenja bez značajnijeg pomaka u  $T_m$  (72A i 73A) (bazalni i parni uzorak 1 ispitanika, bez terapije)





### 3.2.4. Patohistološka analiza

Tablica 1. Ocjena stupnja histološke aktivnosti i stadija KHC, Ishak sistem (82).

STUPANJ AKTIVNOSTI		
Periportalne i periseptalne piecemeal nekroze	Odsutne	0
	Fokalne, neki p.p.*	1
	Fokalne, većina p.p.	2
	Kontinuirane u <50% p.p.	3
	Kontinuirane u >50% p.p.	4
Konfluirajuće i premoštavajuće nekroze	Odsutne	0
	Fokalne konfluirajuće nekroze	1
	Konfluirajuće nekroze oko nekih centralnih vena	2
	Konfluirajuće nekroze oko većine centralnih vena	3
	Mjestimične portocentralne premoštavajuće nekroze	4
	Multiple premoštavajuće nekroze	5
	Multilobularne nekroze	6
Fokalne nekroze, apoptoza, žarišna upala	Odsutne	0
	1 žarište	1
	2-4 žarišta	2
	50-10 žarišta	3
	Više od 10 žarišta	4
Portalna upala	Odsutna	0
	Oskudna	1
	Umjerena	2
	Umjerena/obilna u svim p.p.	3
	Obilna u svim p.p.	4
<b>Maksimum bodova</b>		<b>18</b>
STADIJ		
Bez fibroze		0
Fibroza nekih p.p.		1
Fibroza većine p.p.		2
Fibroza većine p.p. s mjestimičnim portoportalnim vezivnim septima		3
Fibroza p.p. s obilnim portoportalnim i portocentralnim vezivnim septima		4
Obilna vezivna septa s mjestimičnim regenerativnim čvorićima (nekompletna ciroza)		5
Ciroza (vjerojatna ili sigurna)		6
<b>Maksimum bodova</b>		<b>6</b>

\*p.p. = portalni prostori

U određivanje stupnja aktivnosti uvrštene su, svaka za sebe, sve nekroinflamatorne lezije za koje se misli da pridonose razvitku ciroze, a to su:

*piecemeal*-nekroze, konfluirajuće i premoštavajuće nekroze, fokalne nekroze i apoptoza te portalni upalni infiltrat. Pri određivanju stadija analiziraju se fibroza i poremećaj arhitekture.

### **3.3. Statističke metode**

Točnost vrijednosti koje odstupaju od ostatka distribucije (izuzeci, *engl. „outlier“*) provjerene su za moguću grešku pri unosu. Obrada podataka učinjena je s izuzecima i bez njih. Kod dobivenih značajnih razlika njihov utjecaj je neutraliziran bilo transformacijom bilo korištenjem neparametrijskih testova.

Numeričke varijable opisane su centralnom vrijednosti i mjerom raspršenosti što je uvjetovano distribucijom podataka (srednja vrijednost i standardna devijacija,  $X \pm SD$  ili medijan i interkvartilni raspon). Učestalosti su prikazane odgovarajućim granicama pouzdanosti. Distribucije su prikazane grafički i tablično.

Numeričke varijable testirane su na normalnost raspodjele Kolmogor-Smirnovim testom i na homogenost varijance Leveneovim testom. Za testiranje razlika između grupa korišteni su parametrijski testovi (t-test, ANOVA i drugi) u slučaju normalne raspodjele ili homogenosti varijance. U slučaju odstupanja od normalne raspodjele koristili su se neparametrijski testovi (Mann-Whitney U ili Kruskal-Walis).

Za usporedbu nominalnih kategorijskih varijabli korišten je Hi-kvadrat test ili Fisher-ov egzaktni test, a za ordinalne Mann-Whitney U ili Kruskal-Walis test.

Za testiranje hipoteze koristio se dvosmjerni t-test za zavisne uzorke u slučaju normalne distribucije, a u slučaju odstupanja od normalne distribucije Wilcoxon rank sum test za zavisne uzorke. Razina statističke značajnosti postavljena je na 0,05 (5%) dok je razina statističke značajnosti između 0,05 i 0,1 (5-10%) označena kao granična.

Obrada podataka učinjena je programskim paketom SPSS ver.14 (licenca HZJZ).

#### **4. REZULTATI**

U disertaciji su analizirani HCV kvazispecijesi novom metodom taljenja DNK visoke rezolucije. Konačni proizvod metode prikazuje kvazispecijese kao skup temperatura taljenja spojenih u krivulju („*melting curve*“). Derivacijom krivulje taljenja dobije se krivulja sa vrškom temperature taljenja („*melting peak*“). Brojčano se rezultat prikazuje s 4 parametra:

- **T<sub>m</sub>**
- **W**
- **H**
- **A**

U prvom dijelu disertacije prikazani su parametri kvazispecijesa u bazalnom uzorku (T<sub>m1</sub>, W<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>) dobivenom u trenutku postavljanja dijagnoze. Svaki parametar analiziran je za cijelu grupu a potom obrađen na ovisnost prema: demografskim osobinama ispitanika (dob, spol), biokemijskoj aktivnosti bolesti (aminotransferaze), patohistološkom oštećenju (histološka aktivnost i fibroza), genotipu virusa i viremiji. Na kraju se odredila predikcija parametara kvazispecijesa u odnosu na nepovoljan učinak liječenja (nesposobnost eliminacije virusa).

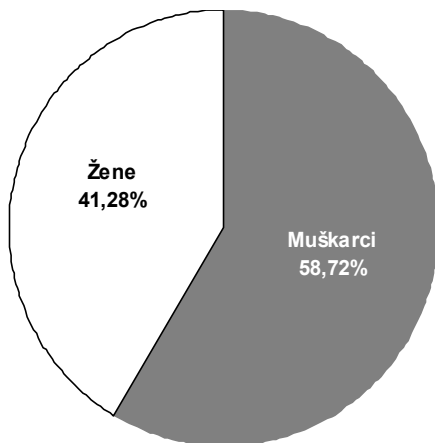
U drugom dijelu analizirane su promjene parametara kvazispecijesa u parnom uzorku (T<sub>m2</sub>, W<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>) ispitanika te time odredila njihova dinamika kao i klinička važnost.

#### 4.1. Osnovne karakteristike ispitanika

U prvi dio istraživanja uključeno je 109 ispitanika. Prikazane su samo osnovne deskriptivne varijable ispitanika i to one koje su ispitivane u odnosu na kliničku značajnost kvazispecijesa.

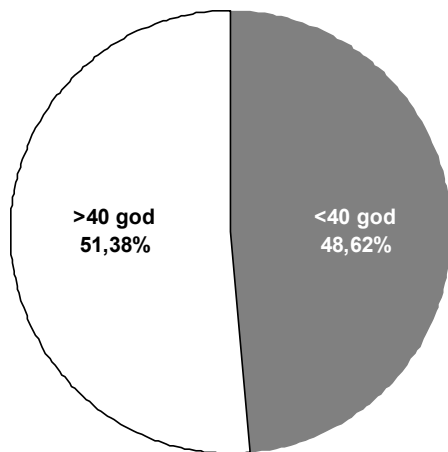
Prema spolu ispitanika nešto više ima muškaraca, grafikon 9.

Grafikon 9. Podjela ispitanika prema spolu.



Svi ispitanici su punoljetni, raspona dobi od 18 do 71 godinu. Omjer mlađih i starijih od 40 godina približno je isti. Dob od 40 godina uobičajeno se uzima kao granična starosna dob u kroničnih bolesti jetre, grafikon 10.

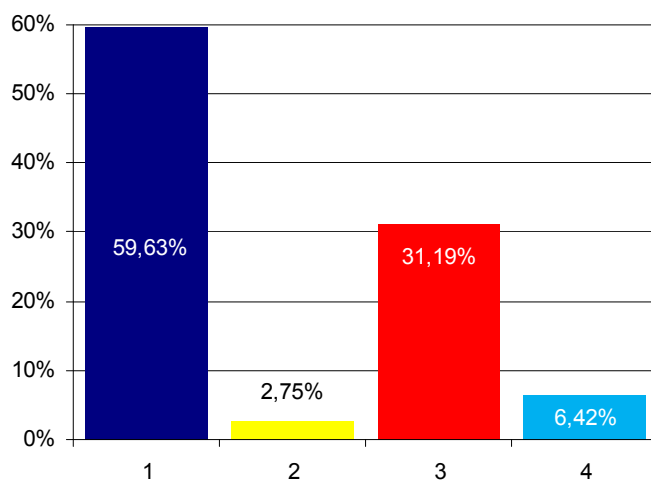
Grafikon 10. Podjela ispitanika prema dobi.



Svim ispitanicima je u trenutku postavljanja dijagnoze određen genotip virusa, viremija, biokemijska aktivnost bolesti te biopsijom jetre procijenjena patohistološka aktivnost i stadij fibroze.

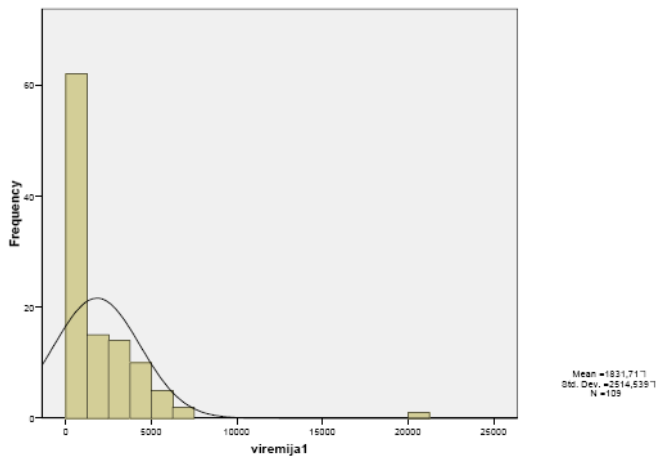
Prema učestalosti najviše bolesnika ima virus **genotipa** 1, slijedi genotip 3, potom genotip 4 i na kraju genotip 2, grafikon 11.

Grafikon 11. Radzioba ispitanika prema genotipu.



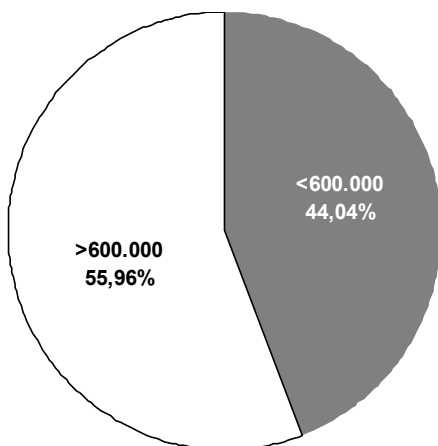
**Viremija** je odstupala od normalne distribucije (Kolmogorov-Smirnov test  $p < 0,001$ ), median viremije iznosi  $713,00 \times 10^3$  IU/mL seruma (min  $8 \times 10^3$ ; max  $20800 \times 10^3$  IU/mL). U ispitivanoj grupi postoji jedan rezultat koji značajno odstupa u vrijednosti („outlier“) te su kasnije usporedbe vršene sa i bez njega, grafikon 12.

Grafikon 12. Distribucija viremije ispitanika.



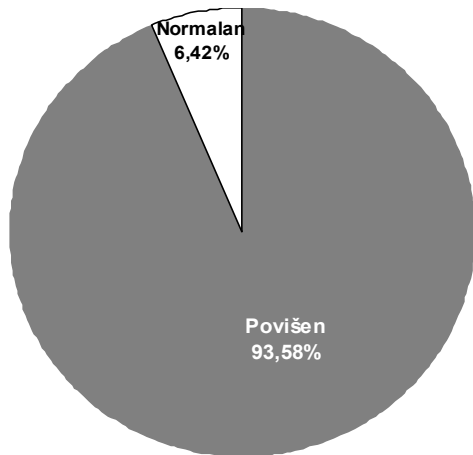
Udio ispitanika s nižom viremijom ( $< 600 \times 10^3$  IU/mL) nešto je manji (48/109, 44%) u odnosu na udio bolesnika s višom viremijom (61/109, 56%), grafikon 13.

Grafikon 13. Radzioba ispitanika prema viremiji.

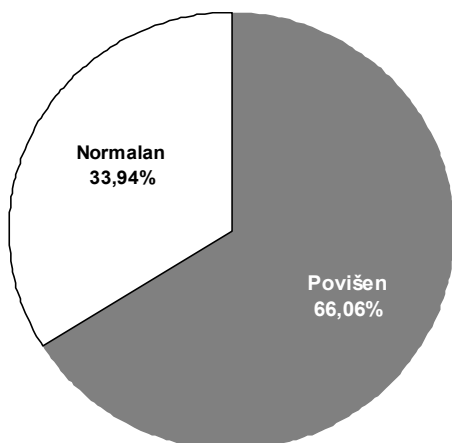


U samom početku liječenje bolesnika s KHC bilo je indicirano samo u onih s patološkim **aminotransferazama**. No, sada se zna da normalnu vrijednost aminotransferaza može imati čak trećina oboljelih. U ovoj ispitivanoj grupi udio njih s normalnim aminotransferazama razlikuje se za ALT i AST. Velika većina ispitanika ima ALT veći od gornje granice normale (102/109, 93,6%), dok trećina ispitanika ima normalan AST (37/109, 33,9%), grafikon 14a i 14b.

Grafikon 14a. Razdioba ispitanika prema vrijednosti ALT-a.



Grafikon 14b. Razdioba ispitanika prema vrijednosti AST-a.

