

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jasna Slaviček

**Citokini u serumu bolesnika s kroničnim
hepatitisom C na hemodijalizi**

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena u Zavodu za dijalizu Klinike za unutrašnje bolesti
i u Kliničkom Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku

KBC Zagreb

Voditelj rada: prof. dr. Rajko Ostojić FACP, FACP

Zahvaljujem svom mentoru prof dr.sc. Rajku Ostojiću na savjetima, podršci i pomoći.

Zahvaljujem prof. dr.sc. Branku Malenici na savjetima i korekcijama.

Zahvaljujem dr. Branku Kolariću na statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem kolektivu Zavoda za dijalizu kao i bolesnicima bez čijeg sudjelovanja ne bi bilo ovog rada.

Svojoj obitelji zahvalna sam na strpljenju i podršci.

Ovaj rad posvećujem svojoj kćerki Vesni Slaviček.

Popis kratica:

HD - hemodijaliza

HCV - virus hepatitisa C

NK stanice - stanice prirodne ubojice (*prema engl natural killer*)

IL - Interleukin

INF- interferon

TNF- α - čimbenik tumorske nekroze α (*prema engl tumor necrosis factor α*)

TGF- β - transformirajući čimbenik rasta β (*prema engl transforming growth factor β*)

INF- γ - interferon γ

CTL - citotoksični limfociti T

VEGF - čimbenik rasta vaskularnog endotela (*prema engl vascular endothelial growth factor*)

MCP-1 - protein koji uzrokuje kemotaksiju monocita (*prema engl monocyte chemotactic protein -1*)

EGF - čimbenik rasta epidermalnih tkiva (*prema engl epidermal growth f*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. VIRUS HEPATITISA C	1
1.2. EPIDEMIOLOGIJA HEPATITISA C U BOLESNIKA NA DIJALIZI	4
1.3. PRIRODNI TIJEK HEPATITISA UZROKOVAN VIRUSOM HEPATITISA C	6
1.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA TIJEK HCV INFEKCIJE	9
1.5. IMUNOREAKCIJA DOMAĆINA NA VIRUSNU INFEKCIJU VIRUSOM HEPATITISA C	10
2. CITOKINI	12
2.1. ULOGA CITOKINA U ANTIVIRUSNOM ODGOVORU NA HCV INFEKCIJU	13
2.2. TH1 I TH2 ODGOVOR	13
2.3. IMUNOLOŠKA REAKTIVNOST U BOLESNIKA NA KRONIČNOJ DIJALIZI	15
3. HIPOTEZA	16
4. CILJEVI RADA	16
5. BOLESNICI I METODE	17
5.1. BOLESNICI	17
5.2. BIOKEMIJSKI PARAMETRI ODREĐENI U SERUMU	18
6. STATISTIČKA OBRADA	20
7. REZULTATI	21
7.1. KARAKTERISTIKE ISPITANIKA (N = 172)	21
7.2. KONCENTRACIJE CITOKINA U SERUMU BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI	24
7.3. KONCENTRACIJA CITOKINA U SERUMU BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI ZARAŽENIH S VIRUSOM HEPATITISA C	26
7.4. KONCENTRACIJA TRANSAMINAZA, C-REAKTIVNOG PROTEINA I FERITINA U SERUMU BOLESNIKA ZARAŽENIH S VIRUSOM HEPATITISA C	36
7.5. KORELACIJA VREMENJE I SERUMSKIH KONCENTRACIJA CITOKINA U HEMODIJALIZIRANIH BOLESNIKA ZARAŽENIH S VIRUSOM HEPATITISA C	42
8. RASPRAVA	46
9. ZAKLJUČCI	50

10.	SAŽETAK	52
11.	SUMMARY	54
12.	LITERATURA	56
13.	ŽIVOTOPIS	67

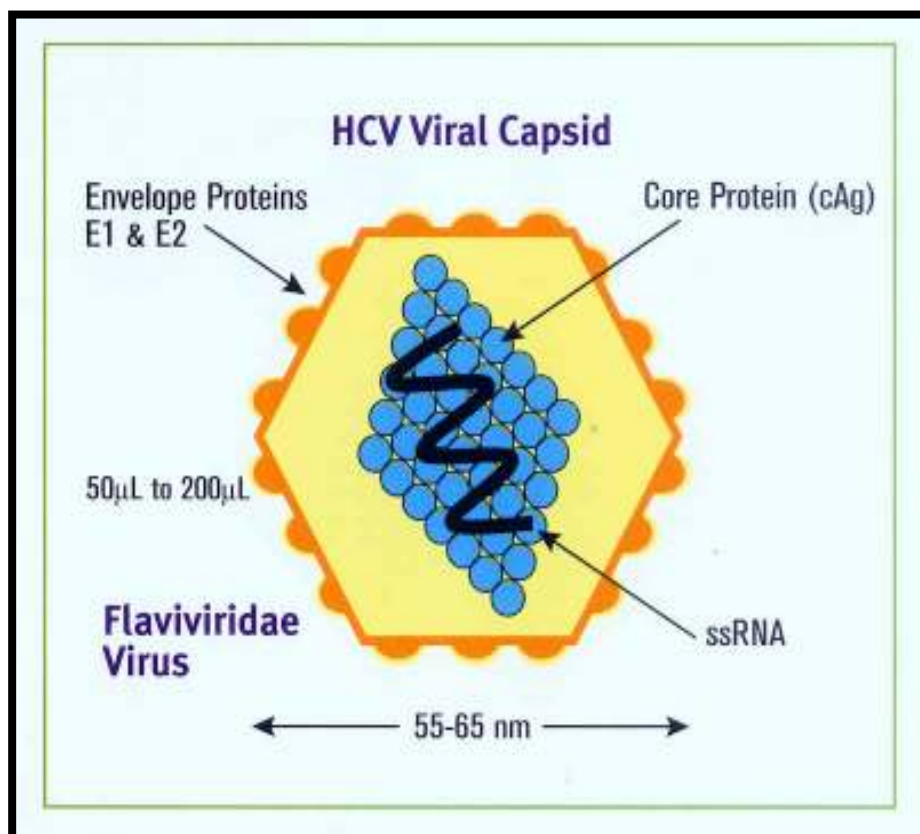
1. UVOD

1.1. Virus hepatitisa C

Virus hepatitisa C pripada skupini Flaviviridae. To je malen RNA virus (30-60 nm u promjeru), koji se sastoji od proteina ovojnice, srži i jednolančane RNA (slika 1).

Genom virusa sadrži 10 000 nukleotida (slika 2). Iz proteina prekursora cijepanjem proteinazom nastaju tri strukturalna proteina (C, E1 i E2/NS1) i četiri nestrukturalna proteina (NS2-NS5).

Tri strukturalna proteina na 5' nekodirajućem završetku HCV genoma čini se da kodiraju nukleokapsidni protein (core) i 2 proteina ovojnice (E) (1, 2).



Slika 1. Struktura virusa hepatitisa C (HCV)

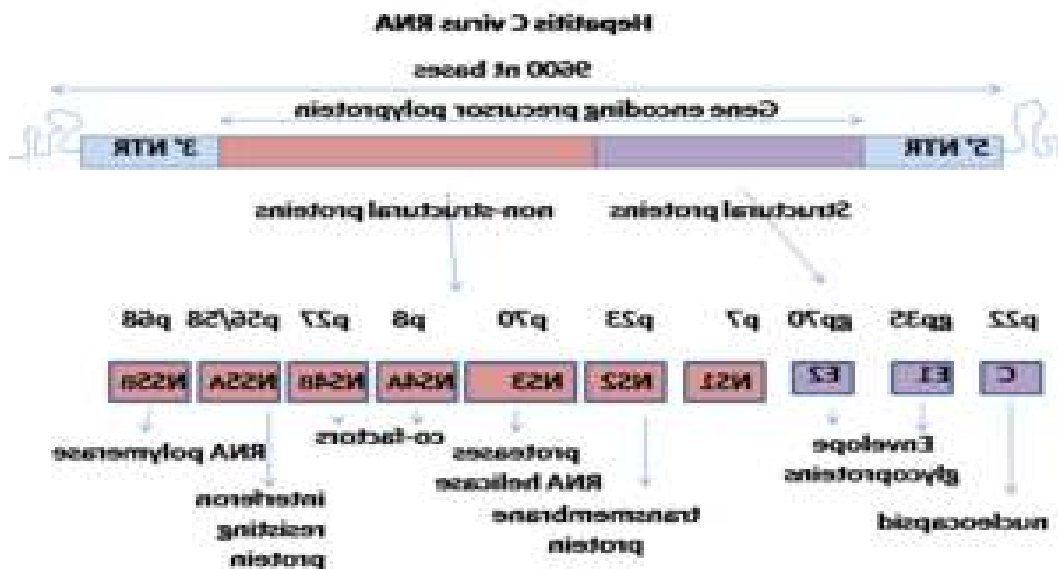
Područja NS2 –NS5 gena daju kod za encime virusa (proteaza-helikaza, polimeraza) i važna su za replikaciju virusa. Virus je kloniran 1989.g.

Uloga pojedinih proteina tek je djelomično razjašnjena (4). Područje 5'-NTR djeluje kao unutarnje mjesto ulaska u ribosom i kontrolira početak prevođenja genoma (5). 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. U području E2 glikoproteina nalaze se dvije hipervarijabilne regije, HVR 1 i HVR2. One su najpodložnije genskim mutacijama a samim time i mjesto najveće mogućnosti virusnog izbjegavanja obrambenim mehanizmima imunološkog sustava zaražene osobe (6). Strukturalne proteine od nestrukturalnih dijeli kratak peptid p7 koji vjerojatno pripada viroporinima. Moguća mu je uloga i u sazrijevanju i oslobađanju virusa (7).

Nestrukturalni proteini (NS) imaju ulogu u umnažanju virusa. Za proteolizu nestrukturalnih proteina služe NS2/NS3 cink-ovisna proteinaza te NS3 serinska proteinaza, koja za djelovanje treba kofaktor, NS4A.

Funkcija NS4B proteina malo je poznata. Predstavlja integralni protein endoplazmatskog retikuluma, koji s endoplazmatskim retikulumom stanice domaćina stvara mrežu i služi kao područje interakcije virusne RNK i proteina stanice domaćina tijekom umnažanja virusa (8). NS5A je višefunkcionalni serinski polifosforilirani protein. Njegove adaptacijske mutacije značajno pojačavaju učinak umnažanja virusa te je u interakciji s različitim staničnim proteinima (9). NS5B je RNK-ovisna RNK polimeraza (10). 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 (11).

Kad cirkulira krvlju, veže se za receptore u jetrenom tkivu. Smatra se da se veže uz receptore CD81, i SR-B1. Kako su te molekule nađene i drugdje u tijelu nepoznato je po čemu je jetra specifična za HCV (12).



Slika 2. Struktura genoma virusa hepatitisa C

Zbog razlika u ribonukleinskoj kiselini HCV–a postoji 6 genotipova virusa i najmanje 70 podtipova virusa. I ovaj virus kao i svi drugi RNA virusi ima visok stupanj mutacija koje dovode do brojnih varijanti tzv kvazi vrsta (engl quasispecies). Kvazi vrste se razlikuju u genomu za manje od 10%, dok su kod genotipova razlike u genomu 20%. Zbog ovakve različitosti među hepatitis C virusima, ne postoji cjepivo protiv te bolesti (2,13).

Najveća je raznolikost svih izolata HCV u proteinima ovojnice.

Glikoproteini ovojnice virusa hepatitisa C, E 1 i E2 potiču stvaranje zaštitnih neutralizirajućih antitijela. Glavno područje odgovorno za stvaranje neutralizirajućih antitijela je hipervarijabilna regija 1 (HVR 1) na E2/NS regiji. Područje HVR1 smješteno na terminalnom kraju E2 može biti adaptivno i povezano je s povoljnim tijekom bolesti jetre kao što je genotip 2, nižim vrijednostima transaminaza i blažim histološkim promjenama u jetri. Razlike u HVR1 regiji vjerojatno odražavaju sposobnost domaćina da kontrolira populaciju virusa. U bolesnika s genotipom 1b široki spektar reaktivnosti serumskih protutijela na HVR1 (anti HVR1) korelira s virusnim opterećenjem i odgovorom na interferon. Područje povezano s osjetljivosti na interferon je na nestrukturinom proteinu 5A (NS5A) HCV genotipa 1b. Sekvencijske razlike u tom području predviđaju odgovor na liječenje interferonom. Kod

«divljeg tipa» virusa nema potpunog odgovora na liječenje interferonom (INF) dok kod mutiranog tipa nalazimo kompletan odgovor na liječenje INF (14,15).

Molekularna tehnika sekvencioniranja virusa 1b prije terapije INF u cilju predviđanja odgovora na liječenje pružila bi praktičnu korist pri čemu bi se uštedjele ogromne količine novaca a izbjegle bi se i nuspojave liječenja (16).

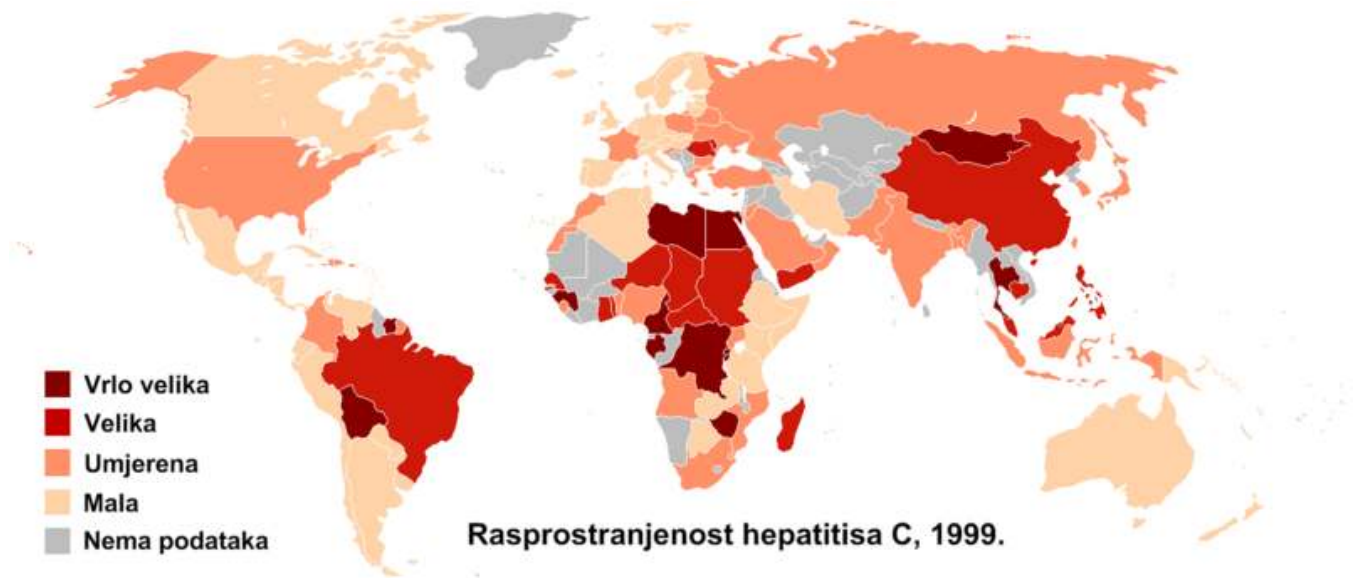
Određivanje kojemu genotipu HCV pripada bitno je zbog prognoze i odgovora na liječenje. Genotipovi 1 i 4 smatraju se rezistentnijim virusima. Način liječenja kroničnog hepatitisa C ovisi o genotipu. Za liječenje kroničnog hepatitisa C uzrokovanog genotipom 1 koristi se kombinacija pegiliranog interferona i ribavirina, dok se za druge genotipove (2 i 3) predviđa davanje ribavirina i konvencionalnog interferona. U Europi prevladava genotip 1b.

U Hrvatskoj prevladavaju genotipovi 1 i 3 (17,18).

1.2. Epidemiologija hepatitisa C u bolesnika na dijalizi

Hepatitisom C zaraženo je 150 do 200 milijuna ljudi u cijelom svijetu i danas je vodeći uzrok transplantacija jetre te je čest uzrok raka jetre (slika 3). Globalna prevalencija hepatitisa C je 2004. g. procijenjena na 2.2%. Za Hrvatsku je procjena da je oko 1,7% populacije (oko 75 000) inficirano HCV virusom. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, godišnje se u našoj državi prijavljuje oko 200 novooboljelih od hepatitisa C (19).

HCV je izoliran iz krvi, sline, urina, sjemene tekućine i ascitesa.



Slika 3. Rasprostranjenost hepatitisa C u svijetu 1999.g.

U Europi i SAD, HCV se najčešće prenosi parenteralnim putem, transfuzijama krvi i krvnih produkata te ubodom inficiranim iglama (iv ovisnici, piercing, tetovaža, slučajni ubod). Transplantacija HCV pozitivnih organa također nosi visok rizik. Rizik prijenosa putem spolnog odnosa u monogamnim heteroseksualnim skupinama je nizak te iznosi svega 0,01%. Rizik se povećava u homoseksualnim zajednicama sa većim brojem partnera, analnim, grubim spolnim odnosom bez zaštite (20).

Rizik za perinatalni prijenos u HCV.RNA pozitivnih majki je oko 5%, osim ako je koinfekcija s HIV–om, tada se penje na 20%.