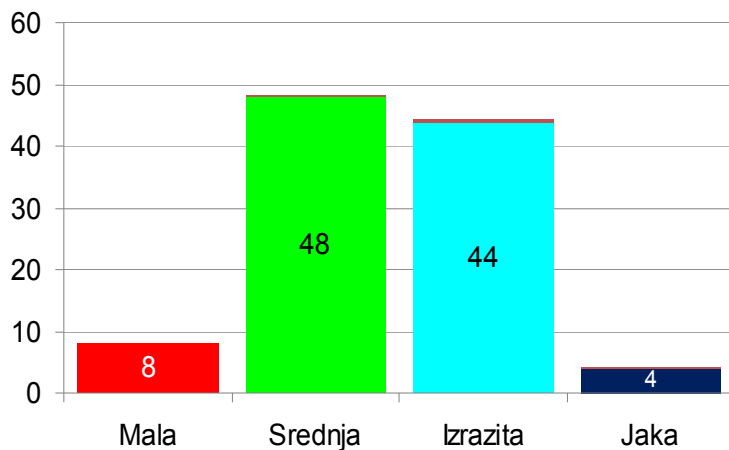




Biopsija jetre učinjena je u 104 ispitanika, kod njih petero je postojala kontraindikacija za izvođenje invazivne dijagnostičke metode zbog nasljednog poremećaja zgrušavanja krvi (hemofilija).

Prema **stupnju histološke aktivnosti**, određeno prema Ishakovom modelu (od 1 do 18) a izraženo opisno: nema ispitanika s **odsutnom aktivnosti** (0); udio ispitanika s **malom aktivnosti** (1-4) iznosi 7,60%; udio sa **srednjom aktivnosti** (5-9) iznosi 46,20%; udio s **izrazitom aktivnosti** (10-14) iznosi 42,30% dok je udio ispitanika s **jakom aktivnosti** (15-18) mali, 3,80%, grafikon 15.

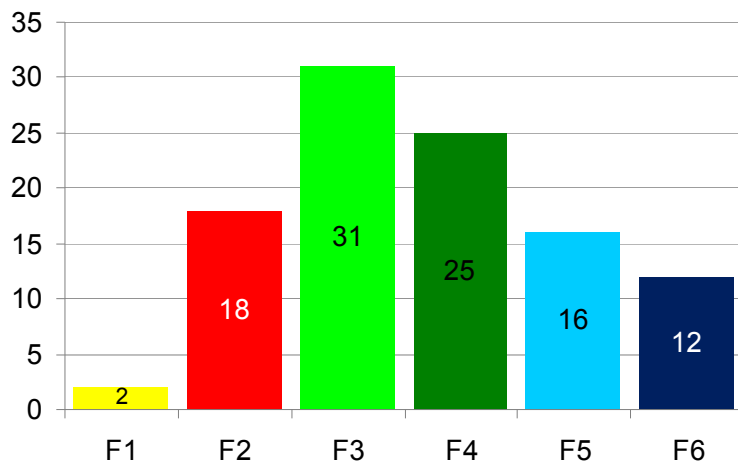
Grafikon 15. Razdioba ispitanika prema histološkoj aktivnosti.



Stadij bolesti, odnosno **fibroza** jedan je od prediktora procjene dužine trajanja ali i težine bolesti. Bolesnici s jače izraženom fibrozom klinički se nalaze u predstadiju ciroze (fibroza 5 i 6), njihova bolest traje dulje ili imaju agresivniji oblik

infekcije (primjerice agresivniji kvazispecijesi). Prema stadiju, u ispitivanoj skupini, najviše ih ima srednji stadij fibroze (3 i 4 = 53,80%), grafikon 16.

Grafikon 16. Razdioba ispitanika prema fibrozi.



## **4.2. BAZALNI HCV kvazispecijesi**

### **4.2.1. Parametri bazalnih kvazispecijesa**

HCV kvazispecijese bolesnika s KHC u jednoj točki određuje  $T_m$ ,  $H$  i  $W$ , dok je  $A$  površina dobivena iz  $H$  i  $W$  u točki  $T_m$ .

U tablici 2 vidi se da je distribucija (Kolmogorov-Smirnov test) normalna za Tm1 (p=0,221), W1 (p= 0,663) i H1 (p= 0,326) dok A1 nema normalnu distribuciju (p= 0,006), tablica 3.

Tablica 2. Distribucija Tm1, W1 i H1 za sve ispitanike.

	Tm1	W1	H1
Broj uzoraka	109	109	109
Kolmogorov-Smirnov Z	1,049	0,729	0,951
P	0,221	0,663	0,326
X±SD	86,88±2,11	3,38±1,15	1,64±0,74
<b>Raspon</b>	<b>10,69</b>	<b>6,03</b>	<b>3,05</b>
percentili	25	85,61	2,40
	50	87,18	3,31
	75	88,48	4,37

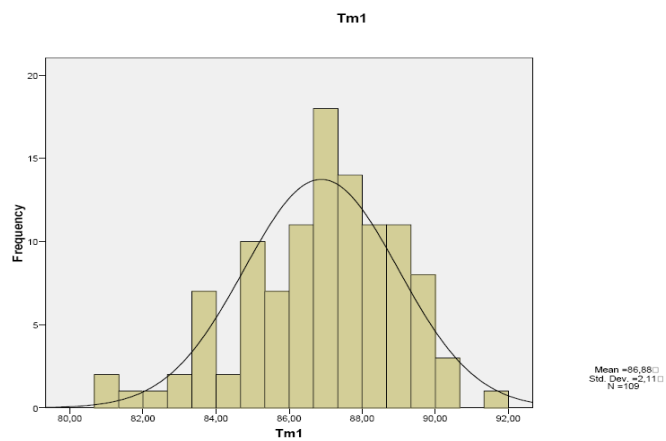
Tablica 3. Distribucija A1 za sve ispitanike

	A1	
Broj uzoraka	109	
Kolmogorov-Smirnov Z	1,707	
P	0,006	
Median	4,52	
<b>Raspon</b>	<b>5,99</b>	
Minimum	0,46	
Maksimum	6,45	
percentili	25	85,61
	50	87,18
	75	88,48

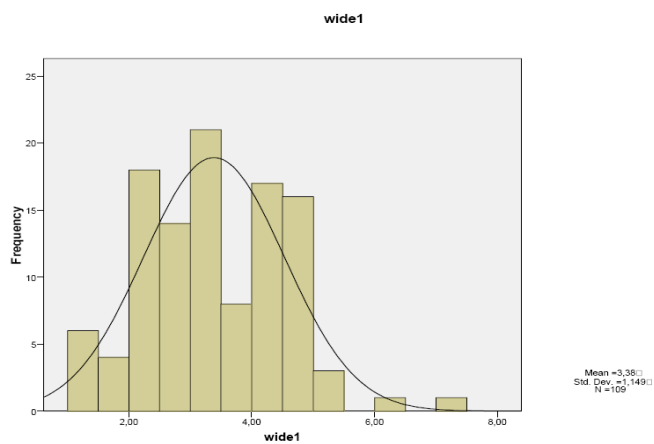
Iz histograma distribucije parametara (Tm1, W1, H1 i A1 HCV) kvazispicijesa svih 109 ispitanika (Grafikoni 17-20), jasno je vidljiva njihova različitost jer postoje veliki rasponi za sve parametre, usprkos tome što su standardnom genotipizacijom svrstani samo u 4 različita genotipa (od 1 do 4). Ova činjenica posebno dobiva na

značajnosti kada se uzme u obzir da 90,80% ispitanika ima samo 2 genotipa (genotip 1 i 3). Metoda taljenja DNK visokom rezolucijom može razlikovati različite genotipove pri temperaturnoj razlici od samo 1°C.

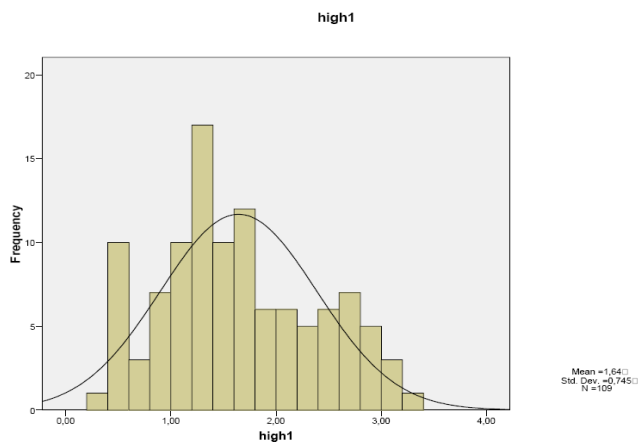
Grafikon 17. Distribucija Tm1.



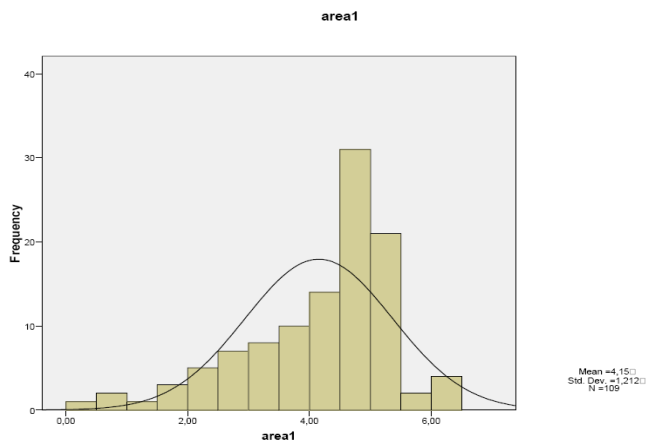
Grafikon 18. Distribucija W1.



Grafikon 19. Distribucija H1.



Grafikon 20. Distribucija A1.



Obzirom na ovako veliku raspršenost bazalnih parametara cjelokupne grupe ispitanika promatrana je razlika parametara kvazispacijesa unutar skupine bolesnika istog genotipa dobivenog standardnom genotipizacijom. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablicama od 4 do 7.

Tablica 4. Razlika Tm1 prema genotipovima

Genotip		1	2	3	4
Broj uzoraka		65	3	34	7
X±SD		87,31±1,87	85,96±5,35	86,44±1,72	85,36±3,29
Median		87,54	85,68	86,99	84,00
<b>Raspon</b>		<b>9,25</b>	<b>10,69</b>	<b>6,74</b>	<b>8,14</b>
Minimum		81,10	80,75	82,78	81,97
Maksimum		90,35	91,44	89,52	90,11
percentili	25	86,16	80,75	85,38	82,20
	50	87,54	85,68	87,00	84,00
	75	88,74	91,44	87,36	89,41
<b>p</b>		<b>0,054</b>			

Tablica 5. Razlika W1 prema genotipovima

Genotip		1	2	3	4
Broj uzoraka		65	3	34	7
X±SD		3,35±1,20	3,72±0,94	3,49±1,09	3,11±1,18
Median		3,24	3,35	3,62	2,95
<b>Raspon</b>		<b>6,00</b>	<b>1,76</b>	<b>3,89</b>	<b>3,08</b>
Minimum		1,40	3,02	1,37	1,38
Maksimum		7,40	4,78	5,26	4,46
percentili	25	2,35	3,02	2,52	1,96
	50	3,24	3,35	3,62	2,95
	75	4,40	4,78	4,33	4,38
<b>p</b>		<b>0,681</b>			

Tablica 6. Razlika H1 prema genotipovima

Genotip		1	2	3	4
Broj uzoraka		65	3	34	7
X±SD		1,63±0,68	1,54±1,29	1,81±0,80	1,05±0,64
Median		1,58	1,05	1,71	0,84
<b>Raspon</b>		<b>2,68</b>	<b>2,43</b>	<b>2,87</b>	<b>1,79</b>
Minimum		0,32	0,58	0,50	0,58
Maksimum		3,00	3,01	3,37	2,37
percentili	25	1,19	0,58	1,22	0,59
	50	1,58	1,05	1,71	0,84
	75	2,09	3,01	2,57	1,34
<b>p</b>		<b>0,096</b>			

Tablica 7. Razlika A1 prema genotipovima

Genotip		1	2	3	4
Broj uzoraka		65	3	34	7
X±SD		4,25±1,16	3,24±1,97	4,31±1,13	2,84±1,00
Median		4,57	2,91	4,68	2,65
<b>Raspon</b>		<b>5,99</b>	<b>3,90</b>	<b>4,00</b>	<b>3,00</b>
Minumum		0,46	1,45	2,21	1,69
Maksimum		6,45	5,35	6,21	4,69
percentili	25	4,07	1,45	3,48	2,16
	50	4,57	2,91	4,69	2,65
	75	5,00	5,35	5,07	3,55
<b>p</b>		<b>0,023</b>			

Različitošću među genotipovima na granici je statističke značajnosti za Tm1 ( $p=0,054$ ) što govori u prilog tome da metoda može prepoznati različite genotipove dobivene standardnom genotipizacijom. Nadalje, granična statistička značajnost dobivena je i za H1 ( $p=0,096$ ) što ukazuje da se genotipovi razlikuju prema jakosti fluorescencije u ovoj metodi. Za W1 kvazispicijesa nije dobivena statistički značajna razlika među genotipovima ( $p=0,681$ ). Za A1 je dobivena značajna statistička razlika među genotipovima ( $p=0,023$ ). Ako uzmemo u obzir da A određuje W i H može se zaključiti da statističkoj značajnosti A daje H više od W. Uzevši u obzir da H određuje jakost promjena u Tm, ukoliko postoji veća fluorescencija u Tm dolazi do denaturacije veće količine DNK.

#### 4.2.2. Usporedba parametara bazalnih kvazispacijesa i varijabli ispitanika

Svaki parametar kvazispacijesa ispitan je u odnosu na poznate varijable ispitanika (demografske, biokemijske, virusne i histološke).

##### 4.2.2.1. Kvazispacijesi i demografske varijable ispitanika

**Kvazispacijesi i spol (tablica 8).** Značajnost razlike prema spolu statistički je granično dobivena za Tm1 (Mann-Whitney 1133,  $p = 0,059$ ). Žene imaju tendenciju višim Tm1. Nema statistički značajne razlike između ostalih parametara i spola: W1 (Mann-Whitney 1352,  $p = 0,586$ ), H1 (Mann-Whitney 1435,  $p = 0,973$ ) te A1 (Mann-Whitney 1435,  $p = 0,975$ ).