Rizik kod sporadičnih perkutanih ekspozicija, poput onih kod zdravstvenih djelatnika, iznosi manje od 2.4% (21).

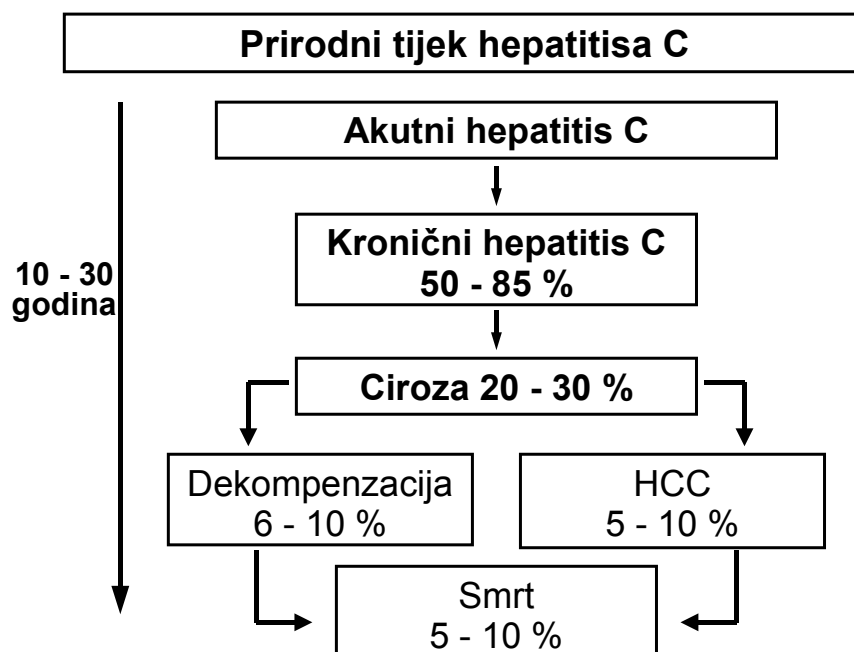
HCV se ne prenosi grljenjem, ljubljenjem, priborom za jelo i dojenjem.

Bolesnici na kroničnoj hemodijalizi (HD) čine, uz intravenske ovisnike najrizičniju skupinu za infekciju s virusom hepatitisa C. Prevalencija hepatitisa C u bolesnika na hemodijalizi kreće se od 2 do 62% (22, 23, 24). Prevalencija hepatitisa C u centrima za dijalizu republike Hrvatske je 12,3%, a incidencija je oko 1%. Prevalencija virusa hepatitisa C (HCV) među dobrovoljnim davateljima krvi u Hrvatskoj 1992.g. iznosila je 1,38% (19). Utvrđen je niz rizičnih čimbenika za HCV infekciju među bolesnicima na hemodijalizi: transfuzije krvi, trajanja završnog stadija bubrežne bolesti i dijalize, tip dijalize (rizik je veći kod bolničke hemodijalize a najniži kod kućne peritonejske dijalize) te broj osoba s hepatitisom C u

pojedinom odjelu za dijalizu. Ranijih godina glavni način širenja hepatitisa C u centrima za dijalizu bile su transfuzije krvi. Danas se smatra da je glavni način širenja HCV u dijaliziranih bolesnika nosokomijalna infekcija, koju najčešće prenose zdravstveni djelatnici rukama (rukavicama) koje su kontaminirane krvlju zaraženog bolesnika. Na taj način zdravstveni djelatnik može prenijeti virus hepatitisa C na kožu drugog bolesnika u kojeg može doći do inokulacije virusa tijekom punkcije arterio-venske fistule (25, 26, 27).

Prijenos dodirrom može se spriječiti higijenom ruku (pranjem ruku), upotrebom jednokratnih rukavica koje treba mijenjati nakon svakog kontakta s bolesnikom. Svaki predmet koji dođe u doticaj s dijaliznim mjestom može se kontaminirati krvlju te postati posrednik u prijenosu HCV drugim bolesnicima (izravno ili preko kontaminiranih ruku osoblja) (28).

1.3. Prirodni tijek hepatitisa uzrokovan virusom hepatitisa C



Akutni hepatitis C

Inkubacija tj. period od ulaska virusa do pojave znakova bolesti, za hepatitis C iznosi prosječno oko 7 tjedana (raspon 4-20 tjedana).

Jedan od najmarkantnijih simptoma hepatitisa je žutilo kože i bjeloočnica. No taj simptom vrlo često izostaje, posebice kod hepatitisa C. U samo 25-30% inficiranih s HCV javljaju se

simptomi bolesti. Oni su vrlo nespecifični i po njima se ne može zaključiti da se radi o upali jetre. U mnogim slučajevima osobe zaražene virusom hepatitisa C ne osjećaju se bolesnim, dok se druge osobe mogu osjećati kao da imaju slabiju gripu koja ne zahtjeva liječenje. Najčešći simptomi su umor, bolnost u gornjem dijelu trbuha, posebice s desne strane, mučnine, povraćanje, gubitak apetita, ponekad povišena tjelesna temperatura, bolovi u zglobovima. Zbog ovih netipičnih znakova bolesti, najveći broj oboljelih se otkrije posve slučajno, tijekom sistematskih pregleda, regrutacije, obrade nekih drugih bolesti i sl. i to uglavnom u fazi kroničnog hepatitisa. Mokraća nekih osoba može postati tamna, bjeloočnice i koža mogu postati žuti. Simptomi hepatitisa mogu nestati nakon nekoliko tjedana, ali to ne treba značiti da je i zaraza također nestala. Upala jetre može se ustanoviti analizom krvi, mjereći dva jetrena enzima alanin-aminotransferaze i aspartat aminotransferaze (ALT i AST). AST i ALT mogu biti povišeni i do 20 puta u odnosu na gornju granicu normalnih vrijednosti kod zdrave osobe. Vrijednosti ALT obično su više nego vrijednosti AST (29, 30). Od 1990.g. moguće je utvrditi u krvi bolesnika biljege hepatitisa C. Radi se o antitijelu na HCV. Serološki testovi koji otkrivaju prisutnost antitijela na HCV mogu pokazati da li je osoba bila u kontaktu s virusom hepatitisa C ali ne mogu ustanoviti da li je osoba aktuelno bolesna i je li prijenosnik te bolesti. Postoje specifični testovi reakcije polimeraze - PCR (polymerase chain reaction) koji utvrđuju prisutnost virusne RNA u krvi zaražene osobe. 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 (30). Prosječno vrijeme do pojave protutijela HCV (anti-HCV) iznosi 8-9 tjedana. U nekih bolesnika nalazimo povećanje gamaglutamil transpeptidaze (gamaGT). Slučajevi akutnog hepatitisa C se vrlo rijetko otkrivaju .

Za razliku od drugih hepatotropnih virusa (HAV, HBV, Epstein-Barr virus, citomegalovirus) velika većina zaraženih s HCV oboli od kronične bolesti i razvije komplikacije bolesti. HCV je uzrok 27% ciroza i 25% hepatocelularnih karcinoma u svijetu (31).

Kronični hepatitis C

Kada upala jetre traje duže od šest mjeseci, bolest se naziva kroničnim hepatitisom C. Klinički tijek kroničnog hepatitisa je podmukao i dugo vremena bez ikakvih simptoma i/ili znakova. Stoga se dijagnoza kroničnog C hepatitisa najčešće postavlja slučajno tijekom pregleda krvi kod rutinskih sistematskih pregleda.

C hepatitis javlja se u tri kliničke slike:

1. Kronični hepatitis s normalnim vrijednostima ALT. Tu grupu čini 25% bolesnika s kroničnim C-hepatitisom. Bolesnici su u pravilu bez simptoma i histološki imaju blaži oblik bolesti u odnosu na one s povišenim ALT. Njih oko 20% ima značajnu fibrozu ili cirozu na histološkim preparatima nakon biopsije jetre.
2. Blagi kronični hepatitis praćen je blagim, fluktuirajućim povišenjem ALT. Bolesnici obično nemaju simptoma, a mogu se tužiti na umor. Histološka analiza tkiva nakon biopsije jetre pokazuje blagu nekroinflamatornu leziju i blagu fibrozu. Ovu grupu čini oko 50% bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Progresija bolesti je spora i rizik razvoja ciroze je nizak.
3. Umjereni i teški kronični hepatitis nalazi se u 25% bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Većina bolesnika iz ove grupe nema simptoma, osim umora koji ne korelira s težinom bolesti. Na histološkim preparatima nakon biopsije jetre vidi se značajna nekroinflamatorna lezija uz uznapredovalu fibrozu katkada i cirozu.

Hepatitis C u 75-85% slučajeva prelazi u kronični oblik karakteriziran trajnim oštećenjem jetre uz mogućnost razvoja ciroze, karcinoma jetre i smrti u razdoblju od 10-30 godina. Da bi se ove, po život opasne komplikacije izbjegle ili barem značajno odgodile, potrebno je provesti liječenje nakon što se utvrdi kronični hepatitis C. U HCV pozitivnih bolesnika na kroničnoj HD i u bolesnika s transplantiranim bubregom opažen je brži razvoj ciroze (nakon 10 godina trajanja hepatitisa C). Brojna istraživanja potvrdila su povišen relativni rizik od smrti u populaciji HCV pozitivnih bolesnika na HD (31, 32, 33, 34).

1.4. Čimbenici koji utječu na tijek HCV infekcije

Nekoliko čimbenika utječe na to da li će HCV infekcija završiti ozdravljenjem ili prijeći u kronični oblik. Glavni čimbenici lošije prognoze su:

1. karakteristike virusa (genotip: 1b, specifične karakteristike izolata virusa, distribucija kvazispecijesa, virusno opterećenje preko 2×10^6 kopija virusa u ml/seruma) (35).
2. čimbenici povezani s bolesnikom - bolesnici koji akviriraju infekciju u starijoj životnoj dobi imaju brže progredirajući oblik za razliku od onih kod kojih je infekcija nastala u djetinjstvu. Negativan utjecaj na tijek bolesti imaju nadalje: muški spol, imuni status u vrijeme zaraze, HLA Cw 4 genotip, dijabetes, hemokromatoza, infekcija s virusom hepatitisa B. Utvrđeno je da uzimanje alkohola u ovih bolesnika promovira oksidativni stres i dovodi do progresije bolesti. Nadalje, uzimanje alkohola umanjuje učinak interferonskog liječenja. Pretilost je također negativan i neovisan (s obzirom na genotip ili prisutnost ciroze) prediktor odgovora na terapijski postupak.
3. način širenja virusa - poslijetransfuzijski hepatitis nosi veći rizik za razvoj ciroze (36, 37, 38).

1.5. Imunoreakcija domaćina na virusnu infekciju virusom hepatitisa C

Normalni odgovor na virusnu infekciju je indukcija imunoreakcije koja će dovesti do kontrole infekcije ili eliminacije virusa. Virusna infekcija u «naivnih» osoba (koje se nikada ranije nisu susrele s virusom) inducira odgovor domaćina koji je neposredno nakon zaraze brz i nespecifičan, a zatim odgođen i specifičan (39). Nespecifični odgovor se javlja nekoliko sati nakon pojave viremije i kontrolira virusno opterećenje dok se specifični T i B stanični odgovor javlja nakon nekoliko dana i dovodi do iskorjenjivanja infekcije i stvaranja imunosti (40).

Rani antigen-nespecifični odgovor protiv virusa uključuje neposredno stvaranje i akciju interferona (α i β) od strane inficiranih stanica, aktivaciju komplementa te stanica s Fc receptorima kao npr. stanica prirodnih ubojica (engl. natural killer – NK stanica). Oba interferona pokazuju antivirusnu aktivnost te povećavaju citotoksičnu aktivnost NK stanica. U većine HCV inficiranih razvija se specifična imunost. Na to ukazuje prisustnost anti-HCV protutijela, T i B-stanični odgovor te ekstrahepatičke manifestacije autoimune bolesti (41). Nespecifični odgovor na HCV infekciju uključuje NK stanice, aktivaciju komplementa, interferon te stvaranje citokina i kemokina urođene imunosti. Aktivirane dendritične stanice pobuđuju diferencijaciju naivnih limfocita T u virus specifične CD4⁺ i CD8⁺ limfocite T. CD4 molekule su biljeg pomoćničkih limfocita T, koji prepoznaju antigen vezan za molekule razreda II glavnog sustava tkivne snošljivosti - MHC (prema eng. major histocompatibility complex), a CD8 molekule su biljeg citotoksičnih limfocita T (CTL) i prepoznaju antigen vezan za MHC molekule razreda I (42, 43). Ta podjela međutim nije stroga i postoje preklapanja. Iznimno CD4 limfociti T mogu pokazivati citolitička svojstva, a CD8 limfociti T proizvoditi regulacijske citokine koji su inače svojstveni CD4 limfocitima T. Specifični imuni odgovor uključuje staničnu (citotoksični T-limfociti; CTL) i humoralnu imunost (protutijela). Premda je HCV osjetljiv na interferon *in vitro*, novije su studije pokazale da HCV može interferirati s njegovom antivirusnom aktivnošću. HCV može suprimirati intracelularnu produkciju interferona zbog inhibitorynog učinka pojedinih nestrukturnih proteina HCV (NS3-NS4A, NS5A) na sekreciju interferona (44, 45).

Također je dokazan inhibitoryni učinak glikoproteina HCV na NK stanice (46). Vezanjem na površinu NK stanica, glikoproteini inhibiraju njihovu aktivaciju, sekreciju citokina i

citotoksičnu aktivnost. Studije in vitro su pokazale da NK stanice bolesnika zaraženih s HCV, imaju smanjenu sposobnost aktivacije dendritičnih stanica u usporedbi sa zdravim osobama.

HCV u većini slučajeva uzrokuje kroničnu infekciju. Točan mehanizam perzistencije virusa još uvijek nije poznat. Smatra se da su CD8⁺ limfociti T glavne antivirusne efektorske stanice u HCV infekciji (47, 48). Oni prepoznaju virusni antigen predodčen molekulama HLA-razreda na antigen-prezentirajućim stanicama (specifično pobuđivanje CD8⁺ limfocita) te na inficiranim hepatocitima. Nadalje, antivirusna aktivnost CD8⁺ limfocita T uključuje citotoksičnost i sekreciju antivirusnih citokina (49).

Tijekom akutne HCV infekcije s eliminacijom virusa, približno 4-8 tjedana nakon infekcije, vidi se vrlo jaki multispecifični (na različite virusne epitope) CD8⁺ T stanični odgovor (50). Međutim, u ranoj fazi infekcije CD8⁺ limfociti ne mogu izlučivati antivirusne citokine kao interferon. U kasnijoj fazi oni ponovno stječu sposobnost produkcije citokina što je povezano s brzim smanjenjem viremije i eliminacijom virusa. Specifični CD8⁺ i CD4⁺ limfociti T perzistiraju godinama nakon infekcije, čak dulje od humoralnog odgovora. Nasuprot tome, u perzistentnoj HCV infekciji odgovor CD8⁺ limfocita je znatno slabiji i nije multispecifičan.

Osim CD8⁺ limfocita T, za uspješnu eliminaciju HCV potrebni su CD4⁺ limfociti T kako bi održali CD8⁺ T stanični odgovor. U kroničnoj je HCV infekciji odgovor CD4⁺ slab ili izostaje, a oštećena je i njihova funkcija tj. smanjena je produkcija IL-2 (51).

Neki HCV proteini pokazuju imunomodulacijski učinak. Opaženo je da protein kapside (C) djeluje na diferencijaciju limfocita T i njihovu funkciju. C protein veže se na receptore za komplement na površini makrofaga i limfocita T što smanjuje produkciju IL-2 i proliferaciju limfocita T (52). Novije su studije dokazale postojanje regulacijskih CD4⁺CD25⁺ T stanica u bolesnika s kroničnom HCV infekcijom koje imaju važnu ulogu u supresiji specifičnog imunog odgovora. Studije in vitro pokazale su da te stanice suprimiraju proliferaciju specifičnih CD4⁺ i CD8⁺ limfocita T kao i lučenje interferona što pospješuje perzistenciju virusa (53). Tijekom HCV infekcije opažene su modifikacije T i B epitopa što omogućuje virusu da izbjegne imunološkom sustavu. Jedan od najvažnijih mehanizama perzistencije su česte mutacije u području HVR-1 te nastanak kvazispecijesa što omogućuje HCV uspješno izbjegavanje imunološkog odgovora. Osim hepatocita, HCV inficira limfocite T i B te oštećuje njihovu funkciju (54).