Tablica 8. Kvazispacijesi i spol.

Mean rank	Tm1	W1	H1	A1
Muškarci	50,21	56,38	55,09	54,92
Žene	61,81	53,03	54,88	55,10
P	0,059	0,586	0,973	0,975

**Kvazispacijesi i dob.** Za A1 i H1 nije dobivena statistički značajna korelacija s dobi (A1 = Spearman 0,081,  $p = 0,404$ ; H1 = Spearman -0,095,  $p = 0,327$ ). Granično značajna korelacija dobivena je za W1 (Spearman -0,160,  $p = 0,096$ ) dok Tm1 značajno korelira s dobi (Spearman 0,225,  $p = 0,019$ ). Korelacija s W1 i H1 je



obrnuto proporcionalna dok je za Tm1 i A1 proporcionalna. Zaključak je da je u starijih uži W1 i niži H1, dok je Tm1 viši a A1 veća.

#### 4.2.2.2. Kvazispecijesi i biokemijska aktivnost bolesti

**Kvazispecijesi i ALT (tablica 9).** Niti jedan parametar kvazispecijesa se nije značajno razlikovao u grupi s normalnim i patološkim ALT-om. Dobivene vrijednosti su kako slijedi: Tm1 ( $t= 1,32$ , d.f. 107,  $p= 0,190$ ), W1 ( $t= -0,41$ , d.f. 107,  $p= 0,682$ ), H1 ( $t= -1,38$ , d.f.107,  $p= 0,171$ ) te za A1 (Mann-Whitney 313,  $p= 0,587$ ). Skupina s patološkim ALT-om imala je veći W1, H1 i A1 dok je Tm1 bio manji u odnosu na skupinu s normalnim ALT-om.

Tablica 9. Kvazispecijesi i ALT.

Mean	Tm1	W1	H1	A1
Normalan	87,89	3,21	1,27	48,71
Povišen	86,80	3,39	1,66	55,43
P	0,190	0,682	0,171	0,587

**Kvazispecijesi i AST (tablica 10).** Niti u korelaciji s normalnim i patološkim AST-om nije dobivena statistički značajna razlika u parametrima kvazispecijesa: Tm1 ( $t= -0,257$ , d.f. 107,  $p= 0,798$ ), W1 ( $t= 1,05$ , d.f. 107,  $p= 0,296$ ), H1 ( $t= -1,34$ , d.f.107,  $p= 0,183$ ) te za A1 (Mann-Whitney 1099,  $p= 0,135$ ). Tm1 je za obje skupine bio gotovo identičan. H1 i A1 bio je veći a W1 manji u skupini s patološkim AST-om.

Tablica 10. Kvazispecijesi i AST.

Mean	Tm1	W1	H1	A1
Normalan	86,81	3,55	1,51	48,69
Povišen	86,92	3,30	1,71	58,24
P	0,798	0,296	0,183	0,135

#### 4.2.2.3. Kvazispecijesi i virusne karakteristike

**Kvazispecijesi i genotip.** Usporedivši parametre kvazispecijesa među genotipovima granična statistička značajnost dobivena je za Tm1 (Kruskal-Wallis 7,64, d.f. 3,  $p = 0,054$ ) i H1 (Kruskal-Wallis 6,34, d.f. 3,  $p = 0,096$ ) dok je A1 statistički značajno različita prema genotipovima (Kruskal-Wallis 9,53, d.f. 3,  $p = 0,023$ ). Ovime je dokazano da se radi o različitim genotipovima primarno stoga što postoji razlika u Tm1. Nije dobivena statistički značajna razlika za W1 (Kruskal-Wallis 1,51, d.f. 3,  $p = 0,681$ ).

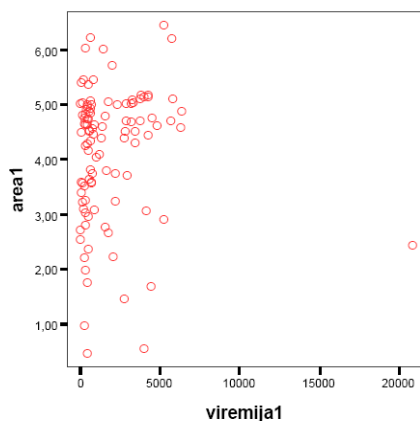
U tablici 11. Vidi se da genotip 1 ima najvišu Tm1, genotip 2 najveću W1 a genotip 3 najveću H1 i A1.

Tablica 11. Kvazispecijesi i genotip.

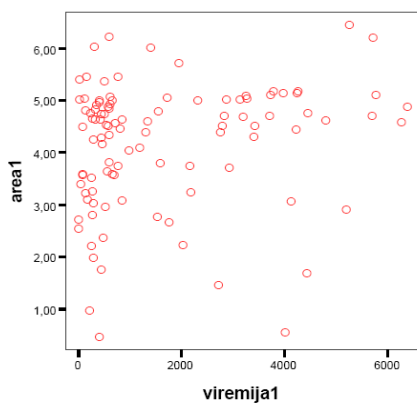
Mean rank	Tm1	W1	H1	A1
Genotip 1 (N = 65)	61,73	53,34	54,93	57,15
Genotip 2 (N = 3)	46,33	66,50	46,17	40,67
Genotip 3 (N = 34)	46,25	58,79	61,28	59,12
Genotip 4 (N = 7)	38,71	47,07	28,93	21,14
<b>P</b>	<b>0,054</b>	<b>0,681</b>	<b>0,096</b>	<b>0,023</b>

**Kvazispecijesi i viremija.** Statistički granična značajnost dobije se za A1 i viremiju (Spearman 0,172,  $p = 0,074$ ) za svih 109 ispitanika. Uklanjanjem uzorka koji značajno odstupa u ispitivanoj skupini, korelacija A1 i viremije postaje statistički značajna (Spearman 0,199,  $p = 0,039$ ). Korelacija je proporcionalna što znači da je A veća pri višoj viremiji. Za ostale varijable nije dobivena statistički značajna razlika: Tm1 (Spearman 0,118,  $p = 0,225$ ), W1 (Spearman -0,24,  $p = 0,805$ ), H1 (Spearman 0,091,  $p = 0,351$ ). Korelacija Tm1 i H1 je proporcionalna s viremijom dok je obrnuto proporcionalna s W1. U dot-plot grafikonu 21a i 21b vidljivo je nešto jače grupiranje rezultata A1 između 3,00 i 5,00 u niskim viremijama.

Grafikon 21a. Grupiranje A1 prema viremiji (s uzorkom koji odstupa).



Grafikon 21b. Grupiranje A1 prema viremiji (bez uzorka koji odstupa).



#### 4.2.2.4. Kvazispecijesi i histološko oštećenje

**Kvazispecijesi i histološka aktivnost.** Nije dobivena statistička značajna razlika u ispitivanoj grupi. Rezultati su slijedeći: Tm1 (Kruskal-Wallis 15,88, d.f. 12, p = 0,197); W1 (Kruskal-Wallis 11,22, d.f. 12, p = 0,510), H1 (Kruskal-Wallis 13,75, d.f. 12, p = 0,317) te A1 (Kruskal-Wallis 16,87, d.f. 12, p = 0,155).

**Kvazispecijesi i fibroza.** Statistički značajna razlika dobivena je za H1 (Kruskal-Wallis 11,28, d.f. 5, p = 0,046). Nije dobivena statistička značajna razlika za ostale parametre kvazispecijesa: Tm1 (Kruskal-Wallis 7,79, d.f. 5, p = 0,168), W1 (Kruskal-Wallis 7,63, d.f. 5, p = 0,178) i A1 (Kruskal-Wallis 6,91, d.f. 5, p = 0,227).

#### 4.2.3. *Klinička primjena određivanja parametara kvazispecijesa u jednoj točki (bazalnom vremenu)*

##### 4.2.3.1. Kvazispecijesi i ETVR

Ispitivana je sposobnost predikcije pojedinih parametara kvazispecijesa za nepovoljan terapijski učinak, odnosno ne postizanje ETVR. Tek granična statistička značajnost dobivena je za A1 i ETVR.

Odnos **Tm1 i ETVR** je pozitivan ( $OR > 1$ ) što znači da je veća vjerojatnost ne postizanja ETVR ukoliko je Tm1 veća. U ispitivanoj grupi nije dobivena statistički značajna razlika, tablica 12.

Tablica 12. Tm1 i ETVR

ETVR	<b>OR</b>	Standardna greška	z	<b>p</b>	95%CI
Tm1	<b>1,071</b>	0,105	0,700	<b>0,484</b>	0,883-1,298

Odnos **H1 i ETVR** također je pozitivan ( $OR > 1$ ) što znači da je veća vjerojatnost ne postizanja ETVR ukoliko je H1 veća. Dobivena jakost povezanosti (OR) nije bila statistički značajna, tablica 13.

Tablica 13. H1 i ETVR

ETVR	<b>OR</b>	Standardna greška	z	<b>p</b>	95%CI
H1	<b>1,268</b>	0,345	0,870	<b>0,383</b>	0,743-2,165

Odnos između **W1 i ETVR**, suprotno ranijem, je negativan ( $OR < 1$ ) što znači da je veća vjerojatnost ne postizanja ETVR ukoliko je W uža. U ispitivanoj grupi dobivena jakost povezanosti (OR) nije bila statistički značajna, tablica 14.

Tablica 14. W1 i ETVR

ETVR	<b>OR</b>	Standardna greška	z	<b>p</b>	95%CI
W1	<b>0,939</b>	0,167	-0,350	<b>0,728</b>	0,663-1,331

Ispitivanjem odnosa statistički granična značajnost u ispitivanoj grupi dobivena je samo za **A1 i ETVR**, tablica 15. Odnos između A1 i ETVR je pozitivan ( $OR > 1$ ) što

znači da što je veća površina kvazispecijesa veća je vjerojatnost ne postizanja ETVR.

Površinu određuje H i W u Tm.

Tablica 15. A1 i ETVR

ETVR	OR	Standardna greška	z	p	95%CI
A1	<b>1,355</b>	0,251	1,640	<b>0,101</b>	0,941-1,949

#### 4.2.3.2. Kvazispecijesi i SVR

Terapijski cilj svakog protokola liječenja je eliminacija virusa ali i održavanje stanja nepostojanja virusa u krvi minimalno 6 mjeseci nakon prekinutog liječenja. Stoga su bazalne varijable kvazispecijesa ispitivane i na mogućnost predikcije ne postizanja SVR. U ovoj fazi jasna statistički značajna razlika u ispitivanoj grupi dobivena je, a time i potvrđena, za A1.

Odnos **Tm1 i SVR** potvrđeno je pozitivan ( $OR > 1$ ) no u ispitivanoj grupi nije dobivena statistička značajnost, iako je ona u odnosu na ETVR bliže statističkoj značajnosti, tablica 16.

Tablica 16. Tm1 i SVR

SVR	OR	Standardna greška	z	p	95%CI
Tm1	<b>1,104</b>	0,102	1,070	<b>0,286</b>	0,920-1,325

Odnos **H1 i SVR** opetovano je pozitivan ( $OR > 1$ ). Jakost povezanosti nije statistički značajna u ispitivanoj grupi. U odnosu na ETVR jakost povezanosti H1 i SVR je bliže statističkoj značajnosti, tablica 17.

Tablica 17. H1 i SVR

SVR	OR	Standardna greška	z	p	95%CI
H1	<b>1,360</b>	0,356	0,170	<b>0,240</b>	0,813-2,273

Odnos između **W1 i SVR**, potvrđeno je negativan ( $OR < 1$ ) ali niti za ovaj parametar nije dobivena statistička značajnost u ispitivanoj grupi, iako je u odnosu na ETVR ona bliže statističkoj značajnosti, tablica 18.

Tablica 18. W1 i SVR

SVR	OR	Standardna greška	z	p	95%CI
W1	<b>0,930</b>	0,156	-0,430	<b>0,670</b>	0,669-1,294

Odnos **A1 i SVR** također je pozitivan ( $OR > 1$ ). Dobivena je statistički značajna razlika između te dvije varijable, tablica 19.

Tablica 19. A1 i SVR

SVR	OR	Standardna greška	z	p	95%CI
A1	<b>1,449</b>	0,252	2,130	<b>0,033</b>	1,030-2,038

### 4.3. *PARNI kvazispicijesi*

Promjena parametara kvazispicijesa ispitivana je u parnom serumu. Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe:

- **Grupa 1 = 40** neliječenih ispitanika u kojih je praćeno kako varijabla „vrijeme“ utjeće na promjenu kvazispicijesa. Drugi uzorak uzet je 6 mjeseci od postavljanja dijagnoze.
- **Grupa 2 = 69** ispitanika je lijećeno. Drugi uzorak bilo je moguće uzeti samo onim pojedincima koji nisu postigli ETVR, odnosno samo u onih kojima je HCV RNK bio mjerljiv na kraju lijećenja te je u ovoj grupi bilo moguće dobiti samo 24 uzorka.

#### 4.3.1. *Parametri parnih kvazispicijesa*

Opis parametara krivulja taljenja učinjen je prema genotipovima.

**Za grupu 1** prikazan je u tablicama od 20 do 23. Usporedbom se gube razlike među genotipovima (u odnosu na dobivene razlike parametara bazalnih uzoraka) najvjerojatnije zbog velićine uzorka (40 ispitanika). Granićna statistića znaćajnost ostaje samo za A2 (Kruskal-Wallis 4,94, d.f. 2,  $p = 0,085$ ).



Tablica 20. Razlika Tm2 prema genotipovima u **grupi 1**

Genotip		1	3	4
Broj uzoraka		23	14	3
X±SD		87,60±2,43	86,92±1,40	86,03±4,07
Median		88,67	87,03	86,00
<b>Raspon</b>		<b>9,25</b>	<b>5,92</b>	<b>8,14</b>
Minumum		81,10	83,60	81,97
Maksimum		90,35	89,52	90,11
percentili	25	85,90	86,29	81,97
	50	88,66	87,03	86,00
	75	89,43	87,51	90,11
<b>p</b>		<b>0,327</b>		

Tablica 21. Razlika W2 prema genotipovima u **grupi 1**

Genotip		1	3	4
Broj uzoraka		23	14	3
X±SD		3,61±1,34	3,53±1,32	2,87±1,50
Median		3,73	3,98	2,85
<b>Raspon</b>		<b>6,00</b>	<b>3,89</b>	<b>3,00</b>
Minumum		1,40	1,37	1,38
Maksimum		7,40	5,26	4,38
Percentil	25	2,82	2,23	1,38
	50	3,73	3,98	2,85
	75	4,33	4,54	4,38
<b>p</b>		<b>0,709</b>		

Tablica 22. Razlika H2 prema genotipovima u **grupi 1**

Genotip		1	3	4
Broj uzoraka		23	14	3
X±SD		1,55±0,78	1,98±0,89	1,18±1,03
Median		1,39	2,15	0,59
<b>Raspon</b>		<b>2,73</b>	<b>2,51</b>	<b>1,79</b>
Minumum		0,37	0,57	0,58
Maksimum		3,10	3,08	2,37
percentili	25	0,84	1,22	0,58
	50	1,39	2,15	0,59
	75	2,29	2,91	2,37
<b>p</b>		<b>0,225</b>		

Tablica 23. Razlika A2 prema genotipovima u **grupi 1**

Genotip		1	3	4
Broj uzoraka		23	14	3
X±SD		3,79±1,43	4,65±0,89	3,31±1,51
Median		4,46	4,90	3,55
<b>Raspon</b>		<b>4,76</b>	<b>2,78</b>	<b>3,00</b>
Minumum		0,55	3,24	1,69
Maksimum		5,31	6,02	4,69
percentili	25	2,76	3,70	1,69
	50	4,46	4,90	3,55
	75	4,83	5,45	4,69
<b>p</b>		<b>0,085</b>		

Opis parametara krivulja taljenja prema genotipovima za **grupu 2** prikazan je u tablicama od 24 do 27. Statistička značajnost razlike među genotipovima također se gubi za sve parametre kvazispecijesa, uključivo i za A2. Opetovano, vjerojatni razlog gubitka značajnosti je u veličini uzorka (24 ispitanika).

Tablica 24. Razlika Tm2 prema genotipovima u **grupi 2**

Genotip		1	3	4
Broj uzoraka		20	3	1
X±SD		87,36±1,94	88,12±2,07	80,19±0,00
Median		87,54	87,45	80,19
<b>Raspon</b>		<b>8,44</b>	<b>3,97</b>	<b>0,00</b>
Minumum		81,95	86,47	80,19
Maksimum		90,39	90,44	80,19
percentili	25	86,73	86,47	80,19
	50	87,54	87,45	80,19
	75	88,90	90,44	80,19
<b>p</b>		<b>0,248</b>		

Tablica 25. Razlika W2 prema genotipovima u **grupi 2**

Genotip		1	3	4
Broj uzoraka		20	3	1
X±SD		2,73±0,64	3,13±1,05	1,12±0,00
Median		2,52	3,07	1,12
<b>Raspon</b>		<b>2,16</b>	<b>1,52</b>	<b>0,00</b>
Minimum		1,98	2,11	1,12
Maksimum		4,14	4,21	1,12
percentili	25	2,18	2,11	1,12
	50	2,52	3,07	1,12
	75	3,12	4,21	1,12
<b>p</b>		<b>0,753</b>		

Tablica 26. Razlika H2 prema genotipovima u **grupi 2**

Genotip		1	3	4
Broj uzoraka		20	3	1
X±SD		1,46±0,68	1,17±0,77	2,67±0,00
Median		1,38	1,30	2,67
<b>Raspon</b>		<b>3,00</b>	<b>1,52</b>	<b>0,00</b>
Minimum		0,16	0,35	2,67
Maksimum		3,16	1,87	2,67
Percentil –	25	1,16	0,35	2,67
	50	1,38	1,30	2,67
	75	1,63	1,87	2,67
<b>p</b>		<b>0,531</b>		

Tablica 27. Razlika A2 prema genotipovima u **grupi 2**

Genotip		1	3	4
Broj uzoraka		20	3	1
X±SD		4,35±1,36	3,63±2,54	3,53±0,00
Median		4,54	5,09	3,53
<b>Raspon</b>		<b>6,36</b>	<b>4,41</b>	<b>0,00</b>
Minimum		0,64	0,70	3,53
Maksimum		7,00	5,11	3,53
Percentil –	25	4,12	0,70	3,53
	50	4,54	5,09	3,53
	75	4,87	5,11	3,53
<b>p</b>		<b>0,543</b>		

#### 4.3.2. Usporedba parametara kvazispjecijesa bazalnog i parnog uzorka

Procjena dinamičnosti kvazispjecijesa ispitana je usporedbom parametara parnog i bazalnog uzorka.

##### Grupa 1.

Tablica 28. Parametri kvazispjecijesa bazalnog i parnog uzorka za grupu 1.

		N	Mean Rank	p
<b>Tm2-Tm1</b>	Negativan	17	19,44	<b>0,285</b>
	Pozitivan	23	21,28	
	Ties	0		
<b>W2-W1</b>	Negativan	18	19,25	<b>0,393</b>
	Pozitivan	22	21,52	
	Ties	0		
<b>H2-H1</b>	Negativan	17	21,79	<b>0,595</b>
	Pozitivan	23	19,54	
	Ties	0		
<b>A2-A1</b>	Negativan	19	21,37	<b>0,823</b>
	Pozitivan	20	18,70	
	Ties	1		

U grupi 1, nije dobivena statistički značajna razlika za niti jedan ispitivani parametar kvazispjecijesa. Ovoj usporedbi bio je cilj procijeniti mijenjanje kvazispjecijesa kroz vrijeme. Dobiveni rezultati jesu:

- **Tm2:Tm1** = Wilcoxon Signed Ranks -1,069; p = 0,285, što znači da se Tm2 nije značajno promijenila;

- **W2:W1** = Wilcoxon Signed Ranks -0,854; p = 0,393, što znači da se W2 nije značajno promijenila;

- **H2:H1** = Wilcoxon Signed Ranks -0,531;  $p = 0,595$ , što znači da se H2 nije značajno promijenila;

- **A2:A1** = Wilcoxon Signed Ranks -0,223;  $p = 0,823$ , što znači da se A2 nije značajno promijenila.

Usporedivši medijane, tablica 29, vidljivo je da je došlo do pomaka u parnom uzorku grupe 1 kako slijedi: A2 se smanjila dok su se Tm2, W2 i H2 povećale.

Tablica 29. Medijani parametara kvazispjecijesa bazalnog i parnog uzorka u grupi 1.

	Uzorak 1	Uzorak 2
Tm	87,11	87,37
W	3,43	3,68
H	1,57	1,67
A	4,50	4,47

## Grupa 2.

Tablica 30. Parametri kvazispjecijesa bazalnog i parnog uzorka za grupu 2.

		N	Mean Rank	p
<b>Tm2-Tm1</b>	Negativan	11	12,82	<b>0,797</b>
	Pozitivan	13	12,23	
	Ties	0		
<b>W2-W1</b>	Negativan	15	13,30	<b>0,061</b>
	Pozitivan	8	9,56	
	Ties	1		
<b>H2-H1</b>	Negativan	15	13,30	<b>0,157</b>
	Pozitivan	9	11,17	
	Ties	0		
<b>A2-A1</b>	Negativan	14	12,32	<b>0,520</b>
	Pozitivan	10	12,75	
	Ties	1		

Za grupu 2 također se ne dobiva statistički značajna razlika za Tm2, H2 i A2, dok je razlika granično značajna za W2. Cilj ove usporedbe bio je usporediti dolazi li do izmjene kvazispacijesa pri intervenciji liječenjem. Dobiveni rezultati jesu:

- **Tm2:Tm1** = Wilcoxon Signed Ranks -0,257; p = 0,797, što znači da se Tm2 nije značajno promijenila tijekom liječenja;
- **W2:W1** = granično značajna razlika (Wilcoxon Signed Ranks -1,871; p = 0,061), što govori da je došlo do značajne promjene W2 pod utjecajem liječenja (u 15 ispitanika širina se smanjila, u 8 povećala dok je u 1 ostala ista);
- **H2:H1** = Wilcoxon Signed Ranks -1,415; p = 0,157, što znači da se H2 nije značajno promijenila tijekom liječenja;
- **A2:A1** = Wilcoxon Signed Ranks -0,643; p = 0,520, što znači da se A2 nije značajno promijenila tijekom liječenja.

Usporedivši medijane, tablica 31, vidljivo je da je došlo do pomaka u parametrima kvazispacijesa parnog uzorka grupe 2 kako slijedi: Tm2 ima tendenciju porasta, dok W2, H2 i A2 imaju tendenciju smanjenja.

Tablica 31. Medijani parametara kvazispacijesa bazalnog i parnog uzorka u grupi 2.

	Uzorak 1	Uzorak 2
Tm	87,18	87,46
W	3,21	2,61
H	1,51	1,33
A	4,56	4,54

#### 4.3.3. Usporedba bazalnih parametara kvazispelijesa prema terapijskom odgovoru

Učinjena je usporedba bazalnih parametara kvazispelijesa prema vrsti postignutog odgovora: grupe „respondera“, „relapsera“ i „nonrespondera“.

Grupa **respondera i nonrespondera** nije se statistički razlikovala u Tm1 ( $t = -0,800$ , d.f. 58,  $p = 0,427$ ), W1 ( $t = 0,971$ , d.f. 58,  $p = 0,336$ ) i H1 ( $t = -1,176$ , d.f. 58,  $p = 0,244$ ). Tm1 i H1 su bile više u grupi nonrespondera dok je W1 bila viša u grupi respondera, tablica 32.

Tablica 32. Usporedba Tm1, W1, H1 između respondera i nonrespondera.

	Terapijski odgovor	N	X	SD	p
Tm1	Responder	36	86,69	2,56	<b>0,427</b>
	Nonresponder	24	87,15	1,29	
W1	Responder	36	3,55	1,34	<b>0,336</b>
	Nonresponder	24	3,24	0,96	
H1	Responder	36	1,53	0,80	<b>0,244</b>
	Nonresponder	24	1,76	0,69	

Statistički značajna razlika između respondera i nonrespondera dobivena je u A1 (Mann-Whitney 265,  $p = 0,012$ ), nonresponderi su imali veću A1, tablica 33.

Tablica 33. Usporedba A1 između respondera i nonrespondera.

	Terapijski odgovor	N	Mean Rank	<b>p</b>
A1	Responder	36	25,86	<b>0,012</b>
	Nonresponder	24	<b>37,46</b>	

Grupa **respondera i relapsera** nije se statistički razlikovala u Tm1 ( $t = -0,437$ , d.f. 43,  $p = 0,665$ ), W1 ( $t = 0,798$ , d.f. 43,  $p = 0,430$ ) i H1 ( $t = -0,545$ , d.f. 43,  $p = 0,589$ ). Tm1 i H1 su bile više u grupi relapsera, a W1 u grupi respondera, tablica 34.

Tablica 34. Usporedba Tm1, W1, H1 između respondera i relapsera.

	Terapijski odgovor	N	X	SD	<b>p</b>
Tm1	Responder	36	86,69	2,56	<b>0,665</b>
	Relapser	9	<b>87,11</b>	2,51	
W1	Responder	36	<b>3,55</b>	1,34	<b>0,430</b>
	Relapser	9	3,15	1,31	
H1	Responder	36	1,53	0,80	<b>0,589</b>
	Relapser	9	<b>1,69</b>	0,76	

Razlika statističke značajnosti je na granici između respondera i relapsera u A1 (Mann-Whitney 101,  $p = 0,086$ ), relapseri su imali veću A1.

Tablica 35. Usporedba A1 između respondera i relapsera.

	Terapijski odgovor	N	Mean Rank	<b>p</b>
A1	Responder	36	21,31	<b>0,086</b>
	Relapseri	9	<b>29,78</b>	



Grupa **nonrespondera i relapsera** statistički se razlikovala u Tm1 ( $t= 0,057$ , d.f. 31,  $p= 0,037$ ) dok je razlika statističke značajnosti bila granična za W1 ( $t= 0,213$ , d.f. 31,  $p= 0,089$ ) i H1 ( $t= 0,268$ , d.f. 31,  $p= 0,075$ ). I Tm1, i W1 i H1 bile su više u grupi nonrespondera, tablica 36.

Tablica 36. Usporedba Tm1, W1, H1 između nonrespondera i relapsera.

	Terapijski odgovor	N	X	SD	<b>p</b>
Tm1	Nonresponder	24	<b>87,15</b>	1,29	<b>0,037</b>
	Relapser	9	87,11	2,51	
W1	Nonresponder	24	<b>3,24</b>	0,96	<b>0,089</b>
	Relapser	9	3,15	1,31	
H1	Nonresponder	24	<b>1,76</b>	0,69	<b>0,074</b>
	Relapser	9	1,69	0,76	

U A1 grupe nonrespondera i relapsera nisu se statistički razlikovale (Mann-Whitney 96,  $p= 0,648$ ), nonresponderi su imali veću A1, tablica 37.

Tablica 37. Usporedba A1 između nonrespondera i relapsera.

	Terapijski odgovor	N	Mean Rank	<b>p</b>
A1	Nonresponder	24	<b>17,50</b>	<b>0,648</b>
	Relapser	9	15,67	

#### **4.4. Usporedba ostalih varijabli ispitanika u odnosu na ETVR i SVR**

Obzirom da još uvijek ne postoji apsolutno učinkovito liječenje za sve bolesnike s KHC neprekidno se pokušavaju utvrditi koje te kako poznate varijable bolesnika utječu na ETVR, posebno SVR. Odnos tih varijabli ispitan je i u naših ispitanika, tablica 38.