2. CITOKINI

Citokini su polipeptidi ili glikoproteini, molekularne mase od 6-70 kDa, koje izlučuju različite stanice kao npr. limfociti, makrofagi, fibroblasti, monociti, endotelne i epitelne stanice obično kao odgovor na različite aktivacijske stimulanse a njihovo djelovanje se očituje vezanjem za specifične receptore u samoj stanici i na staničnoj membrani. U citokine spadaju interleukini, kemokini, tumorski čimbenici rasta i interferoni. Ključnu ulogu u specifičnom kao i nespecifičnom antivirusnom odgovoru imaju citokini. Citokini djeluju na razini komunikacije između stanica, koja je neophodna za koordinaciju nespecifičnog i antigen specifičnog imunskog odgovora. Citokini djeluju lokalno i imaju vrlo kratak poluživot (55). Oni su glasnici koji, pored hormona i neurotransmitera, spadaju u vrlo važne čimbenike u komunikaciji između ljudskih stanica. Citokini predaju informaciju ciljnoj stanici, koja izražava odgovarajući receptor. Nastaje aktivacija gena s posljedičnim fenotipskim ili funkcionalnim promjenama ciljne stanice. Sintezu i otpuštanje citokina mogu zaustaviti inhibitori modulirajući biološku aktivnost citokina ili inhibirajući sposobnost odgovora ciljne stanice. Citokini mogu biti pozitivni i negativni regulatori imunskog odgovora. Citokini se ponašaju kao snažne molekule koje se oslobađaju iz stanica, transportiraju se u druge dijelove organizma i djeluju na funkcije drugih stanica što dovodi do brojnih bioloških učinaka (56). Efektorske funkcije tih proteina su aktivacija i diferencijacija stanice, kemotaksija i proliferacija širokog spektra stanica. Aktivnost citokina ovisi o njihovoj koncentraciji u mikrookolišu i jačini ekspresije specifičnih receptora na površini ciljne stanice. Izraz interleukin obuhvaća grupu medijatora odgovornih za međusobno komuniciranje leukocita. Danas poznajemo 29 vrsta interleukina, koji se nazivaju od IL-1 do IL-29. Stvaranje citokina je potaknuto antigen specifičnom aktivacijom limfocita CD4. Limfociti CD4 ili pomoćnički limfociti T i njihovi citokini su glavni regulatori imunološke reakcije. Humani imuni odgovor na infekciju reguliran je ravnotežom između Th1 citokina (IL-2, IFN- γ) i Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-10).

Limfociti CD4 specijalizirani su u prepoznavanju intracelularnih patogena ili njihovih produkata, aktivaciji makrofaga, ostalih limfocita T, limfocita B i NK stanica. Mogu uništiti ciljne stanice kao što su inficirani monociti i makrofagi, pomoću Fas-Fas liganda (FasL)(57).

2.1. Uloga citokina u antivirusnom odgovoru na HCV infekciju

Uloga citokina u obrani od virusnih infekcija je dvojaka - direktna putem inhibicije virusne replikacije i indirektna određivanjem predominantnog puta odgovora domaćina na virusnu infekciju (58). S druge strane, u kontekstu upalnog odgovora protiv virusa citokini mogu dovesti do oštećenja jetre. Postoje oprečna mišljenja o tome da li HCV ispoljava svoje učinke primarno putem citopatogenog učinka koji je opažen u staničnoj kulturi ili je imunosna reakcija dominantna u razvoju bolesti. Čini se ipak da imuni odgovor na HCV određuje težinu bolesti odnosno nekrozu hepatocita, fibrozu te uzrokuje razvoj ciroze i hepatocelularnog karcinoma. Pomagački limfociti T (Th) imaju središnju ulogu u kontroli imunog odgovora na virus hepatitisa C. Limfociti Th su bitni za aktivaciju dendritičkih stanica. Stimulacija CD40 biljega na dendritičkim stanicama putem CD40 liganda na površini limfocita Th pokreće sintezu IL-12, ekspresiju MHC i kostimulacijskih molekula (59). Pomagački limfociti T mogu aktivirati CD8 citotoksičke limfocite i NK putem Th 1 citokina.

1986. godine Mosman je predložio da se limfociti T4 kategoriziraju prema citokinima koje proizvode (60), u 3 važna tipa stanice, a podjela je bazirana na funkcionalnim karakteristikama limfocita: tip 0 (Th0); tip 1 (Th1); tip 2 (Th2).

Tip 0 (engl. *T helper 0* – Th0) limfociti T4, koji se ne polariziraju u Th1 ili Th2 fenotip i mogu lučiti proinflamatorne (IFN- γ) i antiinflamatorne citokine (IL-4). Nastaju iz nezrelih limfocita T4. Th0 subpopulacija izlučuje IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ i IL-10.

2.2. TH1 i TH2 odgovor

Tip 1 (engl. *T helper 1* - Th1) limfociti T4 (CD4+) koji izlučuju IL-1, -2, -3, IFN- γ , TNF- β i GM-CSF, ali ne IL-4, -5 ili -6. Važne su im funkcije reakcija kasne preosjetljivosti, aktivacija makrofaga i reakcije stanične citotoksičnosti. Limfociti Th1 su proinflamatornog fenotipa.

Tip 2 (engl. *T helper 2* - Th2) limfociti T4 koji luče IL-3, -4, -5, -6, -9, -10 i GM-CSF, ali ne IL-2 ili IFN- γ . Suraduju s limfocitima B, stimuliraju sekreciju IgE, aktiviraju bazofile i mastocite i inhibiraju makrofage. Limfociti Th2 su antiinflamatornog fenotipa reakcije stanične citotoksičnosti.

Osim CD4 pomagačkih limfocita T i CD8 supresijski limfociti T mogu lučiti citokine Th 1 i Th2. Citokini tipa 1 i 0 podupiru stanični imuni odgovor dok su citokini tipa 2 uključeni u

protutijelima posredovanu imunost - humoralnu imunost. Smatra se da je stanična imunokrekcija povezana s eliminacijom HCV, budući da su CD8 citotoksički limfociti T glavne efektorske stanice koje prepoznaju i liziraju virusom inficiranu stanicu, a da je humoralna imunoreakcija odgovorna za razvoj kronične HCV infekcije (61,62). Prevladavanje citokina tipa 2 u kroničnom hepatitisu C doprinosi persistenciji virusa zbog inhibicije proliferacije limfocita T, ekspresije receptora za IL-2 (IL-2R), ekspresije gena glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engleski major histocompatibility complex-MHC) i smanjenog kapaciteta monocita za prezentaciju antigena (63, 64). Limfociti CD4 prepoznaju antigen predan pomoću glavnog sustava tkivne snošljivosti (*engl. major histocompatibility complex – MHC*), a oni Th1 i Th2 populacije mogu postati citotoksični nakon što prepoznaju peptide, koje prezentira MHC sustav. CD8 limfociti T prepoznaju virusne peptide vezane za MHC na površini inficiranih stanica i potom ubiju inficiranu stanicu indukcijom apoptoze putem sekrecije perforin - granzima ili putem Fas - Fas L odnosno TNF-TNFR. Oba puta aktiviraju kaspaznu kaskadu i dovode do fragmentacije jezgre i stanične apoptoze. TNF posredovana apoptoza je sporija i može inducirati NF kB aktivaciju i ekspresiju gena za preživljavanje stanice (65).

Rezultati studija koje su ispitivale razine Th 1 i Th 2 citokina u HCV infekcijama su oprečni. Neki su autori našli povećani Th 2 odgovor u bolesnika s kroničnim hepatitisom C, dok su drugi našli povećanu populaciju Th 1 limfocita i povećano stvaranje Th 1 citokina nakon mitogene stimulacije limfocita u bolesnika s kroničnim hepatitisom C (62, 63, 64, 65). U bolesnika s kroničnim hepatitisom C i viremijom smanjeno je stvaranje interleukina 12 (IL - 12) i INF- γ u usporedbi sa zdravim HCV seropozitivnim osobama (66). Nije nađena razlika u stvaranju IL-2, IL-10 i IL-12 između hepatitis C pozitivnih bolesnika i zdravih kontrola, dok IL-4 nije nađen niti u zdravim niti u hepatitis C pozitivnih bolesnika. Bolesnici koji su se oporavili od hepatitisa C (anti-HCV pozitivni ali HCV-RNA negativni) pokazuju snažan multispecifičan CD4 T stanični odgovor na sve HCV proteine. Nasuprot tome, u bolesnika s kroničnim hepatitisom C imunoreakcija je slaba ili je uopće nema na nestrukturane proteine virusa a samo trećina njih pokazuje odgovor na HCV core protein (67, 68, 69, 70). Bolesnici s kroničnim hepatitisom C pokazuju nedostatan prekursorski CTL odgovor za eliminaciju virusa ali on može ubiti neke inficirane hepatocite i uzrokovati kronični hepatitis. HCV može poremetiti preradbu i prezentaciju antigena na hepatocitima i tako smanjiti njegovu vidljivost za imunski sustav (71, 72).

2.3. Imunološka reaktivnost u bolesnika na kroničnoj dijalizi

Bolesnici na kroničnoj hemodijalizi pokazuju brojne poremećaje imunološke reaktivnosti.

Opisan je nedostatan T stanični imuni odgovor nakon cijepljenja. Samo 60% HD bolesnika ima pozitivan tuberkulinski test. Loš je odgovor na cjevica s antigenima ovisnim o limfocitima T, kao što su gripa i hepatitis B (73). Suprotno tome, dobar je odgovor na cjevica koja sadrže velike polisaharidne molekule koje mogu direktno stimulirati limfocite B na stvaranje protutijela, kao npr. cjepivo protiv pneumokoka ili stafilokoka. Testovi *in vitro* pokazuju da je funkcija limfocita B u smislu proizvodnje protutijela i sinteze citokina u bolesnika s uremijom normalna (74). Kontakt krvi s membranom dijalizatora dovodi do brze produbljene leukopenije nakon početka HD, stvaranja biološki aktivne komponente komplementa C5a, oštećenja funkcije perifernih mononuklearnih stanica (PBMC), neutrofila i monocita te oslobađanja proupalnih citokina od strane PBMC. Citokini se nakupljaju u plazmi bolesnika na HD. U plazmi bolesnika na HD mogu biti povećani citokini IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10 (75, 76). Opisane su povećane razine solubilnog receptora interleukina 2 (sIL-2R) u krvi bolesnika na hemodijalizi, u odnosu na zdrave ispitanike. Oštećenje funkcije limfocita T u HD bolesnika dovodi do neadekvatnog lučenja citokina i odgovorno je za defektan imunološki odgovor (77, 78). Aktivacija limfocita T u bolesnika na HD dovodi do odgovora tipa Th1. Ti citokini zajedno sa citokinima koji su stvoreni zbog bioinkompatibilne membrane ili kontaminanata prisutnih u dijalizatu, uzrokuju sintezu i oslobađanje proteina akutne faze npr. CRP, serumskog amiloida A i fibrinogena. Klinička stanja povezana s lučenjem i oslobađanjem citokina uključuju amiloidozu, malnutriciju i aterogenezu (79, 80, 81).

U HD bolesnika prevladava TH1 odgovor. U tih bolesnika opažen je visok postotak monocita koji luče IL-12 koji potiče TH1 odgovor. Postoji hiperprodukcija proupalnih citokina i neravnoteža aktivacije limfocita T. Nadalje, u hemodijaliziranih bolesnika postoji neravnoteža između proupalnih citokina (IL-1 β , TNF IL-6) i njihovih inhibitora. Poznato je da tip membrane dijalizatora utječe na stvaranje citokina. U bolesnika dijaliziranih na Hemofan i Kuprofan membrani opažene su povećane razine TNF- α i IL-1 te IL-6 (82, 83, 84, 85, 86).

3. HIPOTEZA

Na temelju dosadašnjih istraživanja u bolesnika sa kroničnim hepatitisom C i normalnom bubrežnom funkcijom prevladava tzv Th2 odgovor koji doprinosi persistenciji viremije i razvoju kroničnog hepatitisa. Th2 odgovor opažen je i u HCV pozitivnih bolesnika nakon neuspješne terapije interferonom alfa. Pretpostavljam da će u grupi hemodijaliziranih bolesnika sa kroničnim hepatitisom C i prisutnom viremijom, također prevladavati Th2 odgovor, dok u malobrojnoj grupi bolesnika koji su eliminirali virus (HCV-RNA negativni) očekujem Th1 odgovor.

4. CILJEVI RADA

- a) Utvrditi razlike u serumskim koncentracijama citokina između HCV pozitivnih i HCV negativnih bolesnika na kroničnoj hemodijalizi.
- b) Utvrditi razlike u serumskim koncentracijama citokina između HCV-RNA pozitivnih i HCV-RNA negativnih bolesnika.
- c) Istražiti odnos između cirkulirajućih citokina i jetrenih enzima u HCV pozitivnih bolesnika te njihovu ulogu u patogenezi kronične HCV infekcije.
- d) Istražiti odnos virusnog opterećenja i citokina u bolesnika s kroničnim C hepatitisom.

5. BOLESNICI I METODE

5.1. Bolesnici

U istraživanje su bili uključeni bolesnici na kroničnoj hemodijalizi s kroničnim hepatitisom C koji ispunjavaju slijedeće kriterije (31 bolesnik);

- na kroničnoj hemodijalizi preko 6 mjeseci
- anti-HCV (EIA 3) pozitivni
- Polisulfon dijalizator
- odsutnost kliničkih i biokemijskih znakova akutne ili kronične upale (izuzev HCV infekcije)
- odsutnost alkoholne ili autoimune bolesti jetre
- HBs Ag negativni
- bez imunosupresivne terapije

Bolesnici na kroničnoj hemodijalizi nezaraženi s hepatitisom C poslužili su kao kontrolna skupina (28 bolesnika);

- na kroničnoj hemodijalizi preko 6 mjeseci
- anti HCV negativni
- Polisulfon dijalizator
- odsutnost akutne ili kronične upale
- HBs Ag negativni
- bez imunosupresivne terapije

Svi bolesnici bili su upoznati s istraživanjem i dali su svoj pristanak.

HCV pozitivni bolesnici ovisno o nalazu HCV-RNA i vrijednostima transaminaza podijeljeni su u 3 skupine.

I skupina: HCV-RNA pozitivni s povišenim jetrenim enzimima u serumu (ALT i/ili GGT) u najmanje 2 uzastopne kontrole.

II skupina: HCV-RNA pozitivni s normalnim vrijednostima ALT i/ili GGT.

III skupina: HCV-RNA negativni s urednim vrijednostima ALT i/ili GGT u serumu (7 bolesnika).

Svi bolesnici dijalizirani su 3 puta tjedno po 4-4,5 sata, na monitorima tvrtke Fresenius i bikarbonatnoj dijalizi. Svi bolesnici dijalizirani su na polisulfonskom dijalizatoru. Monitori se nakon svake smjene kemijski dezinficiraju. Podjednak broj HCV pozitivnih i HCV negativnih bolesnika prima eritropoetin.

5.2. Biokemijski parametri određeni u serumu

U serumu bolesnika određena je koncentracija slijedećih citokina:

Interleukina -2 (IL-2), Interleukina 4 (IL-4), Interleukina 6 (IL-6), Interleukina 8 (IL-8), Interleukina 1 α (IL-1 α), Interleukina 1 β (IL-1 β), Interleukina – 10 (IL-10), Interferona gamma (INF- γ), Čimbenika rasta vaskularnog endotela - Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF, Epidermalnog čimbenika rasta - Epidermal growth Factor (EGF), Proteina koji uzrokuje kemotaksiju monocita – Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) i Čimbenika koji uzrokuje odumiranje tumora - Tumor necrosis factor α - (TNF α).

Uzorci krvi za određivanje citokina uzimani su iz arterijske linije prije uključanja na dijalizu. U bolesnika na kroničnoj HD rutinski se svaka 2 mjeseca određuju hematološki i biokemijski nalazi (ureja, kreatinin, urati, elektroliti, ukupni proteini, transaminaze, KKS, sedimentaciju, CRP). Za određivanje citokina upotrijebljen je dio seruma koji se uzima za redovnu rutinsku biokemiju. Dakle nije potrebno posebno vađenje krvi. Svježi uzorci su nakon centrifugiranja biti pohranjeni na - 20⁰ C do određivanja citokina. Zamrznuti uzorci bili su analizirani tzv Biochip Array tehnologijom u RANDOX Lab, Crumlin, United Kingdom (metoda je opisana u Clinical Chemistry 2005; 51:7:1165-1176).

Biochip Array tehnologija se koristi u simultanom kvantitativnom određivanju različitih citokina iz jednog pacijentovog uzorka. Osnovna tehnologija je mikročip tvrtke Randox koji sadrži polja testnih regija sa mobiliziranim protutijelima specifičnim za različite citokine i faktore rasta (prema engl» sandwich chemiluminescent immunoassay»). Analizom uzorka, citokini se vežu za protutijelo vezano za površinu biočipa. U uzorak se potom doda sekundarno protutijelo (konjugirano) koje se veže na drugu funkcionalnu grupu vezanog citokina. Povećana vrijednost citokina u uzorku dovesti će do povećanog vezivanja protutijela vezanog za peroksidazu (HRP) i pojačanja kemiluminiscentnog signala. Svjetlosni signal

generiran iz svake testne regije na biočipu zabilježen je digitalnom tehnologijom i uspoređen s referalnim vrijednostima. Koncentracija citokima prisutna u uzorku izračunata je putem kalibracijske krivulje i prikazana na ekranu.

U svih bolesnika na kroničnoj dijalizi rutinski se svaka 3 mjeseca određuju slijedeći markeri hepatitisa: HbsAg, anti HBs te anti HCV 3. generacija testa Ortho HCV ELISA test system (Ortho Diagnostic Systems, Inc, Raritan, N.J.).

U HCV pozitivnih bolesnika određen je i HCV-RNA kvalitativno PCR tehnikom - Amplicor HCV test Roche te kvantitativno određivanje int. jedinica HCV-RNA u mililitru seruma (Amplicor Monitor test tvrtke Roche).

U HCV-RNA pozitivnih bolesnika određen je i HCV genotip (INNO-LiPA HCV II test – Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium).

6. STATISTIČKA OBRADA

Numeričke varijable testirane su na normalnost raspodjele Kolmogorov - Smirnov testom. Za testiranje razlika između grupa numeričkih varijabli korišteni su parametrijski testovi (t-test, ANOVA) u slučaju normalne raspodjele. Za numeričke varijable čija distribucija odstupa od normalne korišteni su neparametrijski testovi (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis). Distribucije su prikazane tablično i grafički (histogram za distribuciju jedne numeričke varijable, box-plot za usporedbu više numeričkih varijabli, scatter-plot za prikaz korelacija numeričkih i ordinalne varijable, populacijske piramide za prikaz distribucije numeričke varijable prema nominalnoj i pite za distribuciju nominalnih varijabli). Za usporedbu nominalnih kategorijskih varijabli korišteni su Hi-kvadrat i Fisher-ov egzaktni test. Za post-hoc analizu korišteni su Scheffe-ov test i metoda po Bonferroniju. Korelacije numeričkih i ordinalne varijable (logaritam broja kopija virusa) testirane su Spearman-ovim testom korelacije.

Razina statističke značajnosti izabrana je na $\alpha=0.05$.

Za obradu podataka korišten je programski paket STATA/IC ver. 11.02.

7. REZULTATI

7.1. Karakteristike ispitanika (n = 172)

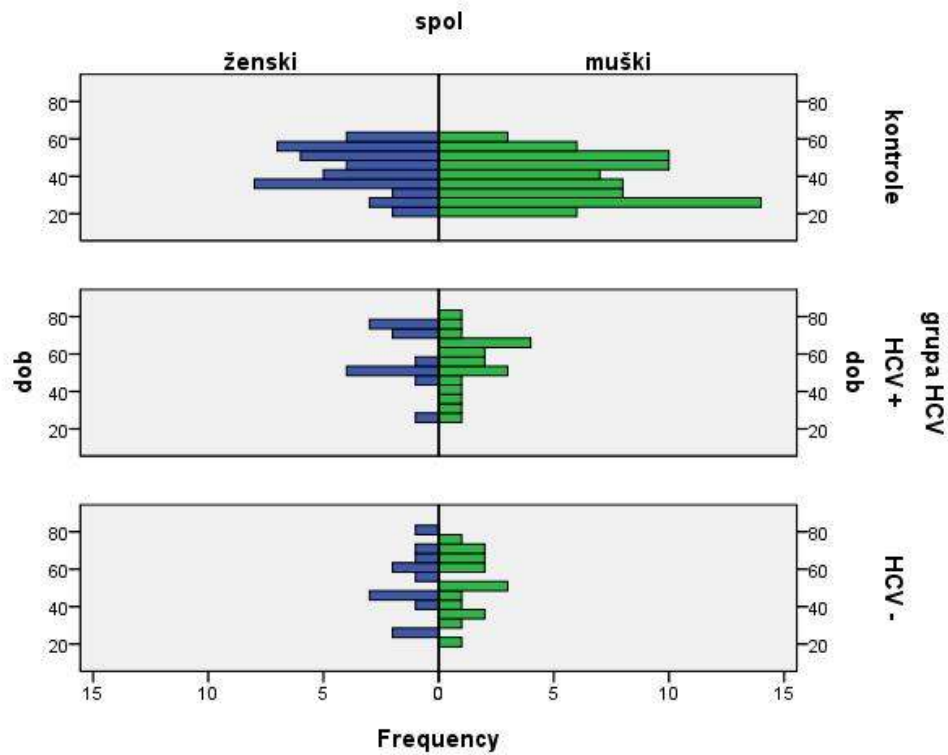
Demografska i klinička obilježja u ispitanika na hemodijalizi i kontrolnih zdravih ispitanika prikazana su u tablici 1 i slici 4.

Zdravi ispitanici su mlađi u odnosu na ispitivane bolesnike na hemodijalizi.

U zdravih ispitanika prevladava muški spol

Tablica 1. Demografska i klinička obilježja ispitanika na hemodijalizi i kontrolnih zdravih ispitanika

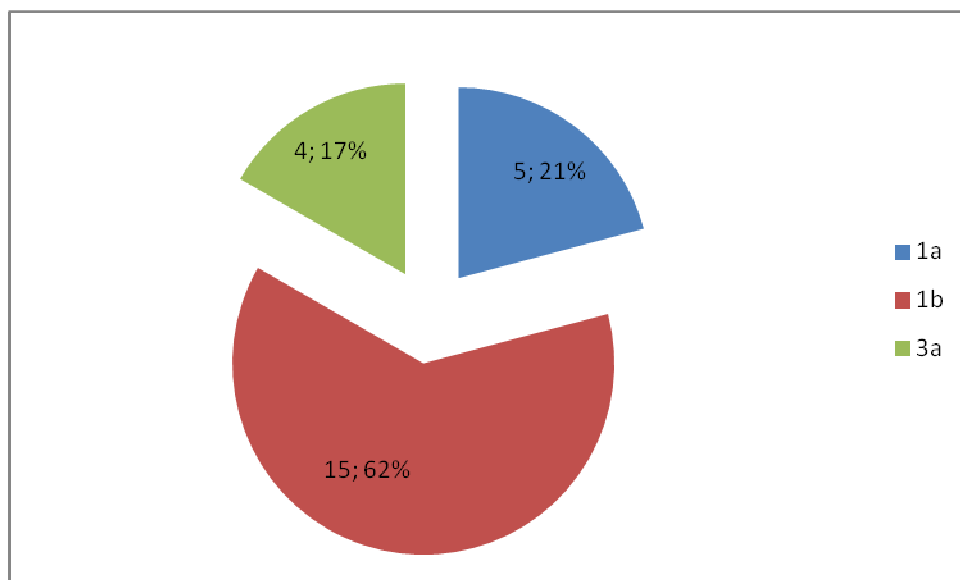
Obilježja	Ispitanici na hemodijalizi	Zdravi ispitanici
broj	59	113
spol (m/ž)	31/28	72/41
dob (godine)	54 ± 16	41 ± 12
HCV -	28	
HCV +	31	
HCV-RNA +	24	
HCV-RNA -	7	
Genotip		
1a	5	
1b	15	
3a	4	



Slika 4. Distribucija prema dobi i spolu zdravih ispitanika i ispitanika na hemodijalizi

Nema razlike u spolu i dobi u hepatitis C pozitivnih i hepatitis C negativnih bolesnika na hemodijalizi.

Zastupljenost pojedinih genotipova virusa hepatitisa C u bolesnika na hemodijalizi prikazana je na slici 5.



Slika 5. Zastupljenost pojedinih genotipova hepatitis C virusa u zaraženih bolesnika

U naših ispitanika na hemodijalizi (slika 5) zaraženih hepatitisom C zastupljenost pojedinih genotipova virusa hepatitisa C odgovara onoj u općoj populaciji. Najzastupljeniji je genotip 1b u 62% HCV pozitivnih bolesnika na dijalizi, zatim genotip 1a u 21% HCV pozitivnih bolesnika te genotip 3a u 17% HCV pozitivnih bolesnika na hemodijalizi.

7.2. Koncentracije citokina u serumu bolesnika na hemodijalizi

Serumska koncentracija različitih citokina u bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika mjerena je na citokinskom mikročipu koji je omogućavao istodobno određivanje više citokina s raznim biološkim funkcijama. Rezultati izmjerenih koncentracija prikazani su u tablici 2.

U ispitanika na hemodijalizi nađena je povišena koncentracija proupalnih citokina IL-1 β ($p < 0,001$); TNF- α ($p < 0,001$); MCP -1 ($p < 0,008$); IL-8 ($p < 0,031$) i IL-6 ($p < 0,001$).

Nasuprot tome, snižena je koncentracija IL-2 ($p < 0,001$); IL-4 ($p < 0,001$) i VEGF ($p < 0,036$). U zdravih ispitanika nađena je povišena serumska koncentracija EGF ($p < 0,001$). Nadalje, nije bilo značajne razlike u koncentraciji INF- γ ($p = 0,692$); IL-1 α ($p = 0,443$) i IL-10 ($p = 0,057$) između zdravih ispitanika i bolesnika na hemodijalizi.

Tablica 2. Serumska koncentracija citokina u zdravih ispitanika i bolesnika na hemodijalizi

citokini	zdravi ispitanici			bolesnici na dijalizi			P
	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	
IL-2	113	4,12	3,27	59	2,59	5,40	0,001
IL-4	113	2,24	2,72	59	1,35	3,86	0,000*
IL-6	113	1,42	3,68	59	14,46	47,78	0,000*
IL-8	113	33,17	48,46	59	42,07	55,68	0,031
IL-10	113	0,28	0,72	59	1,79	5,56	0,057
VEGF	113	219,41	148,58	59	170,91	131,12	0,036
INF-γ	113	1,90	2,60	59	2,26	4,42	NS
TNF-α	113	9,94	17,78	59	10,72	3,66	0,000
IL-1α	113	0,16	0,50	59	0,23	0,95	NS
IL-β	113	0,38	0,79	59	3,71	14,98	0,001
MCP-1	113	329,78	110,58	59	393,70	156,05	0,008
EGF	113	188,52	95,74	59	115,61	125,06	0,000*

*P<0,001, NS – nije signifikantno

7.3. Koncentracija citokina u serumu bolesnika na hemodijalizi zaraženih s virusom hepatitisa C

Hemodijalizirani bolesnici često su zaraženi virusom hepatitisa C. U našoj populaciji bolesnika na hemodijalizi 25% njih je bilo zaraženo s virusom hepatitisa C.

Istražili smo da li kronična infekcija s virusom hepatitisa C dovodi do selektivnih promjena u koncentracijama serumskih citokina u usporedbi sa zdravim ispitanicima.

Rezultati te usporedbe prikazani su u tablici 3 i na slikama 7-13.

Infekcija s virusom hepatitisa C značajno povećava koncentraciju proupalnih citokina IL-6 ($p < 0,001$), TNF- α ($p = 0,012$) i IL-1 β ($p < 0,003$). Nasuprot tome, serumska koncentracija IL-4 ($p = 0,009$) i EGF ($p < 0,001$) značajno je snižena u inficiranih hemodijaliziranih ispitanika. Serumske koncentracije IL-2, IL-8, IL-1 α , IL-10, INF- γ i VEGF značajno se ne razlikuju između hemodijaliziranih ispitanika zaraženih s virusom hepatitisa C i zdravih kontrolnih ispitanika.

Tablica 3. Serumska koncentracija citokina u zdravih ispitanika i bolesnika na hemodijalizi zaraženih s virusom hepatitisa C

citokini	zdravi ispitanici			HCV+			
	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	P
IL-2	113	4,12	3,27	31	4,10	6,81	NS
IL-4	113	2,24	2,72	31	1,55	4,58	0,009
IL-6	113	1,42	3,68	31	18,84	65,62	0,000*
IL-8	113	33,17	48,46	31	35,15	38,89	NS
IL-10	113	0,28	0,50	31	1,44	3,72	NS
VEGF	113	219,41	0,79	31	153,56	82,22	NS
INF-γ	113	1,90	17,78	31	2,36	4,27	NS
TNF-α	113	9,94	110,59	31	10,62	4,08	0,012
IL-1α	113	0,16	0,72	31	0,41	1,28	NS
IL-β	113	0,38	2,60	31	6,16	20,46	0,003
MCP-1	113	329,78	95,74	31	395,01	186,02	NS
EGF	113	188,52	148,58	31	124,44	129,81	0,000*

*P<0,001, NS- nije signifikantno

Usporedili smo i serumske koncentracije citokina hemodijaliziranih ispitanika koji nisu zaraženi virusom hepatitisa C s onima u zdravih ispitanika. Rezultati te analize prikazani su u tablici 4.

Ova podskupina hemodijaliziranih ispitanika također ima značajno povišene koncentracije proupalnih citokina IL-6 ($p < 0,001$); TNF $-\alpha$ ($p < 0,006$) i MCP-1 ($p = 0,039$) te snižene koncentracije IL-2 ($p < 0,001$); IL-4 ($p = 0,012$) i EGF ($p < 0,001$).

Serumske koncentracije IL-8, IL-10, INF- γ , IL-1 α , IL-1 β i VEGF bitno se ne razlikuju između hemodijaliziranih ispitanika koji nisu zaraženi s virusom hepatitisa C i zdravih ispitanika.

Tablica 4. Serumska koncentracija citokina u zdravih ispitanika i bolesnika na hemodijalizi nezaraženih s virusom hepatitisa C

citokini	zdravi ispitanici			HCV-			
	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	P
IL-2	113	4,12	3,27	28	0,92	2,34	0,000*
IL-4	113	2,24	2,72	28	1,12	2,95	0,012
IL-6	113	1,42	3,68	28	9,60	8,51	0,000*
IL-8	113	33,17	48,46	28	49,73	69,73	NS
IL-10	113	0,28	0,50	28	2,17	7,12	NS
VEGF	113	219,41	0,79	28	190,11	169,40	NS
INF-γ	113	1,90	17,78	28	2,16	4,66	NS
TNF-α	113	9,94	110,59	28	10,82	3,22	0,006
IL-1α	113	0,16	0,72	28	0,03	0,11	NS
IL-β	113	0,38	2,60	28	1,00	1,55	NS
MCP-1	113	329,78	95,74	28	392,25	117,72	0,039
EGF	113	188,52	148,58	28	105,84	121,18	0,000*

* $P < 0,001$, NS- nije signifikantno

Usporedba serumskih koncentracija citokina u hemodijaliziranih ispitanika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitisa C prikazana je u tablici 5 i tablici 6.

Te dvije podskupine hemodijaliziranih ispitanika značajno se razlikuju jedino u koncentraciji IL-2. Naime hemodijalizirani ispitanici koji su zaraženi s virusom hepatitisa C imaju povišenu serumsku koncentraciju IL-2 ($p=0,021$), u usporedbi s ispitanicima koji nisu zaraženi s virusom hepatitisa C.

Tablica 5. Serumski koncentracija citokina u bolesnika na hemodijalizi zaraženih (HCV+) i nezaraženih s virusom hepatitisa C (HCV-)

citokini	HCV +			HCV-			
	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	P
IL-2	31	4,10	6,81	28	0,92	2,34	0,021
IL-4	31	1,55	4,58	28	1,12	2,95	NS
IL-6	31	18,84	65,62	28	9,60	8,51	NS
IL-8	31	35,15	38,89	28	49,73	69,73	NS
IL-10	31	1,44	3,72	28	2,17	7,12	NS
VEGF	31	153,56	82,22	28	190,11	169,40	NS
INF-γ	31	2,36	4,27	28	2,16	4,66	NS
TNF-α	31	10,62	4,08	28	10,82	3,22	NS
IL-1α	31	0,41	1,28	28	0,03	0,11	NS
IL-β	31	6,16	20,46	28	1,00	1,55	NS
MCP-1	31	395,01	186,02	28	392,25	117,72	NS
EGF	31	124,44	129,81	28	105,84	121,18	NS

NS- nije signifikantno

Tablica 6. Serumska koncentracija citokina u bolesnika na hemodijalizi s pozitivnim i negativnim nalazom virusne RNA

citokini	RNA +			RNA -			P
	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	
IL-2	24	3,80	7,65	7	1,76	2,89	0,039
IL-4	24	1,89	5,15	7	0,98	2,68	NS
IL-6	24	22,99	74,37	7	4,61	4,58	NS
IL-8	24	30,07	28,64	7	52,55	62,95	NS
IL-10	24	1,74	4,18	7	0,39	0,67	NS
VEGF	24	145,42	85,60	7	181,48	67,33	NS
INF-γ	24	2,45	4,67	7	2,03	2,73	NS
TNF-α	24	10,75	3,04	7	10,19	6,88	NS
IL-1α	24	0,52	1,45	7	0,06	0,15	NS
IL-β	24	7,87	23,07	7	0,30	0,51	0,083
MCP-1	24	392,39	185,59	7	404,01	202,13	NS
EGF	24	142,90	141,79	7	61,14	33,83	NS

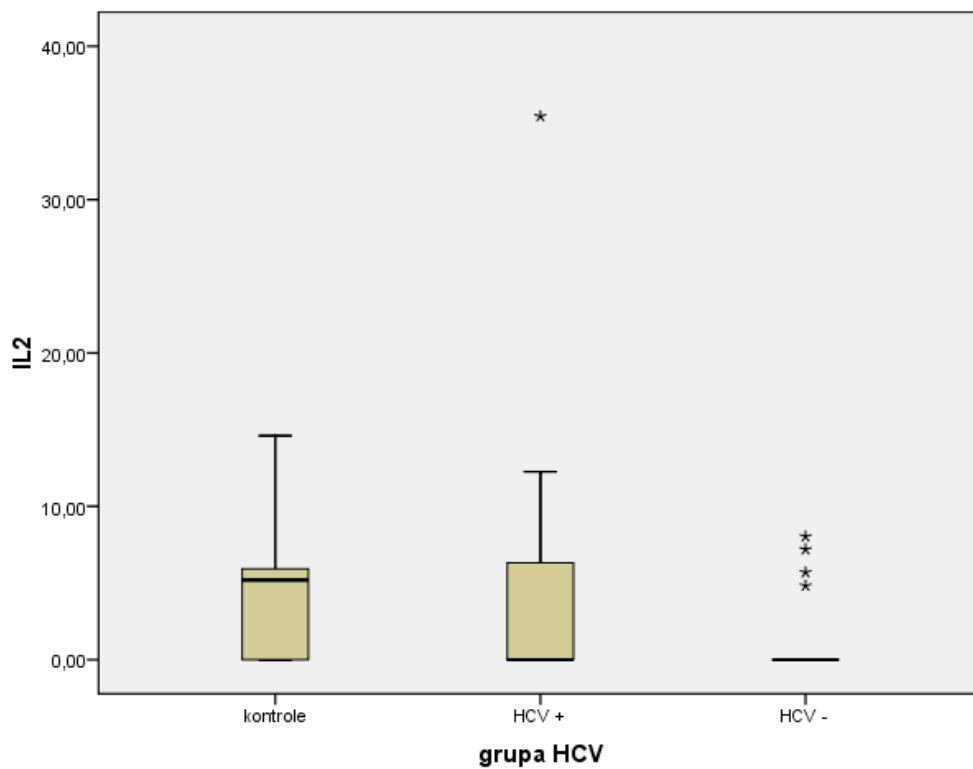
NS- nije signifikantno

Isto tako slaba je povezanost između pojedinih genotipova virusa hepatitisa C i serumske koncentracije citokina (Tablica 7). Sistematska usporedba serumskih koncentracija citokina u hemodijaliziranih ispitanika zaraženih sa različitim genotipovima virusa hepatitisa C otkrila je da je jedino koncentracija TNF- α značajno snižena u ispitanika zaraženih s genotipom 1a u usporedbi s genotipom 1b, odnosno 3a (p=0,014).