U predikciji ne postizanja ETVR statistički značajna povezanost dobivena je za:

1. genotip ( $t= 11,565$ , d.f. 3,  $p= 0,006$ ),
2. viremiju ( $t= 8,832$ , d.f. 1,  $p= 0,004$ ),
3. histološku aktivnost ( $t= 22,387$ , d.f. 12,  $p= 0,024$ ) i
4. fibrozu ( $t= 12,275$ , d.f. 5,  $p= 0,026$ ).

Jakost povezanosti u predikciji ne postizanja SVR dobivena je za:

1. genotip ( $t= 13,311$ , d.f. 3,  $p= 0,002$ ),
2. viremiju ( $t= 7,103$ , d.f. 3,  $p= 0,012$ ),
3. fibrozu ( $t= 14,900$ , d.f. 5,  $p= 0,007$ ) i
4. dob ( $t= 10,103$ , d.f. 1,  $p= 0,002$ ).

Jakost povezanosti je statistički granično značajna za AST i SVR ( $t= 3,548$ , d.f. 1,  $p= 0,070$ ) te za histološku aktivnost i SVR ( $t= 19,551$ , d.f. 12,  $p= 0,061$ ).

Tablica 38. Predikcija ETVR i SVR ostalih varijabli ispitanika.

Varijabla	Opis	Ne-ETVR	Ne-SVR
Spol	M/Ž	t= 1,811, d.f. 1 p= 0,220	t= 3,028, d.f. 1 p= 0,119
Dob	</> 40 g	t= 2,609, d.f. 1 p= 0,156	<b>t= 10,103, d.f. 1</b> <b>p= 0,002</b>
ALT	Normalan/patološki	t= 0,265, d.f. 1 p= 0,687	t= 0,071, d.f. 1 p= 1,000
AST	Normalan/patološki	t= 1,196, d.f. 1 p= 0,295	<b>t= 3,548, d.f. 1</b> <b>p= 0,070</b>
Genotip	Od 1 do 4	<b>t= 11,565, d.f. 3</b> <b>p= 0,006</b>	<b>t= 13,311, d.f. 3</b> <b>p= 0,002</b>
Viremija	</> 600x10 <sup>3</sup> IU/mL	<b>t= 8,832, d.f. 1</b> <b>p= 0,004</b>	<b>t= 7,103, d.f. 1</b> <b>p= 0,012</b>
Histološka aktivnost	Od 2 do 15	<b>t= 22,387, d.f. 12</b> <b>p= 0,024</b>	<b>t= 19,551, d.f. 12</b> <b>p= 0,061</b>
Fibroza	Od 1 do 6	<b>t= 12,275, d.f. 5</b> <b>p= 0,026</b>	<b>t= 14,90, d.f. 5</b> <b>p= 0,007</b>

## **5. RASPRAVA**

Infekcija HCV-om u većine oboljelih prelazi u kroničnu bolest, KHC. Uobičajeno je sporo progresivnog tijeka ali u konačnici ipak uvjetuje nastanak teškog oštećenja jetre. Sve faze bolesti, i akutna i kronična, u velike većine je bez tipičnih simptoma te je često neprepoznata sve do razvoja težih stadija. KHC zbog svog morbiditeta ali i mortaliteta predstavlja globalni problem. Danas dostupno liječenje učinkovito je tek u nešto više od polovice liječenih, primarno ovisi o genotipu virusa. HCV postoji u više različitih genetskih oblika. Klinički značajnu prvu razinu različitosti čini podjela na genotipove (33). Hrvatska spada u zemlje niske prevalencije infekcije HCV-om a prema genotipu virusa prevladavaju genotip 1 i 3 (38,39). U našoj skupini ispitanika razdioba genotipova približno je odgovarala razdiobi genotipova u Hrvatskoj. Prevladavali su genotipovi 1 i 3.

HCV u pojedincu obitava kao skupina kvazispecijesa koji su međusobno genetski različiti ali opet vrlo bliski oblici (40). Odabir kvazispecijesa ovisi o nekoliko čimbenika: uspješnosti točnog virusnog umnažanja kroz vrijeme, vanjskoj intervenciji liječenjem i učinkovitosti imunološkog sustava domaćina (83). Iako je odavno poznato da genetska različitost HCV-a ima veliki utjecaj u patogenezi kronične bolesti, dijagnostici, učinkovitosti liječenja te razvoju cjepiva svejedno do danas nije jasna točna klinička implikacija kvazispecijesa (84-86).

Dosadašnja metodologija utvrđivanja kvazispecijesa kao i kliničke značajnosti njihove složenosti i raznolikosti uglavnom se bazirala na sekvencioniranju različitih regija HCV genoma. Ovaj princip genotipizacije laboratorijski je zahtjevan ali i skup.

Metoda analize temperatura taljenja do sada je korištena samo u genotipizaciji HCV-a ali ne i u utvrđivanju kvazispecijesa.

Sukladno navedenom osnovni ciljevi ove disertacije bili su određivanje kvazispecijesa među ispitanicima primjenom metode taljenja DNK visoke rezolucije a potom procjena kliničke značajnosti utvrđenih kvazispecijesa kao i njihovih izmjena kroz vrijeme sa i bez vanjskog utjecaja.

**T<sub>m</sub>** predstavlja onu **temperaturu taljenja** u kojoj je 50% početne količine DNK denaturirano, odnosno onu temperaturu gdje je polovica DNK još uvijek dvostruko zavijena a polovica rastaljena u jednolančane ovojnice. T<sub>m</sub>, stoga, ovisi i o dužini DNK ali i o specifičnom sastavu nukleotida (87). Sam proces denaturacije može koristiti za analizu nekih činjenica. Naime, poznata je činjenica da je vodikova veza između citozina (C) i gvanina (G) jača od veze adenzina i timina te stoga, količina CG u genomu određuje T<sub>m</sub>. DNK koja sadrži veću količinu CG imat će višu T<sub>m</sub>. T<sub>m</sub> može poslužiti i u utvrđivanju razlika sekvenci između dvije različite vrste (88).

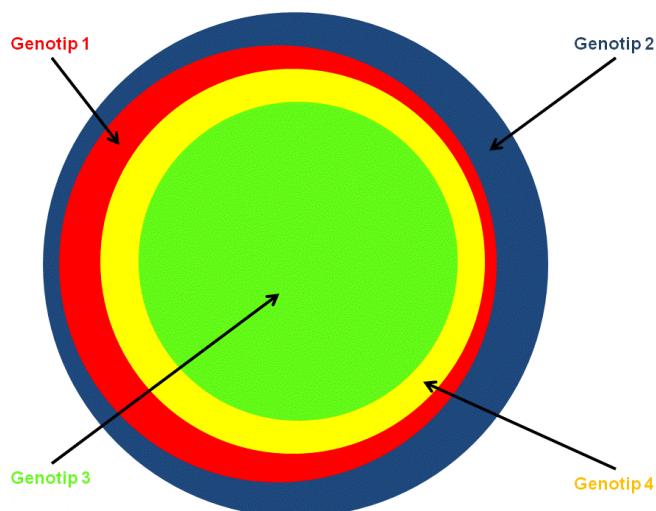
U našoj ispitivanoj populaciji T<sub>m1</sub> ima normalnu distribuciju ali veliki raspon (10,69°C, od 80,75 do 91,44°C) što je nametnulo zaključak da se radi o vrlo heterogenoj genetskoj grupi prema temperaturi taljenja kao i da postoje preklapanja u T<sub>m1</sub> između različitih genotipova.

Radi potvrđivanja točnosti metode za određivanje genotipa ali i procjene svrsishodnosti genotipizacije grupa je podijeljena po genotipovima. Analizom je utvrđena statistički značajna razlika u T<sub>m1</sub> između svih genotipova (p= 0,054) čime

je potvrđeno da ova metoda može i u HVR1 regiji generalno razlikovati pripadnost određenom genotipu (89,90). Prema visini srednje Tm1, najviša je dobivena za genotip 1 ( $87,31 \pm 1,87^{\circ}\text{C}$ ), slijedi genotip 3 ( $86,44 \pm 1,72^{\circ}\text{C}$ ), potom genotip 2 ( $85,96 \pm 5,35^{\circ}\text{C}$ ) a najnižu vrijednost ima genotip 4 ( $85,36 \pm 3,29^{\circ}\text{C}$ ). Zbog najviše Tm1 kod genotipa 1 zaključuje se da on ima najveći udio CG veza. Raspon minimalne i maksimalne srednje Tm1 između svih genotipova je  $1,95^{\circ}\text{C}$  što potvrđuje, ali ne u potpunosti činjenicu, da razlika temperature od  $1^{\circ}\text{C}$  određuje pripadnost različitom genotipu. Mogući razlog nedobivanja raspona  $4^{\circ}\text{C}$  (za razlikovanje 4 genotipa) je odabir analizirane regije koje je hipervarijabilna (HVR1) a ne konzervirana, kao i mali broj ispitanika u grupi genotipova 2 i 4.

Postoji veliki raspon minimalne i maksimalne Tm1 unutar ispitanika istog genotipa što ukazuje da postoje preklapanja, slika 5.

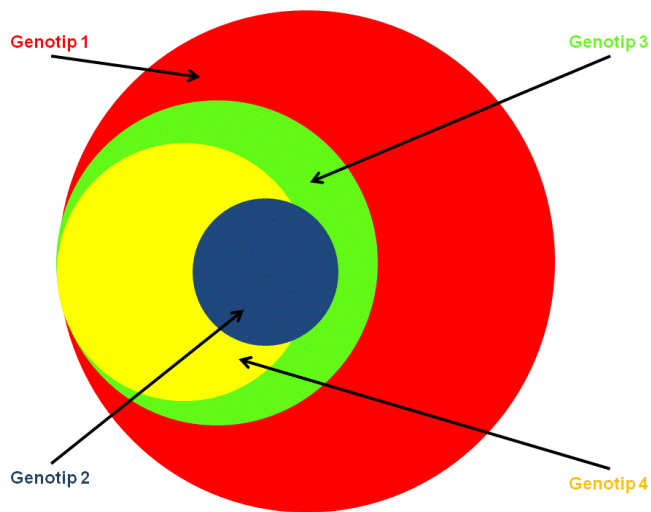
Slika 5. Preklapanje Tm1 među genotipovima.



Dakle, ako pretpostavimo da jedan pojedinac ima kvazispecijese jednog  $T_m$  unutar jednog genotipa te ukoliko se njegov  $T_m$  preklopi s  $T_m$  kvazispecijesa različitog genotipa drugog pojedinca nameće se pitanje radi li se uopće o različitom genotipu, imajući na umu ispitivanu regiju, HVR1? Najveći raspon ima genotip 2 (10,69), slijedi genotip 1 (9,25), potom genotip 4 (8,14) te na kraju genotip 3 (6,74). Svakako je potrebno odrediti kliničku značajnost ovog zaključka posebno u kontekstu činjenice da genotip virusa ima vrijednost u procjeni duljine trajanja liječenja.

**Širinu ( $W$ )** temperatura taljenja čini raspon minimalne i maksimalne  $T_m$  potrebne za proces denaturacije PCR produkta svakog uzorka ponaosob. Distribucija  $W_1$  u našoj ispitivanoj grupi je normalna. I za ovu varijablu postoji široki raspon (6,03). Razlika u  $W_1$  prema genotipovima nije statistički značajna ( $p=0,681$ ) što potvrđuje, uz ranije navedeni široki raspon, da između različitih genotipova postoji preklapanje u temperaturama taljenja barem u jednom trenutku  $W$ , odnosno da su isti kvazispecijesi prisutni u različitim genotipovima, slika 6. Ovime je dokazano da kvazispecijesi s većom  $W$  imaju veći raspon između minimalno i maksimalno potrebne temperature za denaturaciju cjelokupne količine DNK. Dakle, širina određuje kvalitativno kvazispecijese, što bi značilo da što je veća širina ima više kvalitativno različitih kvazispecijesa. Kod postojanja većeg broja kvalitativno različitih kvazispecijesa veća je vjerojatnost da će neki od kvazispecijesa izbjeći učinak primijenjenog lijeka.

Slika 6. Preklapanje W1 među genotipovima.



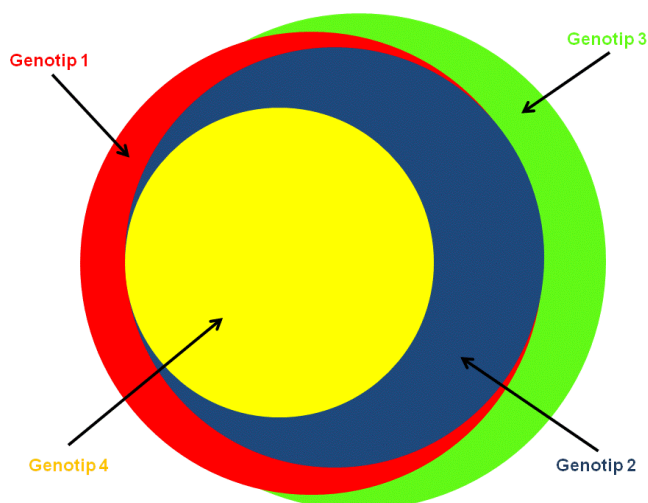
U našoj ispitivanoj grupi najveći raspon W1 ima genotip 1 (6,00) a najmanji genotip 2 (1,76). Upravo u ova dva genotipa postoji najveća razlika u učinkovitosti liječenja dvojnog kombiniranom terapijom PEG IFN-alfa i Rib. Objavljena učinkovitost liječenja ovim protokolom prema genotipovima je: za genotip 1 = 41,1% a za genotip 2 = 82,0% (91,92). Učinkovitost ovog protokola za ostale genotipove je: genotip 3 = 77,0% a genotip 4 = 67,9 % (92,93).