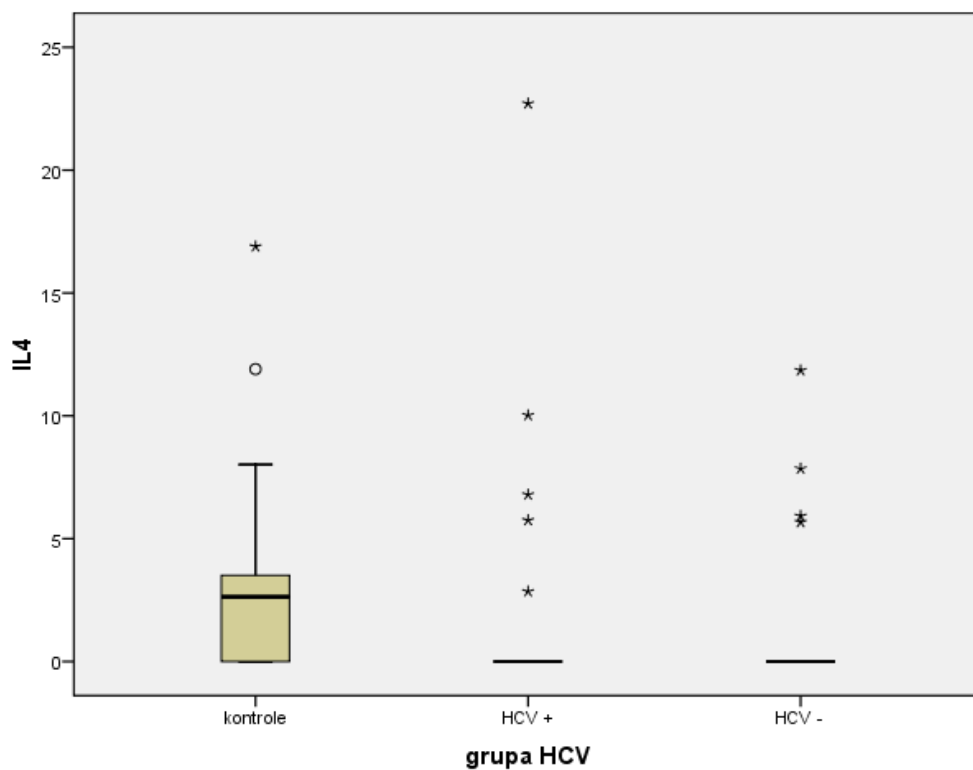
Tablica 7. Serumska koncentracija citokina u bolesnika na hemodijalizi s različitim genotipovima virusa hepatitsa C

citokini	1a		1b		3a		P
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
IL-2	3,73	5,51	3,76	9,09	4,06	4,77	NS
IL-4	1,36	3,04	1,05	2,89	5,68	11,36	NS
IL-6	6,30	4,37	8,87	7,40	96,82	182,75	NS
IL-8	46,32	52,13	24,60	20,61	30,29	9,56	NS
IL-10	0,71	1,03	2,17	5,21	1,41	1,80	NS
VEGF	192,94	152,26	139,89	59,92	106,73	50,98	NS
INF-γ	0,00	0,00	3,64	5,54	1,05	2,11	NS
TNF-α	9,51	1,61	11,03	2,84	11,21	5,17	0,014
IL-1α	0,09	0,21	0,06	0,15	2,79	2,76	NS
IL-β	1,01	1,55	11,29	28,92	3,61	3,83	NS
MCP-1	309,01	167,79	414,96	205,29	411,95	123,35	NS
EGF	104,71	78,56	149,64	163,29	165,38	134,71	NS

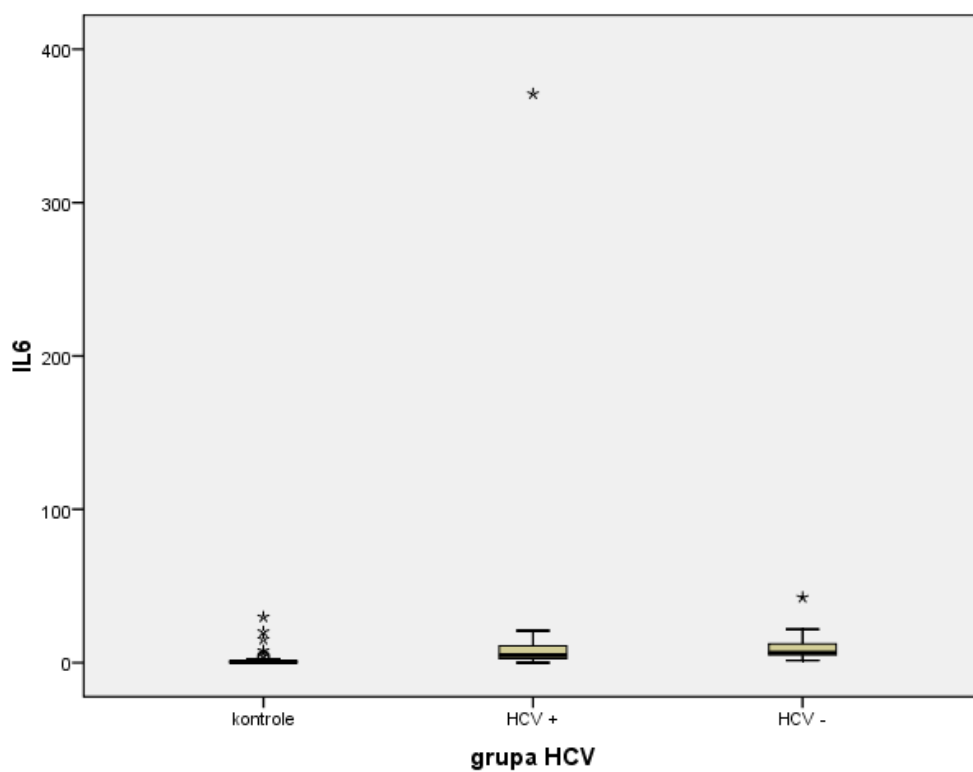
NS- nije signifikantno



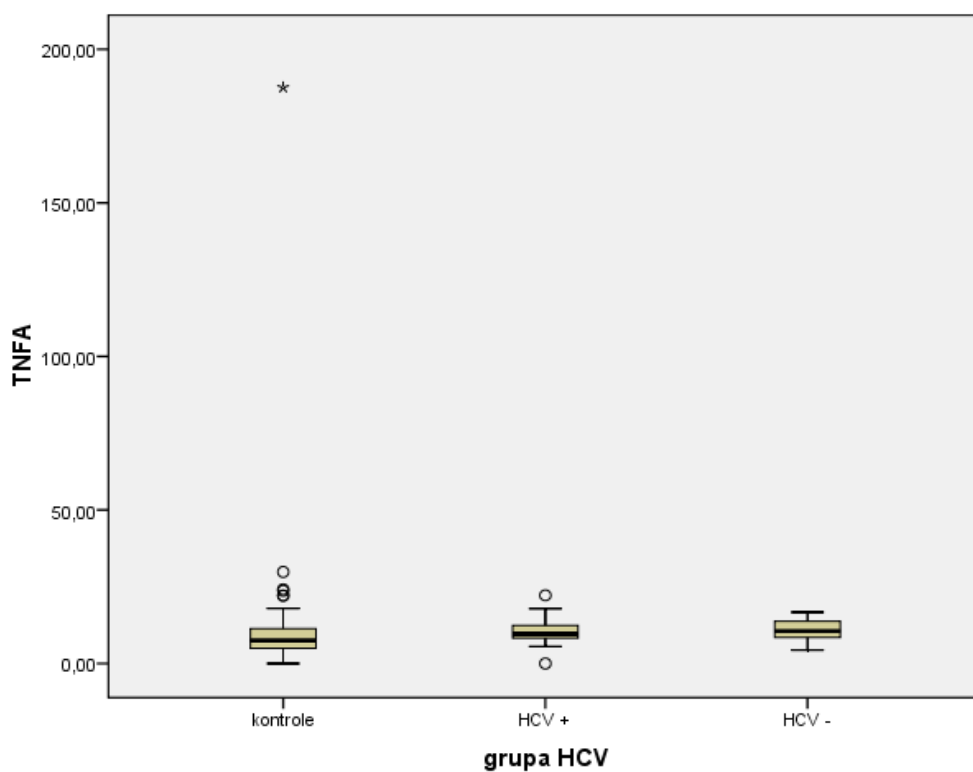
Slika 7. Koncentracija IL-2 u zdravih ispitanika i hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitis C



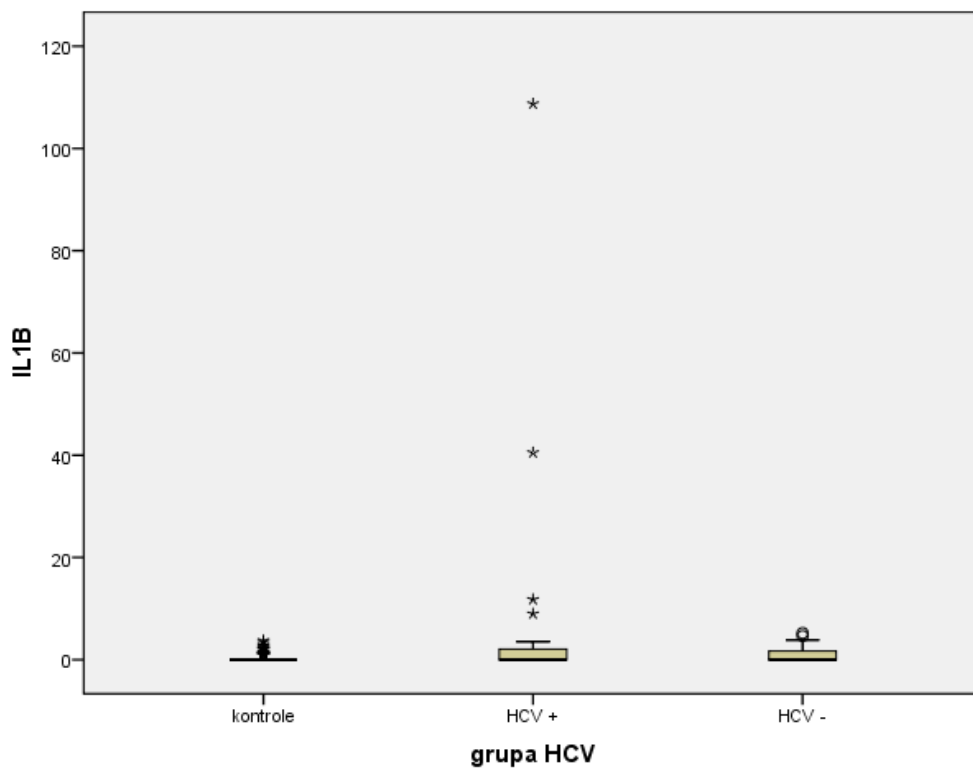
Slika 8. Koncentracija IL-4 u zdravih ispitanika i hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitis C



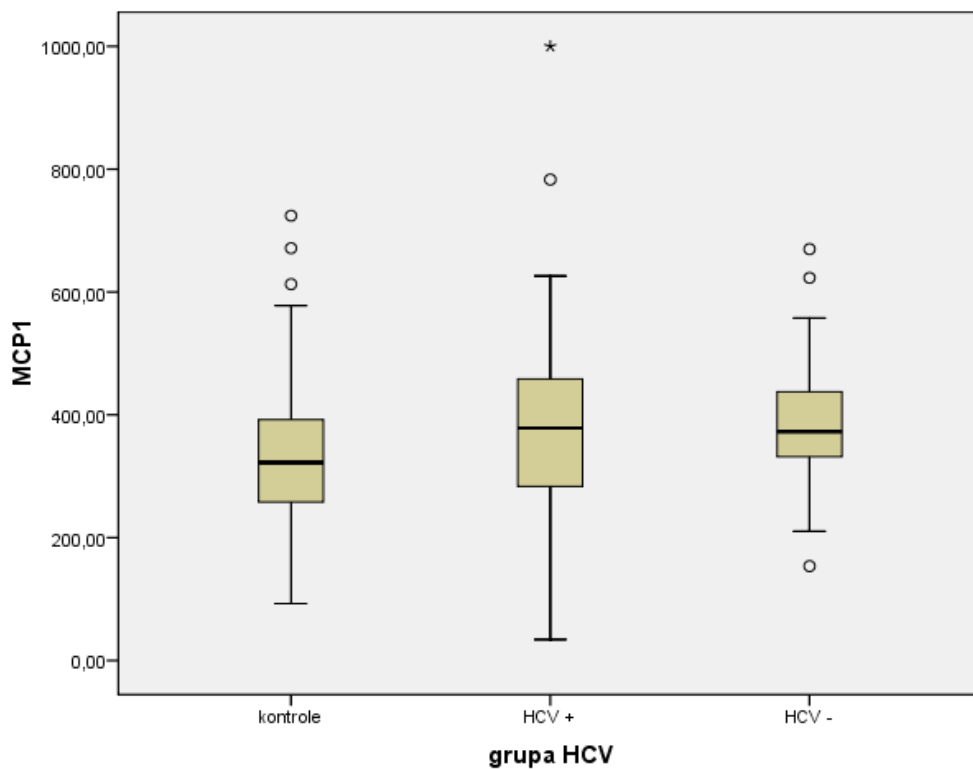
Slika 9. Koncentracija IL-6 u zdravih ispitanika i hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitis C



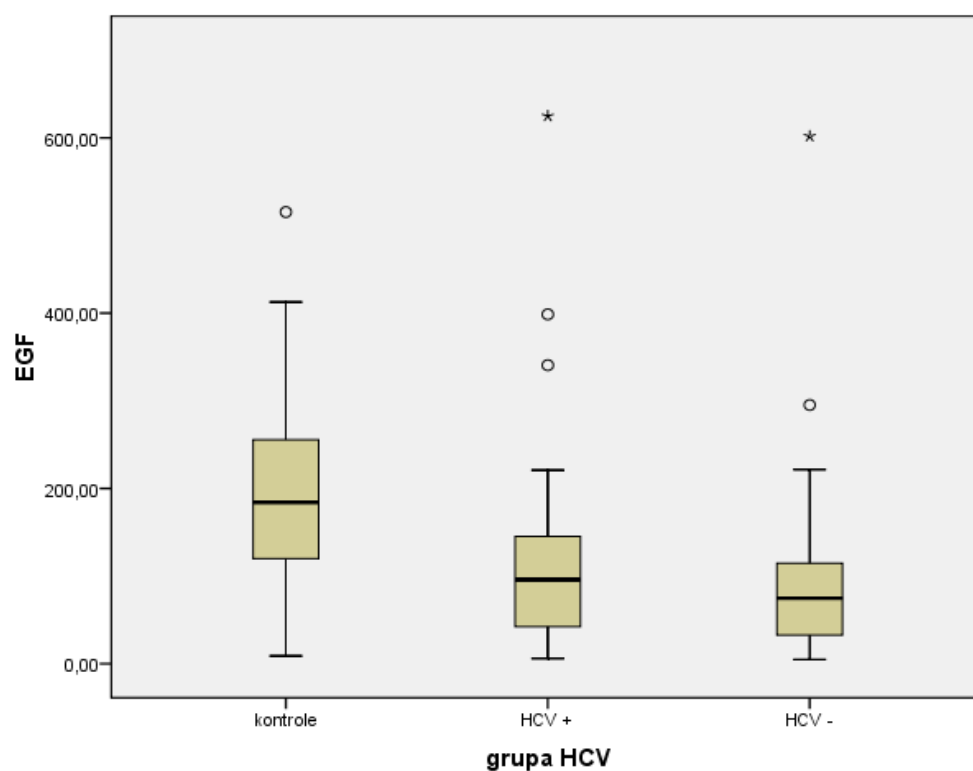
Slika 10. Koncentracija TNF- α u zdravih ispitanika i hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitis C



Slika 11. Koncentracija IL-1 β u zdravih ispitanika i hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitisa C



Slika 12. Koncentracija MCP-1 u zdravih ispitanika i hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitisa C



Slika 13. Koncentracija EGF u zdravih ispitanika i hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitisa C

7.4. Koncentracija transaminaza, C-reaktivnog proteina i feritina u serumu bolesnika zaraženih s virusom hepatitisa C

Serumske koncentracije transaminaza, C-reaktivnog proteina i feritina u hemodijaliziranih bolesnika zaraženih s virusom hepatitisa C prikazane su u tablici 8 i slikama 14,15,16,17,18 i 19.

Zaraženost virusom hepatitisa C ima za posljedicu povišene koncentracije transaminaza ALT ($p=0,001$) i GGT ($p=0,022$).

Razina C-reaktivnog proteina značajno se ne razlikuje s obzirom na razinu u bolesnika koji nisu zaraženi hepatitisom C ($p=0,513$). Drugim riječima zaraženost virusom hepatitisa C ne povećava dodatno razinu CRP. Nasuprot tome, serumska koncentracija feritina značajno je viša u hemodijaliziranih bolesnika koji nisu zaraženi s virusom hepatitisa C ($p<0,001$).

U bolesnika s dokazanom virusnom RNA (Tablica 9) serumske koncentracije transaminaza su povišene u hemodijaliziranih bolesnika s pozitivnom virusnom RNA. Koncentracija C-reaktivnog proteina bitno se ne razlikuje među skupinama, dok je koncentracija feritina značajno povišena u bolesnika s dokazanom virusnom RNA.

Razni genotipovi virusa hepatitisa C ne pokazuju selektivan učinak na serumske koncentracije transaminaza, C-reaktivnog proteina i feritina (Tablica 10).

Tablica 8. Serumska koncentracija transaminaza, CRP i feritina u bolesnika zaraženih virusom hepatitisa C

	HCV +		HCV -		P
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
ALT	40,81	32,54	18,54	8,00	0,001
GGT	44,45	62,18	22,36	17,99	0,022
CRP	3,43	3,60	3,32	2,57	0,513
feritin	436,67	981,81	507,94	242,61	0,000*

*P<0,001

Tablica 9. Serumska koncentracija transaminaza, CRP i feritina u bolesnika s pozitivnim i negativnim nalazom virusne RNA

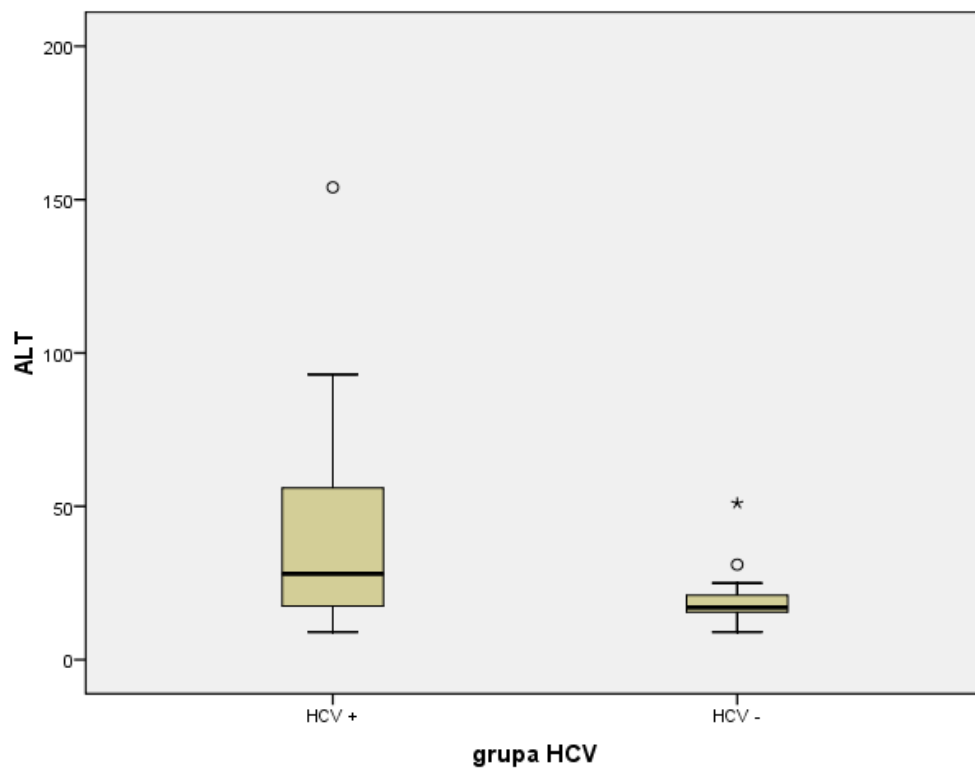
	HCV-RNA +		HCV-RNA -		P
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
ALT	48,00	33,77	18,06	7,30	0,000*
GGT	50,33	69,11	22,74	18,17	0,003
CRP	2,78	2,57	3,78	3,43	0,231
feritin	483,17	111,12	461,80	247,23	0,01

*P<0,001

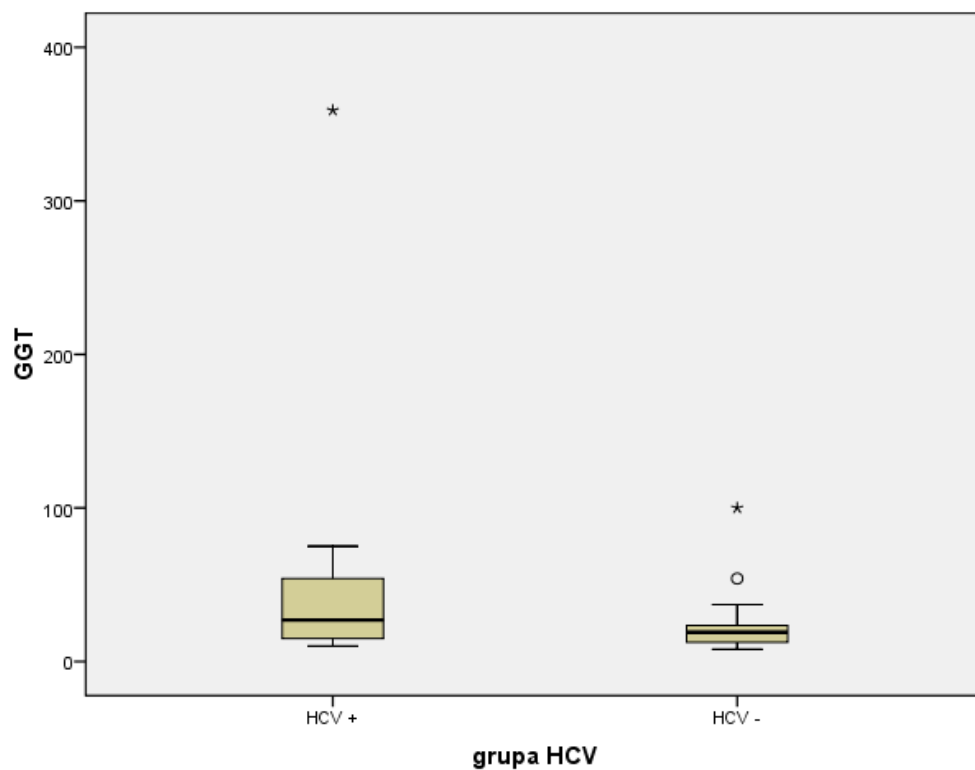
Tablica 10. Serumska koncentracija transaminaza, CRP i feritina u bolesnika s različitim genotipovima virusa hepatitisa C

	1a		1b		3a		P
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
ALT	37,20	31,30	47,46	35,76	62,75	31,35	NS
GGT	28,00	12,083	59,74	86,00	44,0	24,75	NS
CRP	2,84	3,13	2,73	2,45	2,93	3,07	NS
feritin	272,00	64,24	624,67	1405,58	216,53	70,04	NS

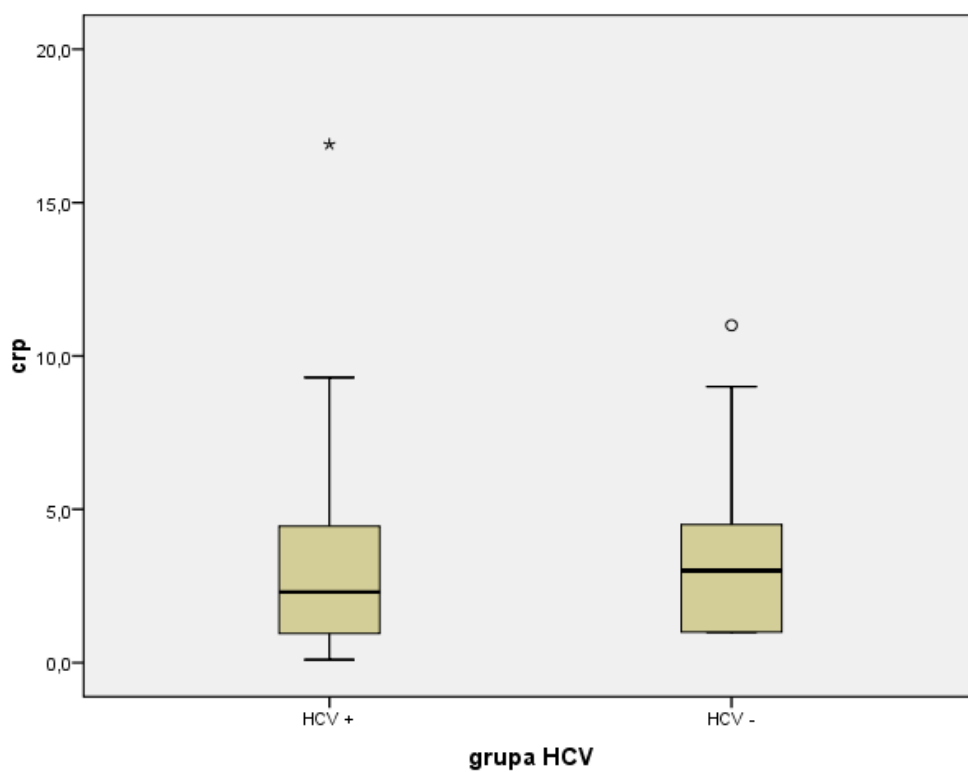
NS- nije signifikantno



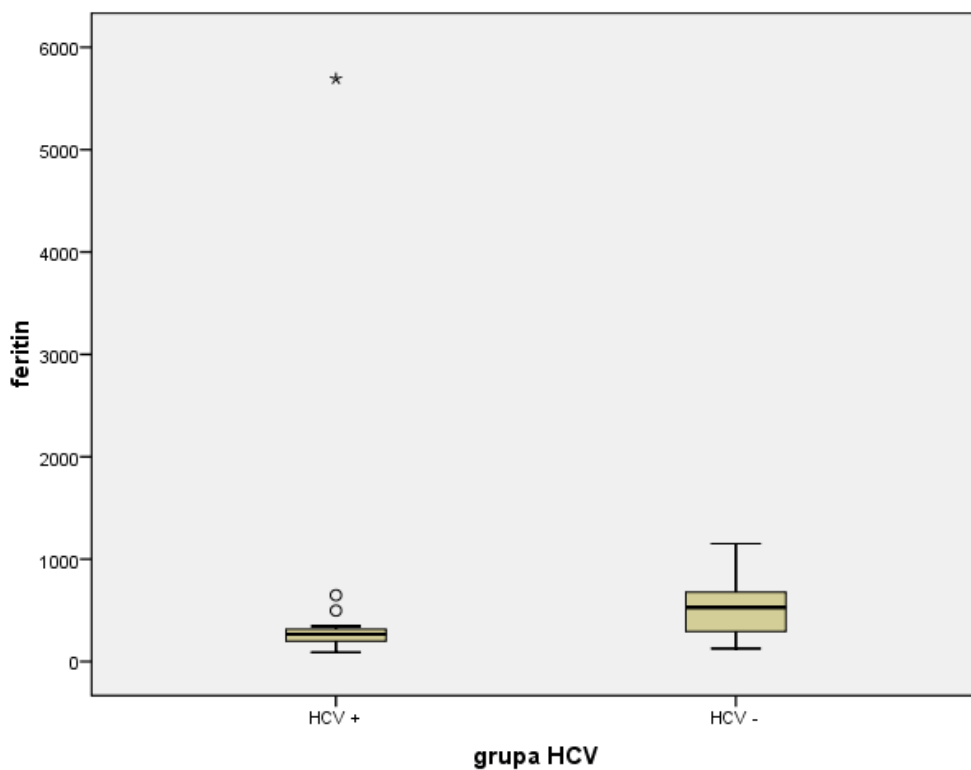
Slika 14. Koncentracija ALT u hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitisa C



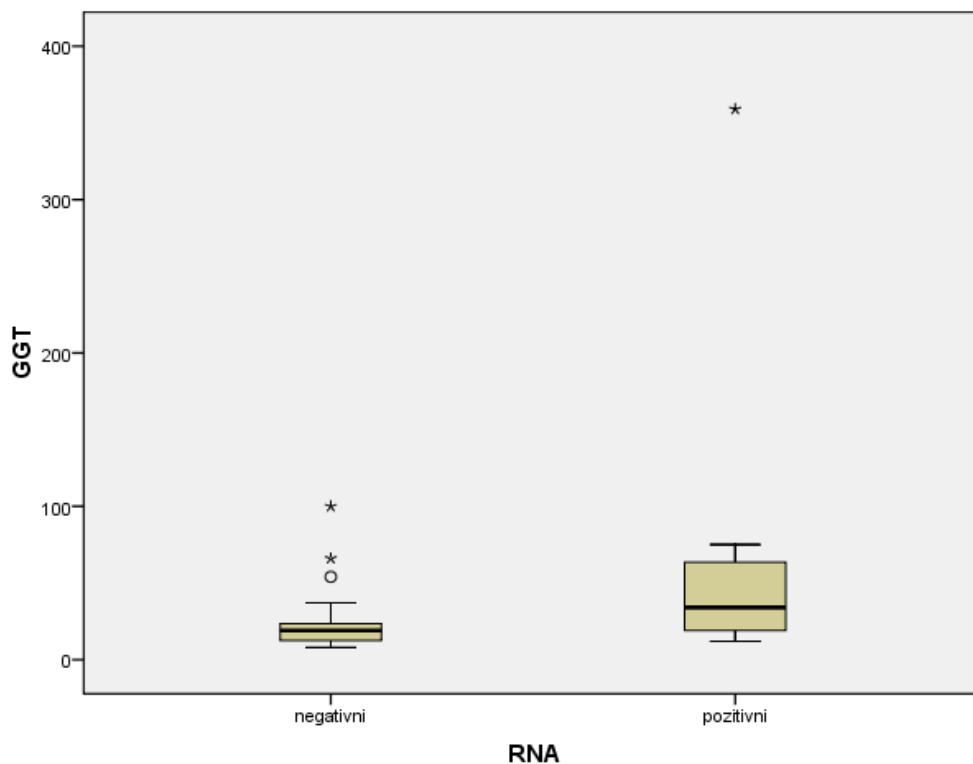
Slika 15. Koncentracija GGT u hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitisa C



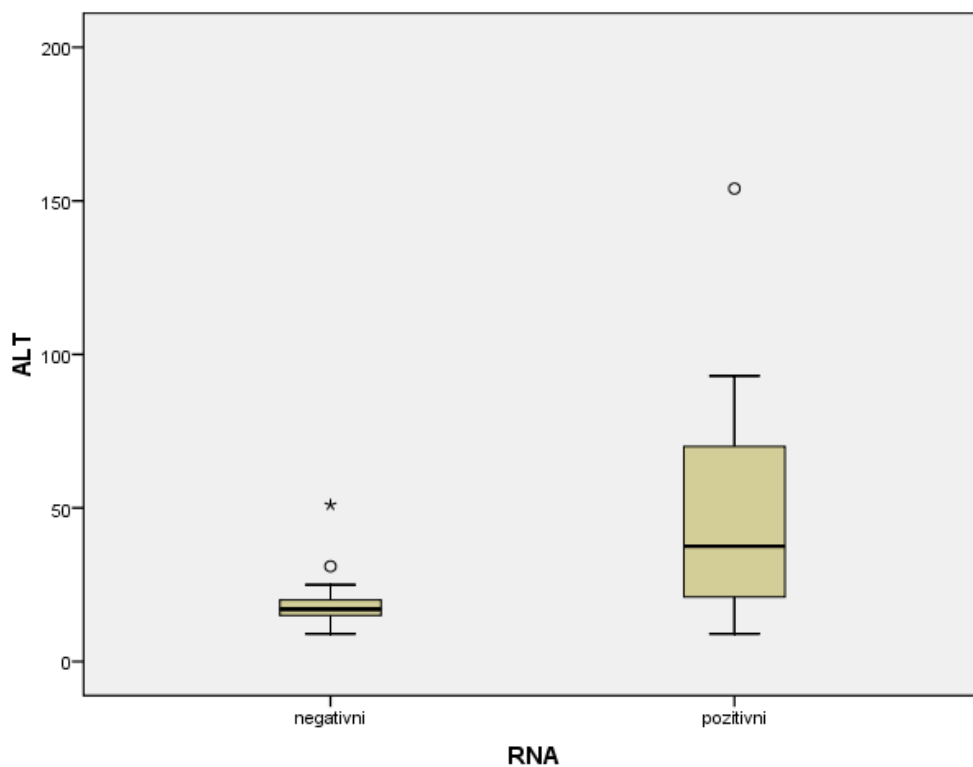
Slika 16. Koncentracija CRP u hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitisa C



Slika 17. Koncentracija feritina u hemodijaliziranih bolesnika zaraženih i nezaraženih s virusom hepatitisa C



Slika 18. Koncentracija GGT u hemodijaliziranih bolesnika s pozitivnim i negativnim nalazom virusne RNA hepatitisa C

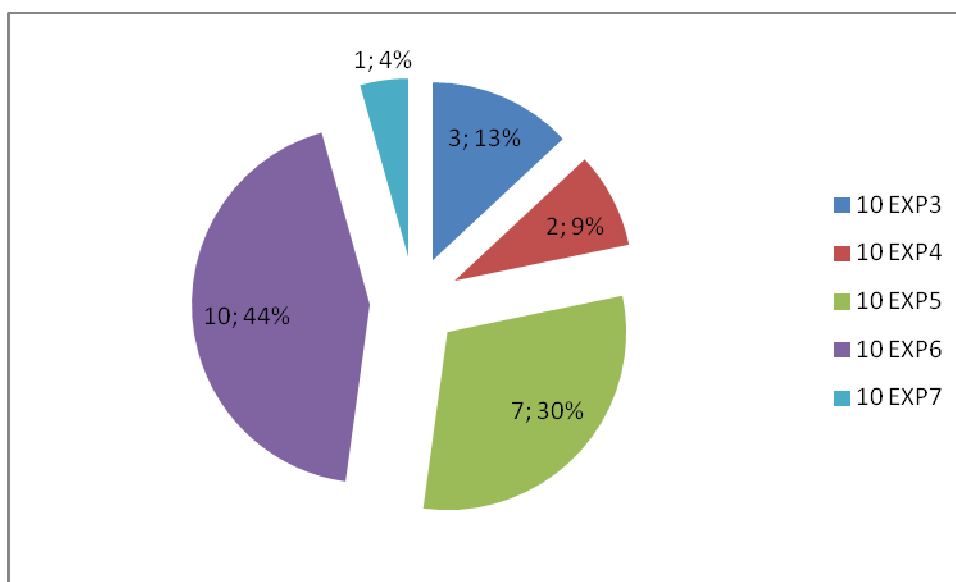


Slika 19. Koncentracija ALT u hemodijaliziranih bolesnika s pozitivnim i negativnim nalazom virusne RNA hepatitisa C

7.5. Korelacija viremije i serumskih koncentracija citokina u hemodijaliziranih bolesnika zaraženih s virusom hepatitisa C

Analizirali smo moguću povezanost viremije (broja kopija virusa hepatitisa C) i serumske koncentracije pojedinih citokina i drugih laboratorijskih parametara. Viremiju smo izrazili kao logaritam broja kopija virusa. Zastupljenost pojedinih logaritama viremije prikazana je na slici 20.