**Visina (H)** određuje svjetlosnu jakost fluorescencije nerastaljene DNK a u  $T_m$  ju čini ona jakost fluorescencije pri kojoj je rastaljena polovica ukupne početne količine PCR produkta. Fluoresceira količina nerastaljene DNK što znači da kvazispecijesi koji imaju veću jakost fluorescencije imaju veću količinu nerastaljene DNK u trenutku  $T_m$ . Obzirom da je manja količina DNK rastaljenja znači da postoji veća količina kvazispecijesa. H1 bi, prema tome označavala kvantitativnu razliku među kvazispecijesima u zaraženom pojedincu.



U našoj ispitivanoj grupi H1 ima normalnu distribuciju, širokog raspona, od 0,32 do 3,37 nm. Razlika H1 između genotipova je statistički granično različita što znači da se genotipovi granično razlikuju prema količini nerastaljene DNK u Tm1. Najmanju količinu kvazispecijesa ima genotip 4 ( $1,05 \pm 0,64$ ), slijedi genotip 2 ( $1,54 \pm 1,29$ ), potom genotip 1 ( $1,63 \pm 0,68$ ) dok najveću ima genotip 3 ( $1,81 \pm 0,80$ ). Za viremiju postoje jasni dokazi da ima prediktivnu vrijednost učinka terapije, a posebno za brzinu njezinog opadanja (ili eliminacije) tijekom liječenja (94,95). I prema H1 postoje značajna preklapanja među genotipovima, slika 7.

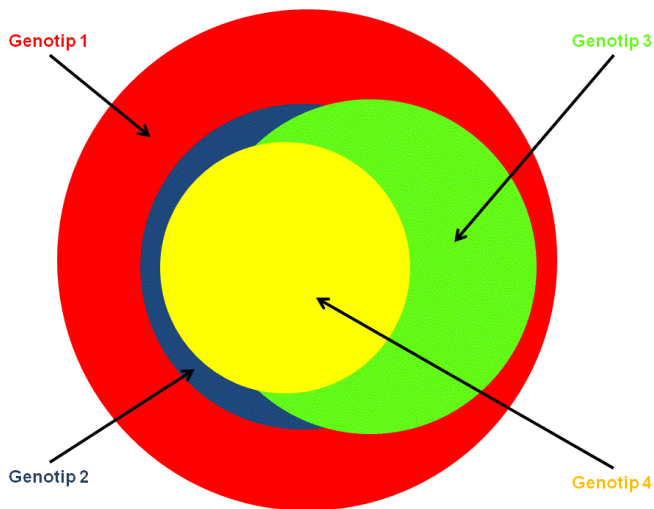
Slika 7. Preklapanje H1 među genotipovima.



**Površinu (A)** određuje površina krivulje taljenja u Tm točki a određena je i s W i H. U ispitivanoj skupini A1 nije imala normalnu distribuciju. Obzirom na široku distribuciju W1 i H1 očekivano je da i A1 ima široki raspon, od 0,46 do 6,45. Najveći raspon A1 imaju genotipovi 1 i 3 (5,99 i 4,00). Dotični genotipovi su ujedno i najrasprostranjeniji genotipovi HCV-a u svijetu. Ukoliko uzmemo u obzir da je A ovisna o W i H, njezina veća vrijednost označava i veću ili W ili H, ili obje. Posljedica

ove tvrdnje je omogućavanje perzistiranja HCV u svijetu obzirom da najrašireniji genotipovi imaju najveću mogućnost nastanka mutacija (kvalitativno i kvantitativno). Obzirom na ranije navedena preklapanja parametara očekivano i u A1 postoje preklapanja.

Slika 7. Preklapanje A1 među genotipovima.



Određivanjem krivulje taljenja bazalnih uzoraka utvrđena je subpopulacija virusa, unutar genotipa HCV-a, koja uzrokuje KHC u svakom pojedincu. Primarno je potrebno procijeniti **kliničku značajnost određivanja bazalnih parametara kvazispecijesa.**

Bazalni parametri ispitivani su u odnosu na poznate varijable ispitanika.

U odnosu na spol dobivena je statistički značajna razlika za Tm1 što bi ukazalo da su kvazispecijesi različiti u muškaraca i žena. Točnije, žene imaju kvazispecijese više Tm1 koje odgovaraju genotipovima 1. U odnosu na spol nije uočena statistički

značajna razlika za W1, H1 i A1. Tendenciju većoj W1 i H1 imaju muškarci, dok žene imaju tendenciju većoj A1.

Odnos starosne dobi s W1 i H1 je obrnuto proporcionalan dok je odnos sa Tm1 i A1 proporcionalan ali razlika nije statistički značajna. Može se reći da starije osobe imaju manji W1 i H1 što bi značilo da imaju kvalitativno homogenije kvazispacijese i kvantitativno manji broj kvazispacijesa. No, kako je istodobno u starijih A1 veća, koja jedina ima prediktivnu vrijednost za ETVR i SVR, može se reći da ta homogenija grupa u starijih oboljelih samo znači da su kroz vrijeme opstali rezistentniji kvazispacijesi.

Za biokemijsku aktivnost i parametre HCV kvazispacijesa nije dobivena statistički značajna razlika u ispitivanoj populaciji. Biokemijska aktivnost, i inače, nije relevantan pokazatelj za težinu KHC jer je poznato da do trećine oboljelih može imati normalne biokemijske parametre (96-98). No, tendenciju višoj W1, H1 i A1 imaju patološke vrijednosti ALT i AST što ukazuje da kvalitativno i kvantitativno izraženiji kvazispacijesi jače induciraju biokemijski odgovor u zaraženog pojedinca.

Visina viremije i parametri kvazispacijesa razlikuju se statistički značajno samo u A1 u proporcionalnom odnosu, što znači da veća viremija ima veću površinu. Navedeno potkrijepljuje činjenicu da je očekivani pozitivan terapijski učinak manji u pojedina s višom viremijom (94,95). Korelacija viremije sa ostalim parametrima kvazispacijesa nije statistički značajna. No, odnos Tm1 i H1 je također proporcionalan što znači da je kod viših Tm1 i H1 viša i viremija, dok je sa W1 obrnuto proporcionalan.

Odnos parametar kvazispacijesa i histološkog oštećenja, bilo histološke aktivnosti bilo stadija bolesti uglavnom nije statistički značajan u ispitivanoj populaciji. Statistička značajna razlika dobivena je za H1, u proporcionalnom odnosu, što govori

u prilog činjenice da kvantitativno brojniji kvazispicijesi izazivaju izraženiji stadij bolesti, odnosno fibrozu jetre.

Upravo zbog morbiditeta i mortaliteta liječenje KHC je predmet brojnih konsenzus konferencija (99-102). Cilj liječenja je prevencija komplikacija kronične infekcije HCV-om što se postiže samo eradikacijom virusa. Neosporno je dokazana učinkovitost liječenja dvojnog kombiniranom terapijom PEG IFN-alfa i Rib te ona, danas, predstavlja zlatan standard liječenja KHC (103-105). Usprkos značajnom terapijskom napretku ipak polovica liječenih bolesnika s KHC ne uspije eliminirati virus u potpunosti. Godinama se ispituju prediktori virološkog odgovora s ciljem detekcije skupine bolesnika koja hoće ili neće visoko vjerojatno učinkovito odgovoriti na primjenjeni protokol (104,106). Do sada se zna da su mlađa dob (<40 godina) te genotip (ne-1 genotip) neovisne varijable za predikciju postizanja SVR (106). Genotip virusa osnovni je parametar procjene dužine trajanja liječenja.

Danas komercijalno dostupni testovi za genotipizaciju HCV neučinkoviti su u vrlo malom udjelu (3%), dok u 1 do 4% zaraženih pojedinaca prikazuju infekciju miješanim genotipom (107,108). Uloga kvazispicijesa, kao subpopulacije HCV-a u pojedinca, u predikciji učinka liječenja kontroverzna je. U svim dosadašnjim, ali ne tako brojnim, istraživanjima na tom polju koristile su se metode bazirane na sekvencioniranju HVR1. Prospektivna studija Chambers i suradnika iz 2003. godine nije pokazala prediktivnu vrijednost kvazispicijesa za procjenu postizanja SVR (109). Recentna prospektivna studija Salmeron i suradnika na 82 bolesnika, svi genotipa 1, suprotno ranijoj ukazala je na pozitivnu prediktivnu vrijednost kvazispicijesa (110). Kontradiktorni rezultati su i pri procjeni dinamičkih promjena kvazispicijesa. Naše pilot istraživanje iz 2001 godine nije ukazalo na značaj dinamičkih promjena kvazispicijesa tijekom liječenja ali je ukazalo da kvaliteta kvazispicijesa ima

pozitivnu prediktivnu vrijednost (111). Studija Farci i suradnika iz 2002 godine pokazuje da dinamičke izmjene kvazispecijesa rano u terapijskom ciklusu imaju pozitivan prediktivni učinak za SVR, odnosno perzistiranje kvazispecijesa utvrđenih na početku liječenja najvjerojatnije označuje prisutnost subpopulacije otporne na interferon (72).

Univarijantnom analizom logističke regresije ispitivana je prediktivna vrijednost svakog parametra kvazispecijesa u odnosu na ne postizanje ETVR i SVR. ETVR i SVR uzete su kao klinički značajne varijable obzirom da označavaju virološki odgovor na primjenjeno liječenje uz napomenu da je SVR značajniji utoliko što predstavlja trajnu eliminaciju HCV-a.

Statistički granična značajnost dobivena je samo za A1 ( $p= 0,10$ ) od svih bazalnih parametara kvazispecijesa u ETVR. Odnos ETVR s Tm1 i H1 je proporcionalan što znači da je vjerojatnost neučinkovitog liječenja povezana s višom Tm1 i višom H1. Navedeno je konzistentno s činjenicom da genotip 1 postiže najlošiji učinak liječenja a upravo više Tm1 povezuju se s genotipom 1. Nadalje viša H1 odražava višu fluorescenciju te ovdje proporcionalan odnos objašnjava činjenicu da je veća vjerojatnost neučinkovitog liječenja kada je u Tm1 denaturirana veća količina kvazispecijesa (uzevši u obzir da se u Tm denaturira 50% ukupne količine kvazispecijesa). Nadalje, odnos W1 je obrnuto proporcionalan što znači da će pojedinci s većim W1 (veći broj kvalitativno različitih kvazispecijesa) manje vjerojatno neučinkovito odgovoriti na liječenje. U postizanju SVR, što je definitivan cilj liječenja, A1 kvazispecijesa ima statistički značajnu razliku ( $p= 0,03$ ). Razlika je i dalje statistički neznačajna za SVR Tm1, W1 i H1 kao što je odnos ostao isti.

Rezultatima ovog ispitivanja postignut je cilj disertacije upravo u činjenici da A1 ima pozitivnu prediktivnu vrijednost u nepostizanju ETVR i SVR. Bazalna A1 odražava kompletan opis kvazispicijesa (i Tm1, i W1, i H1) svakog pojedinca. Dakle, u A1 sažet je i genotip ali i kvalitativnost i kvantitativnost kvazispicijesa.

KHC u 4-22% bolesnika, kroz dvadesetak godina napreduje do stadija ciroze, uz godišnju smrtnost od komplikacija u oko 280000 oboljelih (11,112,113). Za očekivati je da se HCV nakon vremena razlikuje u odnosu na HCV inokuluma. Činjenica da bolest progredira, činjenica da je HCV u interakciji s imunološkim sustavom domaćina kao i činjenica da usprkos perzistiranju infekcije u organizmu cirkuliraju protutijela na HCV potkrijepljuju tvrdnju da se HCV kroz vrijeme mijenja.

Promjene se mogu ispitivati u situaciji nepostojanja vanjske intervencije liječenjem kao i u situaciji postojanja intervencije kada se parni uzorak može dobiti samo u skupini nonrespondera.

U grupi ispitanika bez vanjske intervencije, određivanjem osnovnih parametara kvazispicijesa u parnom uzorku izgubila se statistički značajna razlika u Tm (Tm2 u odnosu na Tm1). Navedenim se gubi mogućnost određivanja genotipa prema temperaturi taljenja u parnom uzorku. Razlog tomu je vrlo vjerojatno manji broj uzoraka (40 uzorka). Vrijeme između parnog i bazalnog uzorka nije uvjetovalo statistički značajne promjene u Tm, W, H i A. Donekle je objašnjivo nepostojanje promjene u Tm jer se, u principu, promjene genotipova ne događaju. No, promjene u kvaliteti i kvantiteti kvazispicijesa očekivane su, no očito je vrijeme od 6 mjeseci praćenja promjena nedovoljno da bi se one registrirale u statistički značajnoj razlici. Usporedivši medijane registriran je pomak parnog kvazispicijesa u sva 4 parametra

(porasla je Tm, W i H, dok se A smanjila) što znači da su se dogodile kvalitativne i kvantitativne promjene kvazispicijesa.

U grupi ispitanika koja je liječena statistički granična razlika dobivena je za W1 što znači da je došlo do promjene u kvaliteti kvazispicijesa: u 15 ispitanika širina se smanjila, u njih 8 se povećala dok je 1 ostala nepromijenjena. Obzirom da se radi o nonresponderima na liječenje očito je proboj omogućen kvazispicijesima rezistentnijim na liječenje. Kao i u neliječene grupe, i u ovoj je zamijećen pomak u medijanu ali, dijelom, u različitom smjeru. Medijan za H je smanjen, dok je smjer izmjene medijana za Tm i A isti u obje grupe.

Na kraju, u liječenoj grupi ispitivana je razlika bazalnih parametara HCV kvazispicijesa u odnosu na vrstu postignutog terapijskog odgovora.

Statistički značajna razlika dobivena je u A1 između grupe respondera i relapsera, kao i između respondera i nonrespondera čime je potvrđena ranija tvrdnja da A1 ima prediktivnu vrijednost u procjeni ETVR i SVR. Razlika u A1 između relapsera i nonrespondera nije statistički značajna što i nije iznenađujuće obzirom da A1 ima prediktivnu vrijednost za SVR a u točki SVR-a u obje grupe isti je terapijski učinak, odnosno u obje grupe detektabilna je HCV RNK.

Tm1 nije se statistički razlikovao između respondera i relapsera, kao niti između respondera i nonrespondera što je i očekivano jer su očito već bazalno prisutni rezistentniji oblici kvazispicijesa te se time niti ne mijenja osnovni genotip. No, interesantno statistički značajna razlika dobivena je između relapsera i nonrespondera i to s tendencijom viših Tm u grupi nonrespondera. Ovime se dokazuje da pod utjecajem liječenja dolazi do proboja kvazispicijesa viših temperatura taljenja dakle proboja rezistentnijih subpopulacija unutar jednog genotipa.

Nije dobivena statistički značajna razlika u W1 respondera i relapsera, kao niti respondera i nonrespondera. No, opetovano je razlika granično značajna u W1 između relapsera i nonrespondera u smjeru povećanja W1 u grupi nonrespondera. Potonja teza potvrđuje uvjerenje da pri liječenju dolazi do proboja kvazispicijesa koji kvalitativno nadilaze njegov učinak.

Kao i za prethodne parametre, za H1 nije dobivena statistički značajna razlika između respondera i relapsera, niti između respondera i nonrespondera. No, razlika je granično značajna između relapsera i nonrespondera opetovano u smjeru većeg H1 u grupi nonrespondera. Očito pod utjecajem terapije dolazi do proboja kvazispicijesa jače fluorescencije, odnosno do kvantitativnog porasta rezistentnih kvazispicijesa.

U ovoj disertaciji, potvrđeno su prediktivnu vrijednost za ETVR i SVR imali genotip virusa, viremija i fibroza. Interesantno, prediktivnu vrijednost za ETVR ima i histološka aktivnost, što u dosadašnjim istraživanja nije ispitivano. No, nažalost njezina prediktivna vrijednost za SVR se gubi. Značajnu prediktivnu vrijednost za SVR ima dob u trenutku postavljanja dijagnoze.

Znanstveni doprinos ove doktorske disertacije nedvojbeno je u činjenici što su se metodom temperature taljenja uspjeli kvalitativno i kvantitativno definirati kvazispicijesi u svakog ispitivanog pojedinca. Ova metoda do sada nije korištena u definiciji kvazispicijesa. Nadalje, ovom jednostavnijom i jeftinijom metode od sekvencioniranja, moguće je, čak i u hipervarijabilnoj regiji, odrediti pripadnost osnovnom genotipu. Evidentirana je dinamičnost promjena kroz vrijeme, sa i bez vanjske intervencije liječenjem, u vidu kvalitativnog pomaku svih bazalnih parametara



kvazispecijesa. Nedvojbeno najznačajnija je činjenica što je površina bazalnih kvazispecijesa detektirana kao prediktivni parametar za procjenu učinka liječenja. Površina u svojoj definiciji obuhvaća i kvalitetu i kvantitetu kvazispecijesa pojedinca.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Metoda analize krivulja taljenja može se koristiti za genotipizaciju čak i u hipervarijabilnoj regiji HVR1;
2. Temperatura taljenja kvazispecijesa prepoznaje osnovni genotip, najviša je za genotip 1;
3. Preklapanje u temperaturama taljenja dokazuje da i unutar različitih osnovnih genotipova postoje kvazispecijesi istih temperatura taljenja;
4. Temperatura taljenja razlikuje se prema spolu;
5. Širina određuje kvalitativno različite kvazispecijese;
6. Postoji preklapanje u širini između različitih osnovnih genotipova;
7. Visina određuje kvantitativnu razliku između kvazispecijesa;
8. Postoje preklapanja u visinama među osnovnim genotipovima;
9. U odnosu visine i fibroze dobivena je statistička značajnost što znači da kvazispecijesi više visine izazivaju izraženiju fibrozu;
10. Površinu određuju i temperatura taljenja, i širina i visina;
11. U odnosu površine i viremije dobivena je statistička značajnost što znači da kvazispecijesi veće površine daju višu viremiju;
12. Površina ima prediktivnu vrijednost za procjenu terapijskog učinka, posebno značajnu u procjeni održanog virološkog terapijskog odgovora;
13. Klinička primjena bazalnog određivanja parametara kvazispecijesa je u predikciji terapijskog učinka;
14. Prema površini jasno se razlikuju responderi od relapsera i nonrespondera;
15. Tijekom vremena dolazi do pomaka bazalnih parametara kvazispecijesa što potvrđuje činjenicu da se inicijalni inokulum mijenja;

16. Primjenjeno liječenje statistički značajno mijenja širinu što dokazuje da je u pojedinaca bez pozitivnog terapijskog učinka došlo do proboja rezistentne subpopulacije virusa;
17. Temperatura taljenja razlikuje se između relapsera i nonrespondera prema višim vrijednostima što nameće zaključak da u nonrespondera dolazi do proboja kvazispecijesa viših temperatura;
18. Širina se razlikuje u relapsera i nonrespondera što ukazuje da se tijekom liječenja kvazispecijesi kvalitativno mijenjaju u grupi nonrespondera;
19. Visina se razlikuje u relapsera i nonrespondera što ukazuje da tijekom liječenja dolazi do kvantitativne promjene kvazispecijesa u grupi nonrespondera;
20. Prediktivnu vrijednost za terapijski učinak imaju genotip, viremija, histološka aktivnost i fibroza u ETVR, dok za SVR imaju genotip, viremija, fibroza i dob.

## **7. LITERATURA**

1. Dienstag JL, Purcell RH. Recent advances in the identification of hepatitis viruses. *Postgrad Med J* 1977;53:364-73.
2. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985;88:773-9.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
4. Kuo G, Choo QL, Alter HJ i sur. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
5. Rajendra A, Wong JB. Economics of chronic hepatitis B and hepatitis C. *J Hepatol* 2007;47:608-17.
6. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:2436-41.
7. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006;45:529-38.
8. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology* 2008;47:321-31.

9. Santantonio T, Medda E, Ferrari C i sur. Risk factors and outcome among a large patient cohort with community-acquired acute hepatitis C in Italy. *Clin Infect Dis* 2006;43:1154-9.
10. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 1999;107:S10–S15.
11. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R i sur. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003;125:80–88.
12. Alberti A, Chemello L, Benvegnù L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999;31:17-24.
13. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26:15S-20S.
14. Penin Francois. Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2003;7:1-21.
15. Wikipedia: The Free Encyclopedia. Wikimedia Foundation Inc. Updated 11 March 2008, 11:29. Encyclopedia on-line. Available from [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:HCV\\_structure.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:HCV_structure.png) Retrieved 12 April 2008.
16. Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *Leukoc Biol* 2004;76:743-59.
17. Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A. The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 2001;7:661-70.
18. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J i sur. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and

- NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991;180:842-8.
19. Lin C, Lindenbach BD, Prágai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994;68:5063-73.
  20. Lundin M, Lindström H, Grönwall C, Persson MA. Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J Gen Virol* 2006;87:3263-72.
  21. Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 2003;77:3181–90.
  22. Moradpour D, Brass V, Bieck E i sur. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004;78:13278-84.
  23. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci* 2006;3:29-34.
  24. Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J i sur. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut* 2005;54:682-5.
  25. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V i sur. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *Infect Dis* 2003;187:1951-8.

26. Kato T, Date T, Miyamoto M i sur. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 2003;125:1808-17.
27. Wakita T, Pietschmann T, Kato T i sur. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-6.
28. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ i sur. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623-6.
29. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005;436:933-8.
30. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S i sur. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-41.
31. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12766-71.
32. Okamoto H, Kojima M, Okada S i sur. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8,2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992;190,894–9.
33. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ i sur. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-4.
34. Tokita H, Okamoto H, Iizuka H i sur. The entire nucleotide sequences of three hepatitis C virus isolates in genetic groups 7-9 and comparison with those in the other eight genetic groups. *J Gen Virol* 1998;79:1847-57.

35. Simmonds P, Bukh J, Combet C i sur. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-73.
36. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* 2004;85:3173-88.
37. Vince A, Iscić-Bes J, Zidovec Lepej S i sur. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Croatia - a 10 year retrospective study of four geographic regions. *Coll Antropol* 2006;30:139-43.
38. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008;48:148-62.
39. Vince A, Palmović D, Kutela N, Sonicky Z, Jeren T, Radovani M. HCV genotypes in patients with chronic hepatitis C in Croatia. *Infection* 1998;26:173-7.
40. Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M i sur. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1998;54:256-64.
41. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-3.
42. Lohmann V, Körner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001;75:1437-49.
43. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 2001;75:4614-24.



44. Cheney IW, Naim S, Lai VC i sur. Mutations in NS5B polymerase of hepatitis C virus: impacts on in vitro enzymatic activity and viral RNA replication in the subgenomic replicon cell culture. *Virology* 2002;297:298-306.
45. Bukh J. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1469-75.
46. Castet V, Fournier C, Soulier A i sur. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol* 2002;76:8189-99.
47. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 1998;72:2795-805.
48. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 2003;7:45-66.
49. Soler M, Pellerin M, Malnou CE, Dhumeaux D, Kean KM, Pawlotsky JM. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 2002;298:160-73.
50. Enomoto N, Kurosaki M, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-strand conformation polymorphism analysis. *J Gen Virol* 1994;75:1361-9.

51. Nagasaka A, Hige S, Tsunematsu I i sur. Changes in hepatitis C virus quasispecies and density populations in patients before and after interferon therapy. *J Med Virol* 1996;50:214-20.
52. Shindo M, Hamada K, Koya S, Arai K, Sokawa Y, Okuno T. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* 1996;24:1018-23.
53. Torres-Puente M, Cuevas JM, Jiménez-Hernández N i sur. Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J Viral Hepat* 2008;15:188-99.
54. Roque Afonso AM, Jiang J, Penin F i sur. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 1999;73:9213-21.
55. Cabot B, Martell M, Esteban JI i sur. Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. *J Virol* 2000;74:805-11.
56. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Superinfection of heterologous hepatitis C virus in a patient with chronic type C hepatitis. *Gastroenterology* 1993;105:583-7.
57. Giannini C, Giannelli F, Monti M i sur. Prevalence of mixed infection by different hepatitis C virus genotypes in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Lab Clin Med* 1999;134:68-73.
58. Herring BL, Page-Shafer K, Tobler LH, Delwart EL. Frequent hepatitis C virus superinfection in injection drug users. *J Infect Dis* 2004;190:1396-403.

59. Bowden S, McCaw R, White PA, Crofts N, Aitken CK. Detection of multiple hepatitis C virus genotypes in a cohort of injecting drug users. *J Viral Hepat* 2005;12:322-4.
60. Qian KP, Natov SN, Pereira BJ, Lau JY. Hepatitis C virus mixed genotype infection in patients on haemodialysis. *J Viral Hepat* 2000;7:153-60.
61. Murakami J, Okamoto M, Miyata H, Nagata I, Shiraki K, Hino S. Evolution in the hypervariable region of hepatitis C virus in infants after vertical transmission. *Pediatr Res* 2000;48:450-6.
62. Ishii T, Ohto H, Takeuchi C i sur. Evolution in the hypervariable region of the hepatitis C virus in two infants infected by mother-to-infant transmission. *Pediatr Int* 2005;47:278-85.
63. Farci P, Shimoda A, Coiana A i sur. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000;288:339-44.
64. González-Peralta RP, Qian K, She JY i sur. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1996;49:242-7.
65. Poynard T, Marcellin P, Lee SS i sur. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352:1426-32.
66. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER i sur. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485-92.

67. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J i sur. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000;343:1666-72.
68. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR i sur. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-82.
69. Chambers TJ, Fan X, Droll DA i sur. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:3071-83.
70. Abbate I, Cappiello G, Lo Iacono O i sur. Heterogeneity of HVR-1 quasispecies is predictive of early but not sustained virological response in genotype 1b-infected patients undergoing combined treatment with PEG- or STD-IFN plus RBV. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003;17:162-5.
71. Abbate I, Lo Iacono O, Di Stefano R i sur. HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated- or standard-interferon and ribavirin. *J Hepatol* 2004;40:831-6.
72. Farci P, Strazzera R, Alter HJ i sur. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3081-6.
73. Sandres K, Dubois M, Pasquier C i sur. Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J Virol* 2000;74:661-8.

74. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766-70.
75. Lerman LS, Silverstein K. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1987;155:482-501.
76. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001;17:439-74.
77. Li Q, Liu Z, Monroe H, Culiati CT. Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 2002;23:1499-511.
78. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007;8:597-608.
79. Zeuzem S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 2004;140:370-81.
80. Hrstić I. Procjena prognostičkih parametara i djelotvornosti različitih protokola liječenja bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Magistarski rad 2001. Zagreb, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
81. Grahovac B, Bingulac-Popović J, Vucelić B i sur. Hypervariable region 1 of hepatitis C virus genome and response to interferon therapy. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:905-10.

82. Ishak KG. Chronic hepatitis. Morphology and nomenclature. *Modern Pathol* 1994;7:690-713.
83. Domingo E, Martínez-Salas E, Sobrino F i sur. The quasispecies (extremely hererogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance - a review. *Gene* 1985;40: 1-8.
84. Koizumi K, Enomoto N, Kurosaki M i sur. Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology* 1995;22:30-5.
85. Farci P, Bukh J, Purcell RH. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Semin Immunopathol* 1997;19:5-26.
86. Kanazawa Y, Hayashi N, Mita E i sur. Influence of viral quasispecies on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 1994;20:1121-30.
87. SantaLucia J Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1460-5.
88. Mandell KE, Vallone PM, Owczarzy R, Riccelli PV, Benight AS. Studies of DNA dumbbells VIII. Melting analysis of DNA dumbbells with dinucleotide repeat stem sequences. *Biopolymers* 2006;82:199-221.
89. Bullock GC, Bruns DE, Haverstick DM. Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescence resonance energy transfer probes. *Clin Chem* 2002;48:2147-54.