Viremija je u većine bolesnika (74%) iznosila 10^5 i 10^6 . Samo u jednog bolesnika viremija je iznosila 10^7 , a u 13 % bolesnika viremija je iznosila svega 10^3 .



Slika 20. Zastupljenost viremije izražene kao logaritam kopija HCV-RNA u bolesnika na dijalizi

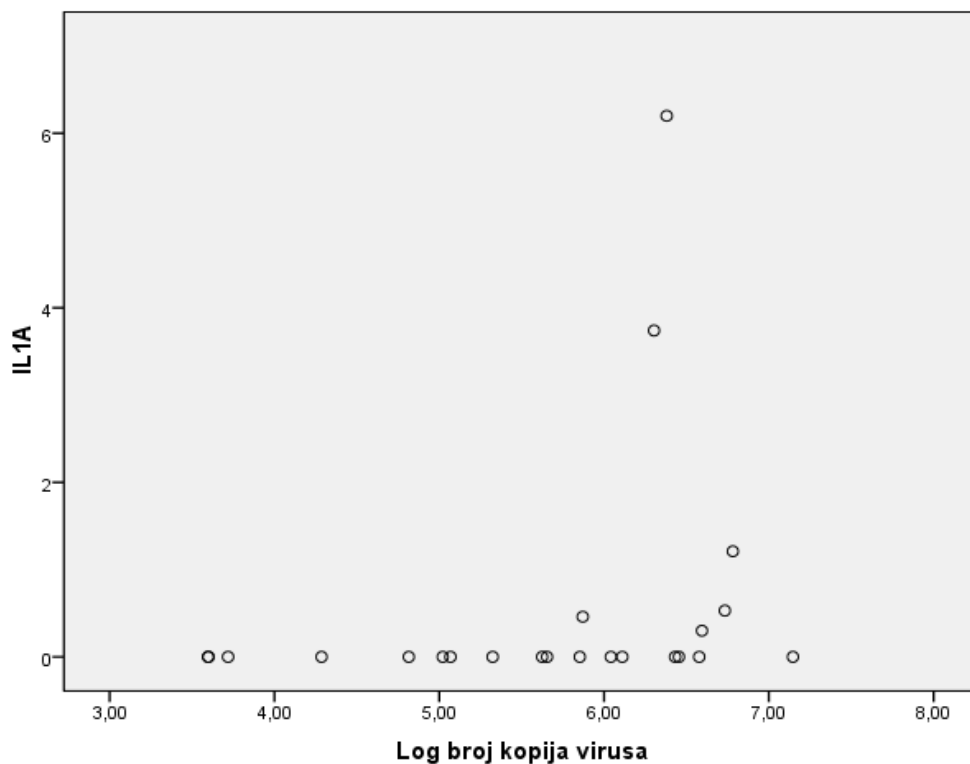
Korelacija viremije i serumske koncentracije IL-10, IL-1 α i ALT grafički je prikazana na slikama 21, 22 i 23, a svi koeficijenti korelacije sa pripadnom razinom statističke značajnosti navedeni su u tablici 12.

Nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između boja kopija virusa i koncentracije IL-10 (p=0,031), IL-1 α (p=0,017), IL-4 (p=0,05) i ALT (p=0,033).

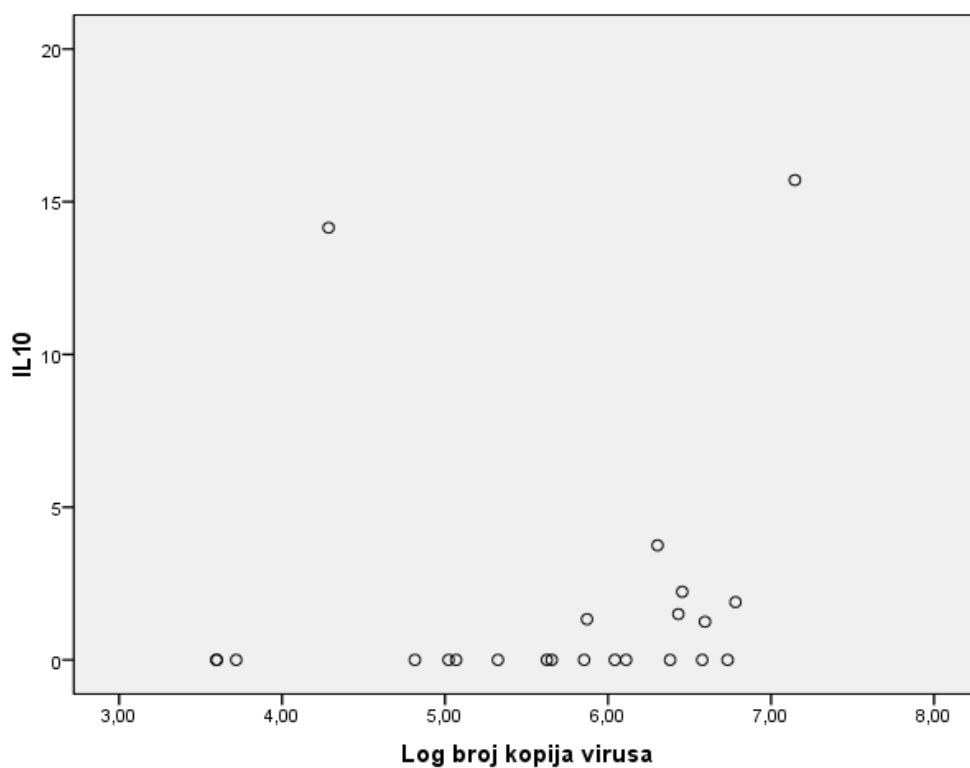
Tablica 12. Koeficijenti korelacije između logaritma broja kopija virusa i koncentracije citokina u hemodijaliziranih bolesnika

	Spearman's rho (N=23)	P
IL-2	0,177	NS
IL-4	0,413	0,050
IL-6	0,189	NS
IL-8	0,215	NS
IL-10	0,451	0,031
VEGF	-0,065	NS
INF-γ	-0,292	NS
TNF-α	-0,197	NS
IL-1α	0,494	0,017
IL-1β	0,345	NS
MCP-1	-0,203	NS
EGF	0,180	NS
ALT	0,446	0,033
GGT	0,311	NS
crp	0,019	NS
feritin	0,074	NS

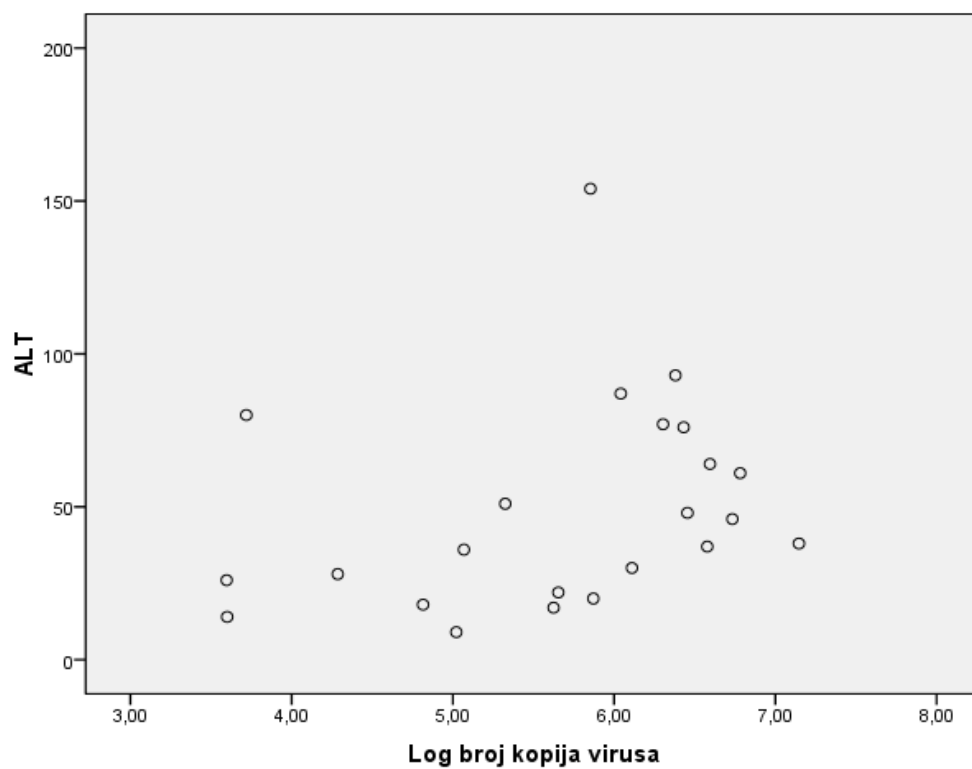
NS- nije signifikantno



Slika 21. Koleracija između broja kopija virusne RNA i koncentracije IL-1 α u hemodijaliziranih bolesnika
(Testirano Spearmanovim testom)



Slika 22. Koleracija između broja kopija virusne RNA i koncentracije IL-10 u hemodijaliziranih bolesnika
(Testirano Spearmanovim testom)



Slika 23. Koleracija između broja kopija virusne RNA i koncentracije ALT u hemodijaliziranih bolesnika
(Testirano Spearmanovim testom)

8. RASPRAVA

Preko 50% osoba s akutnim hepatitisom C razvije kroničnu infekciju koja u 15-20% kronično oboljelih dovodi do ciroze i raka jetre (19, 22, 33). Nekoliko čimbenika utječe na ishod akutne HCV infekcije. Na prvom mjestu je snažna i multispecifična reakcija limfocita T na HCV antigene u akutnoj fazi hepatitisa C, zatim aktivnost citotoksičnih T- limfocita (CTL) protiv HCV epitopa, te genetski čimbenici zaraženog domaćina i genotip virusa (kvazispecijesi), (43, 44, 46). Citokini su medijatori koje luče pretežito limfociti i monociti. Njihova je biološka uloga u komunikaciji između stanica i regulaciji imunskog odgovora. Različiti mehanizmi mogu igrati ulogu u interakciji između virusa i domaćina, a sam virus može izbjeći mehanizme obrane domaćina (43). Jedan od tih mehanizama je inhibicija produkcije Th1 citokina na razini sinteze mRNA posredovanjem virusnog citokina IL-10, koji pokazuje 70% strukturnu homologiju humanom IL-10 (43). Drugi mehanizam je inhibicija sinteze INF u stanicama domaćina (50). Pretpostavlja se da je neuspješnost kontrole HCV infekcije posljedica neadekvatnog lučenja citokina IL-4 i IL-10 od strane monocita-makrofaga i nekih T limfocita. Povišene vrijednosti tih citokina - tzv Th2 citokini nađene su u krvi bolesnika s kroničnim C hepatitisom i one mogu inhibirati stanično posredovani odgovor interferencijom s aktivacijom i funkcijom limfocita T (51, 52).

Rezultati istraživanja citokina u bolesnika s kroničnom HCV infekcijom su kontroverzni. Neki su autori (63, 64, 66, 68, 69,70) našli povišene vrijednosti Th2 citokina u bolesnika s kroničnom HCV infekcijom i zdravim bubrezima. Nasuprot tome, Bergamini i Sarih nisu našli razliku u postotku Th2 limfocita (IL-4, IL-13) između bolesnika s kroničnim hepatitisom C i kontrolne skupine. Oni su naprotiv našli povećano stvaranje Th1 citokina nakon mitogene stimulacije perifernih limfocita HCV + bolesnika.

Napoli i sur. našli su povećane koncentracije INF- γ i IL-2 mRNA u tkivu jetre bolesnika s kroničnim hepatitisom C što bi upućivalo na činjenicu da te citokine stvaraju CD4 limfociti lokalno u tkivu jetre. Koncentracije mRNA - INF- γ i IL-2 korelirale su pozitivno s stupnjem fibroze jetre i portalnom upalom.

U bolesnika na kroničnoj hemodijalizi situacija je puno složenija. Kronična dijaliza u izvjesnoj mjeri modificira normalni imuni odgovor kako T tako i B limfocita, nakon antigene stimulacije, a oštećen je i odgovor T-limfocita nakon cijepljenja (79). U bolesnika koji se dijaliziraju na niskoprotočnim ili tzv. low-flux celuloznim membranama utvrđena je prisutnost preaktiviranih T-limfocita, povišene vrijednosti IL-1, TNF- α , IL-6, inhibitora

citokina (s IL-2R) te sinteza i oslobađanje proteina akutne faze (CRP, serumskog amiloida i fibrinogena) (80, 81, 82, 83).

Rostaing je našao da u bolesnika na hemodijalizi zaraženih hepatitisom C, T limfocitni profil citokina nije zahvaćen prisutnom kroničnom HCV infekcijom. Opažen je slični Th1 i Th2 profil citokina u obje grupe hemodijaliziranih bolesnika. Ti su rezultati dobiveni citokinskom flow-citometrijom. Uspoređujući bolesnike na kroničnoj dijalizi i zdrave dobrovoljce nije našao razlike u intracitoplazmatskoj ekspresiji citokina INF- γ , TNF- α , IL-5, IL-6 i IL-10. Međutim postotak limfocita s IL-2 i IL-4 je bio značajno niži u zdravih dobrovoljaca te je zaključio da limfociti T bolesnika na kroničnoj hemodijalizi pokazuju snažnu ekspresiju Th1 citokina (IL-2, INF- γ , TNF- α) dok je ekspresija citokina tipa 2 marginalna. Nađen je jedino IL-4 u značajnom broju T limfocita. Sličan profil Th1 citokina nađen je i u zdravih dobrovoljaca osim IL-2 koji je bio veći u bolesnika na hemodijalizi. Naši rezultati poklapaju se s rezultatima studije Bergaminija i sur. koji su istraživali razlike u profilu citokina metodom flow citometrije u bolesnika zaraženih virusom hepatitisa C i zdravih dobrovoljaca. Oni su našli povećani postotak Th1 stanica (INF- γ i IL-2) u «naivnih» i memorijskih CD4 i CD8 limfocita T u bolesnika zaraženih hepatitisom C. Mi smo također našli povećane serumske koncentracije IL-2 u bolesnika na hemodijalizi zaraženih hepatitisom C u odnosu na dijalizirane HCV negativne bolesnike. Svi naši bolesnici bili su dijalizirani na sintetičnoj high-flux polisulfonskoj (PS) tzv. biokompatibilnoj membrani steriliziranoj vodenom parom, bikarbonatnoj dijalizi i on-line ultračistim dijalizatom. Time je znatno ograničena mogućnost mikrobiološke kontaminacije i upale. U našem su istraživanju nađene statistički značajne razlike između kontrole i bolesnika na dijalizi u dobi (prosječna dob kontrolne skupine je niža od dobi bolesnika na dijalizi) te u koncentracijama IL-1 β , TNF- α , MCP-1, IL-8 i IL-6. U ispitanika na hemodijalizi povišene su koncentracije navedenih proupalnih citokina, što je u skladu s činjenicom da uremija i/ili dijaliza stimulira produkciju tipa 1 i 2 citokina – posebice proinflammatoryh. Sester i sur. pokazali su da aktivacija T limfocita u bolesnika na hemodijalizi slijedi Th1 obrazac. Drugim riječima ti citokini zajedno s onima čiju produkciju stimuliraju bioinkompatibilne dijalizne membrane i/ili kontaminirani dijalizat, uzrokom su sinteze i oslobađanja proteina akutne faze (CRP, serum amiloida i fibrinogena) te stanja kronične upale u tih bolesnika.