90. Haverstick DM, Bullock GC, Bruns DE. Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis: analytical characteristics and performance. *Clin Chem* 2004;50:2405-7.
91. Bruno S, Cammà C, Di Marco V i sur. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for naïve patients with genotype 1 chronic hepatitis C: a randomized controlled trial. *J Hepatol* 2004;41:474-81.
92. Rizzetto M. Treatment of hepatitis C virus genotype 2 and 3 with pegylated interferon plus ribavirin. *J Hepatol* 2005;42:275-6.
93. Derbala MF, El Dweik NZ, Al Kaabi SR i sur. Viral kinetic of HCV genotype-4 during pegylated interferon alpha 2a: ribavirin therapy. *J Viral Hepat* 2008 May 15. [Epub ahead of print]
94. Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Mole LA. Predictors of response of US veterans to treatment for the hepatitis C virus. *Hepatology* 2007;46:37-47.
95. Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML i sur. Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 2005;43:425-33.
96. Sanai FM, Benmoussa A, Al-Hussaini H i sur. Is serum alanine transaminase level a reliable marker of histological disease in chronic hepatitis C infection? *Liver Int* 2008 Apr 1. [Epub ahead of print]
97. Puoti C. Hepatitis C virus with normal transaminase levels. *Dig Dis* 2007;25:277-8.

98. Uto H, Kurogi J, Takahama Y i sur. Alanine aminotransferase flare-up in hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterol* 2007;42:673-80.
99. No authors listed. Proceedings of the 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. July 1-5, 2006. Paris, France. *J Viral Hepat* 2007;14:1-103.
100. No authors listed. Proceedings of the Consensus Conference on Hepatitis C. April 21-22, 2004. Edinburgh, United Kingdom. *J Viral Hepat* 2004;11:1-39.
101. National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology* 2002;36:S3-20.
102. No authors listed. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28, February 1999, Consensus Statement. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 1999;30:956-61.
103. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC i sur. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-65
104. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR i sur. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-82.
105. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR i sur.; PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic



- hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-55.
106. Davis GL, Lau JY. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:122S-127S.
107. Blatt LM, Mutchnick MG, Tong MJ i sur. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J Viral Hepat* 2000;7:196-202.
108. Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR i sur. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. *J Clin Microbiol* 2003;41:1558-64.
109. Chambers TJ, Fan X, Droll DA i sur. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:3071-83.
110. Salmerón J, Casado J, Rueda PM i sur. Quasispecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon-ribavirin. *J Clin Virol* 2008;41:264-9.
111. Grahovac B, Bingulac-Popovic J, Vucelic B i sur. Dynamics of serum hepatitis C virus load and quasispecies complexity during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol* 2001;20:85-9.
112. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG i sur. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:809-16.

113. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095-100.

## SAŽETAK

**UVOD:** Klinička značajnost HCV kvazispicijesa nije razjašnjena. Dostupne metode određivanja kvazispicijesa sekvencioniranjem tehnički su zahtjevne i skupe.

**CILJ I METODE:** osnovni cilj bio je detekcija HCV kvazispicijesa. Uzorci 109 ispitanika primarno su genotipizirani standardnom INNO-LIPA HCV II metodom. Nakon toga isti uzorci su analizirani metodom taljenja DNK: RNK je izolirana komercijalnim kitovima a potom prepisana lančanom reakcijom polimeraze. Amplifikacija hipervarijabilne regije 1 rađena je u 2 faze a dobivena mješavina analizirana je u Light-cycleru. U njemu je visokom rezolucijom detektirana fluorescencija uzorka. Rezultat analize predstavlja krivulja taljenja označena s 4 parametra: temperatura taljenja 50% uzorka DNK ( $T_m$ ), širina ( $W$ ), visina ( $H$ ) i površina ( $A$ ). Svaki parametar statistički je obrađen na sposobnost predikcije terapijskog učinka. Dinamičke promjene analizirane su u parnom uzorku koji je dobiven u 40 neliječenih ispitanika te u 24 liječena ispitanika (45/69 imalo je ETVR).

**REZULTATI:** uključeno je 109 ispitanika, dobi 18-71 godinu, više muškaraca (64), najveći broj genotipa 1 (59,6%), većina srednjeg stadija po Ishaku (fibroza 3 i 4 u 53,8%). Parametri kvazispicijesa jesu: srednja  $T_{m1}$   $86.8 \pm 2.10$ ; srednja  $H1$   $1.64 \pm 0.74$ ; srednja  $W1$   $3.38 \pm 0.14$  a medijan  $A1$  iznosi 4.42. Nije nađena statistički značajna korelacija parametara s genotipom, viremijom ili fibrozom.  $T_{m1}$ ,  $H1$  i  $A1$  u pozitivnom su odnosu s ETVR i SVR dok je odnos s  $W1$  obrnuto proporcionalan. Statistička značajnost za SVR utvrđena je za  $A1$  (OR=1.44, 95%CI=1.03-2.03, p 0.033). U odnosu bazalnog i parnog uzorka postoji pomak raspona u svim parametrima: u neliječenoj grupi porasla je  $T_{m2}$ ,  $W2$  i  $H2$ , dok se  $A2$  smanjila. U liječenoj grupi  $T_{m2}$  je porasla, dok su se  $H2$  i  $A2$  smanjile. Statistička značajnost dobivena je za  $W2$  (Wilcoxon Signed Ranks -1,871; p = 0,061).

**ZAKLJUČAK:** prediktivnu vrijednost za terapijski odgovor ima površina kvazispicijesa. Tijekom vremena zamijećene su promjene parametara kvazispicijesa u neliječenoj i liječenoj grupi.

# Determination of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 in patients with chronic hepatitis C

Irena Hrستیć

Zagreb, 2008.

**INTRODUCTION:** Clinical implication of HCV quasispecies is not well-known. Available methods for their detection are time consuming and expensive.

**AIMS & METHODS:** Aim of this study was detection of HCV quasispecies. Serums from 109 subjects were first genotyped by standard INNO-LIPA HCV II method. After that, same samples were analyzed by high-resolution DNA melting analysis as follows: ribonucleic acid was isolated with commercial kits and afterwards transcript by polymerase chain reaction. Amplification of hypervariable region 1 (HVR1) was done in two phases. Obtained mix for each sample was cycled in Light-cycler and fluorescence was detected. Collected  $T_m$ 's for each sample was showed as melting curve with 4 variables:  $T_m$ , high (H), wide (W) and area (A). Each variable was statistically correlate with non achieved treatment response. ETVR means undetectable HCV RNA at the end of treatment and SVR means maintenance of undetectability of HCV RNA at 6 months after the completion of treatment. Non achieved treatment response means still detectable HCV RNA at those treatment points. Second sample was collected in 40 untreated pts, and in 24 treated pts (45/69 achieved ETVR).

**RESULTS:** total of 109 subjects, 18 to 71 years old, 64 men, more with 1 (59.6%), majority with medium fibrosis according to Ishak score (53.8%). Obtained results were: mean  $T_m$   $86.8 \pm 2.10$ ; mean H  $1.64 \pm 0.74$ ; mean W  $3.38 \pm 0.14$  and median A 4.42. Correlation of no achieved ETVR and SVR was positive with  $T_m$ , H and A and negative with W. Statistical significance was found for A as positive predictor of SVR: OR=1.44, 95%CI (OR) =1.03-2.03, p 0.033. Statistical significance was not found between pared samples in any of parameters but difference in mean has been noticed:  $T_{m2}$ ,  $W_2$  and  $H_2$  increased but  $A_2$  decreased in untreated group. In treated group:  $T_{m2}$  increased while  $H_2$  and  $A_2$  decreased. Statistical significance was noticed for  $W_2$  (Wilcoxon Signed Ranks -1,871; p = 0,061).

**CONCLUSION:** Determination of HCV quasispecies in single sample can predict the treatment response. Changes of quasispecies in untreated and treated group of patients have been observed.

## POPIS SLIKA, GRAFIKONA I TABLICA

### SLIKE

Slika 1.	Izgled čestice HCV-a
Slika 2.	Genom HCV-a
Slika 3.	Životni ciklus HCV-a
Slika 4a.	Filogenetsko stablo razvijenih zemalja
Slika 4b.	Filogenetsko stablo nerazvijenih zemalja
Slika 5.	Preklapanje Tm1 među genotipovima
Slika 6.	Preklapanje W1 među genotipovima
Slika 7.	Preklapanje H1 među genotipovima
Slika 8.	Preklapanje A1 među genotipovima

### GRAFIKONI

Grafikon 1.	Prirodni tijek bolesti
Grafikon 2.	Napredak u liječenju KHC
Grafikon 3.	Krivulje taljenja – 16 uzoraka
Grafikon 4.	Vrškovi taljenja – 14 uzoraka
Grafikon 5.	Vrškovi taljenja heterogenijeg i homogenijeg kvazispecijesa
Grafikon 6.	Vrškovi taljenja s pomakom ulijevo
Grafikon 7.	Vrškovi taljenja s pomakom u desno
Grafikon 8.	Vrškovi taljenja bez značajnijeg pomaka u Tm
Grafikon 9.	Podjela ispitanika prema spolu
Grafikon 10.	Podjela ispitanika prema dobi
Grafikon 11.	Radzioba ispitanika prema genotipu
Grafikon 12.	Distribucija viremije ispitanika
Grafikon 13.	Radzioba ispitanika prema viremiji
Grafikon 14a.	Razdioba ispitanika prema vrijednosti ALT-a
Grafikon 14b.	Razdioba ispitanika prema vrijednosti AST-a
Grafikon 15.	Razdioba ispitanika prema histološkoj aktivnosti
Grafikon 16.	Razdioba ispitanika prema fibrozi
Grafikon 17.	Distribucija Tm1
Grafikon 18.	Distribucija W1
Grafikon 19.	Distribucija H1
Grafikon 20.	Distribucija A1

Grafikon 21a.	Grupiranje A1 prema viremiji s uzorkom koji odstupa
Grafikon 21b.	Grupiranje A1 prema viremiji bez uzorka koji odstupa

## TABLICE

Tablica 1.	Ocjena stupnja histološke aktivnosti i stadija KHC, Ishak sistem
Tablica 2.	Distribucija Tm1, W1 i H1 za sve ispitanike
Tablica 3.	Distribucija A1 za sve ispitanike
Tablica 4.	Razlika Tm1 prema genotipovima
Tablica 5.	Razlika W1 prema genotipovima
Tablica 6.	Razlika H1 prema genotipovima
Tablica 7.	Razlika A1 prema genotipovima
Tablica 8.	Kvazispecijesi i spol
Tablica 9.	Kvazispecijesi i ALT
Tablica 10.	Kvazispecijesi i AST
Tablica 11.	Kvazispecijesi i genotip
Tablica 12.	Tm1 i ETVR
Tablica 13.	H1 i ETVR
Tablica 14.	W1 i ETVR
Tablica 15.	A1 i ETVR
Tablica 16.	Tm1 i SVR
Tablica 17.	H1 i SVR
Tablica 18.	W1 i SVR
Tablica 19.	A1 i SVR
Tablica 20.	Razlika Tm2 prema genotipovima u grupi 1
Tablica 21.	Razlika W2 prema genotipovima u grupi 1
Tablica 22.	Razlika H2 prema genotipovima u grupi 1
Tablica 23.	Razlika A2 prema genotipovima u grupi 1
Tablica 24.	Razlika Tm2 prema genotipovima u grupi 2
Tablica 25.	Razlika W2 prema genotipovima u grupi 2
Tablica 26.	Razlika H2 prema genotipovima u grupi 2
Tablica 27.	Razlika A2 prema genotipovima u grupi 2
Tablica 28.	Parametri kvazispecijesa bazalnog i parnog uzorka za grupu 1
Tablica 29.	Medijani parametara kvazispecijesa bazalnog i parnog uzorka u grupi 1
Tablica 30.	Parametri kvazispecijesa bazalnog i parnog uzorka za grupu 2
Tablica 31.	Medijani parametara kvazispecijesa bazalnog i parnog uzorka u grupi 2

Tablica 32.	Usporedba Tm1, W1, H1 između respondera i nonrespondera
Tablica 33.	Usporedba A1 između respondera i nonrespondera
Tablica 34.	Usporedba Tm1, W1, H1 između respondera i relapsa
Tablica 35.	Usporedba A1 između respondera i relapsa
Tablica 36.	Usporedba Tm1, W1, H1 između nonrespondera i relapsa
Tablica 37.	Usporedba A1 između nonrespondera i relapsa
Tablica 38.	Predikcija ETVR i SVR ostalih varijabli ispitanika

## **ŽIVOTOPIS**

**Mr.sc. Irena Hrstić, dr.med.**

Datum i mjesto rođenja: 28 listopada 1969, Pula, Hrvatska

Mjesto zaposlenja: Klinički bolnički centar Zagreb

Klinika za unutrašnje bolesti

Zavod za gastroenterologiju

Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

E-mail adresa: [irena.hrstic@gmail.com](mailto:irena.hrstic@gmail.com)

### **ŠKOLOVANJE:**

- Srednjoškolsko obrazovanje: Pula, Hrvatska, 1988
- Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska, 1995
- Licenca za samostalan rad, 1997 (broj licence 6768-05685)
- Specijalizacija iz interne medicine, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, 2001
- Subspecijalizacija iz gastroenterologije i hepatologije, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, 2003
- Magistarski rad „Procjena prognostičkih parametara i djelotvornosti različitih protokola liječenja bolesnika s kroničnim hepatitisom C”, 2001

### **ZNANSTVENI I ISTRAŽIVAČKI RAD**

- ukupno 14 ispitivanja

### **OBJAVLJENI RADOVI:**

- CC publikacije (10)
- IM i EM publikacije (6)
- Sažeci (30)
- Poglavlja u knjigama (4)