Nasuprot tome u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima snižena je koncentracija IL-2, IL-4, EGF i VEGF. U zdravih ispitanika nađena je povišena serumska koncentracija EGF.

Nije bilo značajne razlike u koncentraciji $\text{INF}\gamma$, $\text{IL-1}\alpha$ i IL-10 između zdravih ispitanika i bolesnika na hemodijalizi.

Usporedbom HCV negativnih bolesnika na dijalizi i zdravih ispitanika našli smo povišene koncentracije proupalnih citokina IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$, MCP-1 , a snižene koncentracije IL-2 , IL-4 i EGF .

Uspoređujući HCV pozitivne bolesnike na hemodijalizi i zdrave ispitanike, HCV pozitivni bolesnici imaju povišene serumske koncentracije IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IL-1}\beta$ a snižene serumske koncentracije IL-4 i EGF . Tu međutim nije bilo razlike u koncentracijama IL-2 i ostalih citokina.

Usporedbom HCV pozitivnih bolesnika i HCV negativnih bolesnika na dijalizi našli smo statistički značajnu razliku u koncentraciji IL-2 te u vrijednostima transaminaza ALT , GGT i feritina. HCV pozitivni bolesnici imali su više vrijednosti IL-2 , ALT , GGT . Bolesnici nezaraženi virusom hepatitisa C imali su više vrijednosti feritina, što bi se moglo objasniti slabijom supstitucijom željeza u bolesnika zaraženih hepatitisom C. Naime u bolesnika na hemodijalizi uobičajena je pojava sideropenija tj. manjak željeza koji nastaje zbog učestalih gubitaka krvi filterima i krvnim linijama za dijalizu, krvarenja iz gastrointestinalnog trakta, slaboj peroralnoj apsorpciji željeza, pa im je u pravilu potrebno nadomještati željezo parenteralnim putem. Kod bolesnika zaraženih hepatitisom C, puno smo oprezniji u davanju željeza zbog opasnosti od gomilanja željeza u retikuloendotelnom sustavu i razvoja hemosideroze pa u njih nastojimo držati feritin na nižim vrijednostima.

Martin i sur. našli su smanjeno stvaranje $\text{INF-}\gamma$ i IL-12 a povećano stvaranje IL-10 u HCV pozitivnih bolesnika na dijalizi u odnosu na HCV pozitivne bolesnike sa zdravim bubrezima. U ovom radu nije određivana koncentracija IL-12 . Nismo našli razliku u $\text{INF-}\gamma$ između HCV pozitivnih i HCV negativnih bolesnika na dijalizi.

Uspoređujući HCV pozitivne bolesnike s viremijom (HCV-RNA+) i HCV pozitivne bolesnike bez viremije (HCV-RNA-), našli smo statistički značajnu razliku u vrijednosti ALT , a najbliži značajnosti bili su IL-2 i $\text{IL-1}\beta$.

Viremični bolesnici imali su više vrijednosti IL-2 i $\text{IL-1}\beta$, u odnosu na sedam HCV-RNA negativnih bolesnika za koje pretpostavljamo da su eliminirali virus s obzirom da su u više uzastopnih kontrola kroz najmanje 2 godine, bili HCV- RNA negativni te da imaju trajno uredne transaminaze. Treba međutim napomenuti da se radi o ipak malom broju ispitanika.

Jačina viremije korelirala je s povećanjem koncentracije IL-10 , $\text{IL-1}\alpha$ i IL-4 dakle s Th2 odgovorom te porastom ALT .

Kada se uspoređuju HCV-RNA pozitivni bolesnici s povišenim i urednim transaminazama nema razlike u koncentraciji citokina između obje grupe što je u skladu s opažanjem drugih autora koji također nisu našli statistički značajnu korelaciju između jetrenih enzima i serumskih koncentracija citokina.

Jednako tako slab je učinak pojedinih genotipova virusa hepatitisa C na serumske koncentracije citokina. U ovom istraživanju našli smo da je jedino koncentracija TNF- α značajno snižena u ispitanika zaraženih s genotipom 1a u usporedbi s genotipom 1b, odnosno 3a ($p=0,014$). Poznato je naime da je genotip 1 b povezan sa težom kliničkom slikom te slabijim odgovorom na terapiju interferonom, za razliku od genotipa 3 a koji ima povoljniji tijek i bolji odgovor na terapiju (37, 38, 39).

U literaturi nismo našli podataka o učinku genotipova virusa hepatitisa C na serumske koncentracije citokina.

9. ZAKLJUČCI

1. Serumska koncentracija proupalnih citokina IL-1 β , TNF- α , MCP-1, IL-8 i IL-6 povišena je u bolesnika na hemodijalizi u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima.
2. Infekcija s virusom hepatitisa C značajno povećava koncentraciju proupalnih citokina IL-6, TNF- α i IL-1 β . Nasuprot tome, serumska koncentracija IL-4 i EGF značajno je snižena u inficiranih hemodijaliziranih ispitanika. Serumske koncentracije IL-2, IL-8, IL-1 α , IL-10, INF- γ i VEGF značajno se ne razlikuju između hemodijaliziranih ispitanika zaraženih s virusom hepatitisa C i zdravih kontrolnih ispitanika.
3. U hemodijaliziranih bolesnika zaraženih s virusom hepatitisa C, nađene su povišene vrijednosti IL-2 u odnosu na nezaražene bolesnike. Viremični bolesnici imali su više vrijednosti IL-2 i IL-1 β u odnosu na bolesnike s negativnim nalazom viremije.
4. Zaraženost virusom hepatitisa C ima za posljedicu povišene koncentracije transaminaza ALT i GGT te feritina.
5. Nije nađena korelacija između koncentracije transaminaza i citokina u serumu bolesnika s hepatitisom C.
6. Jačina viremije povezana je s povećanjem koncentracije ALT te IL-10, IL-1 α i IL-4.
7. Slaba je povezanost između pojedinih genotipova virusa hepatitisa C i serumske koncentracije citokina. Jedino je TNF- α snižen u ispitanika zaraženih genotipom 1 a.
8. Razine C-reaktivnog proteina značajno se ne razlikuju s obzirom na razine u bolesnika koji nisu zaraženi hepatitisom C. Drugim riječima zaraženost hepatitisom C ne povećava dodatno razinu CRP.

9. Određivanje IL-2 u serumu viremičnih bolesnika s hepatitisom C možda bi moglo biti prediktor eliminacije virusa hepatitisa C.

10. U ovom istraživanju nije nađeno povećano stvaranje Th2 citokina u bolesnika zaraženih hepatitisom C na kroničnoj hemodijalizi. Istraživanje nije potvrdilo hipotezu da je nemogućnost iskorjenjivanja kronične HCV infekcije u bolesnika na dijalizi posljedica povećanog stvaranja citokina tipa Th2.

10. SAŽETAK

U ovom istraživanju mjerili smo serumske koncentracije citokina u bolesnika na kroničnoj hemodijalizi zaraženih hepatitisom C.

Cilj istraživanja: utvrditi razlike u serumskim koncentracijama citokina između HCV pozitivnih i HCV negativnih bolesnika na kroničnoj hemodijalizi te razlike u serumskim koncentracijama citokina između HCV-RNA pozitivnih i HCV-RNA negativnih bolesnika. Istražiti odnos između cirkulirajućih citokina i jetrenih enzima u HCV pozitivnih bolesnika te njihovu ulogu u patogenezi kronične HCV infekcije. Istražiti odnos virusnog opterećenja i citokina u bolesnika s kroničnim C hepatitisom.

Bolesnici i metode: u istraživanje je uključeno 31 bolesnika na kroničnoj hemodijalizi s kroničnim hepatitisom C te 28 hepatitis C negativnih bolesnika na kroničnoj hemodijalizi. Kao kontrola poslužilo je 113 zdravih ispitanika.

U serumu bolesnika i zdravih ispitanika određena je koncentracija slijedećih citokina na citokinskom mikročipu: **IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, INF- γ , VEGF, EGF, MCP-1 i TNF- α .**

Rezultati: U ispitanika na hemodijalizi povišena je koncentracija proupalnih citokina IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6 i MCP-1 i VEGF u odnosu na zdrave ispitanike. Nije bilo značajne razlike u INF- γ , IL-10 i IL-1 α . Hepatitis C pozitivni bolesnici imaju značajno povišenu koncentraciju proupalnih citokina: IL-6, TNF- α i IL-1 β a sniženu koncentraciju IL-4 i EGF u odnosu na zdrave ispitanike. U usporedbi s hepatitis C negativnim bolesnicima, hepatitis C pozitivni bolesnici imaju povišenu koncentraciju IL-2.

Genotip hepatitisa C nema značajan učinak na serumske koncentracije citokina osim na TNF- α , koji je značajno snižen u bolesnika zaraženih genotipom 1a.

Zaraženost virusom hepatitisa C ima za posljedicu povišene koncentracije transaminaza ALT i GGT, naročito u bolesnika s dokazanom virusnom RNA. Razine CRP značajno se ne razlikuju između hepatitis C pozitivnih i hepatitis C negativnih bolesnika. Razni genotipovi hepatitisa C ne pokazuju selektivan učinak na serumske koncentracije transaminaza, CRP i feritina.

Zaključak: U ovom istraživanju nije nađeno povećano stvaranje Th2 citokina u bolesnika zaraženih hepatitisom C na kroničnoj hemodijalizi. Istraživanje nije potvrdilo hipotezu da je

nemogućnost iskorjenjivanja kronične HCV infekcije u bolesnika na dijalizi posljedica povećanog stvaranja citokina tipa Th2.

11. SUMMARY

CYTOKINE SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C INFECTION ON REGULAR HEMODIALYSIS

Serum cytokine concentrations were determined in this study in hepatitis C virus infected patients on chronic hemodialysis.

Aims of the study. To determine differences in serum cytokine concentrations between hepatitis C virus (HCV) positive and HCV-negative patients on chronic hemodialysis, and differences in serum cytokine levels between HCV-RNA positive and HCV-RNA negative patients. To investigate the relation between circulating cytokines and liver enzymes in HCV-positive patients and their role in pathogenesis of chronic HCV infection. To study the relation between viral load and cytokines in patients with chronic hepatitis C.

Patients and methods. The study included 31 patients on chronic hemodialysis with chronic hepatitis C, and 28 HCV negative patients on chronic hemodialysis. 113 healthy subjects participated as controls.

In the sera of patients and healthy controls, the concentrations of the following cytokines were determined on a microchip: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, INF- γ , VEGF, EGF, MCP-1 and TNF- α

Results. The concentrations of proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6, MCP-1 and VEGF were higher in subjects on hemodialysis than in healthy subjects. There was no significant difference in INF- γ , IL-10 and IL-1 α levels. HCV positive patients had significantly higher concentrations of IL- 6, TNF- α and IL-1 β proinflammatory cytokines and lower IL-4 and EGF levels than healthy subjects. In comparison to HCV negative patients, HCV positive patients had higher IL-2 concentration. Hepatitis C genotype had no significant effect on the serum level of cytokines except on TNF- α which was significantly reduced in patients with genotype 1a infection.

The consequence of HCV infection is increased concentration of ALT and GGT transaminases, particularly in patients with confirmed viral RNA. CRP levels do not significantly differ between HCV positive and HCV negative patients. Different hepatitis C genotypes do not show selective effect on serum concentrations of transaminases, CRP and ferritin.

Conclusion. Increased formation of Th2 cytokines was not observed in this study in HCV infected patients on chronic hemodialysis. The study did not confirm the hypothesis that the inability to eradicate chronic HCV infection in dialysis patients was the consequence of increased formation of Th2 cytokine.

12. LITERATURA

1. Sherlock S. The hepatic flaviviridae: summary. *J.of Viral Hepatitis* 1999;6 (Suppl1): 1-5.
2. EASL.International Consensus Conference on hepatitis C. Paris 26-28 February 1999. *J.Hepatol* 1999; 30:956-61.
3. Rodes J, Sanchez Tapias JM. Hepatitis C. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl 8): 2-11.
4. Penin Francois. Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2003;7:1-21.
5. Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *Leukoc Biol* 2004;76:743-59.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282:938-941.
14. 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.
15. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ i sur. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-4.
16. 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.
17. 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.
18. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* 2004;85,3173-88.
19. Vucelić B, Hrستیć I, Begovac J i sur. Virusni hepatitis:Hrvatska konsenzusna konferencija. *Acta Med Croatica* 2005; 59:359-75.ž

20. Grahovac B, Bingulac-Popović J, Vucelić B, Hrstić I, Ostojić R, Dražić V, Balića M, Grgičević D. Hypervariable region 1 of hepatitis C virus genome and response to interferon therapy. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:905-10.
21. Bingulac- Popović J, Grahovac B, Zambeli J, Mihaljević I, Dražić V, Pirc-Tiljak D, Petrovečki M, Balića M, Grgičević D. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction among Croatian blood donors and patients. *Period biol* 1998; 100(3):389-394.
22. Lesnikar V. Epidemiologija hepatitisa B i hepatitisa C u Hrvatskoj. *Acta Med Croatica* 2005; 59:377-81.
23. Report of WHO Consultation. Global surveillance and control of hepatitis C. *J of Viral Hepatitis* 1999; 6:35-47.
24. Bruguera M, Sanchez Tapias JM. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl 8): 12-14.
25. Jadoul M. Epidemiology and mechanismus of transmission of the hepatitis C virus in hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl 8): 39-41.
26. Jadoul M. Transmission routes of HCV infection in dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11 (Suppl 4):36-38.
27. Le Pogam S, Le Chapois D, Christen R, Dubois F, Barin F, Goudeau A. Hepatitis C in a hemodialysis unit: molecular evidence for nosocomial transmission. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3040-3043.
28. Izopet J, Pasquier C, Sanders K, Puel J, Rostaing L. Molecular evidence for nosocomial transmission of hepatitis C in a French hemodialysis unit. *J Med Virol* 1999.

29. Slaviček J, Puretić Z, Kalenić S, Rebrović B, Grahovac B, Glavaš-Boras S, Mareković Z, Slaviček V. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients on regular Hemodialysis. *Period Biol* 2000; 102:29-32.
30. Kes P, Slaviček J. Smjernice za sprječavanje i liječenje hepatitisa C u dijaliziranih bolesnika. *Acta Med Croatica* 2005; 59: 483-490
31. Castellano G. The natural history of hepatitis C virus infection. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl 8):19-23.
32. Charlton M. Natural history of hepatitis C and outcomes following liver transplantation. *Clin Liver Dis* 2003; 7:585-62.
33. Ostojić R, Hrstić I. Virusni hepatitis. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, urednici. *Interna medicina*. Zagreb: Medicinska biblioteka, 2008;840-847.
34. Caruntu FA, Benea L. Acute hepatitis C virus infection: diagnosis, pathogenesis, treatment. *J Gastrointestin Liver Dis* 2006; 15:249-56.
35. Nakayama E, Akiba T, Marumo F, Sato C. Prognosis of anti- hepatitis C virus antibody- positive patients on regular hemodialysis therapy. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1896-1902.
36. Slaviček J, Puretić Z, Ostojić R, Glavaš-Boras S, Bubić-Filipi Lj, Šmalcelj R, Mihaljević I, Grahovac B, Barišić I, Šešo-Šimić Đ. Liječenje hepatitisa C alfa interferonom u bolesnika na kroničnoj hemodijalizi. *Acta Med Croatica* 2001; 55 (Supl.4):111-112.
37. NIH Consensus development Conference Statement: Management of hepatitis C: *Hepatology* 2002; 36 (suppl 1): 3-20.
38. Dumeaux D, Marcellin P, Lerebours E, Treatment of hepatitis C. The 2002 French Consensus. *Gut* 2003; 52:1784-7.

39. Duvnjak M, Pavić T, Tomašić V, Lerotić I, Virović L. Hepatitis C- Treatment of naïve Patients. *Acta Med Croatica* 2005; 59: 453-461.
40. Minuk GY. The influence of host factors on the natural history of chronic hepatitis C viral infections. *J of Viral Hepatitis* 1999; 6:271-276.
41. Chloe L. Thio, Xiaojiang Gao, James J.Goedert, David Vlahov, Kenrad E. Nelson, Margaret W. Hilgartner, Stephen J. O'Brien, Peter Karacki, Jacquie Astemborski, Mary Carrington, and David L. Thomas. HLA-Cw*04 and Hepatitis C Virus Persistence. *Journal of Virology*; 2002; 76(10): 4792-4797.
42. Corado J, Toro F, Rivera H, et al. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin.Exp. Immunol* 1997;109:451-457.
43. Koziel MJ. Cytokines in Viral Hepatitis. *Sem Liver Disease* 1999;19 (2); 157-169.
44. Ramshaw IA, Ramsay AI, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, Ruby JC. Cytokines and immunity to viral infections. *Immunological Reviews* 1997; 159:119-135.
45. Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, INF γ). *Current Opinion in Immunology* 1997; 9:17-23.
46. Hoare JM, Forton DM. Current concepts in viral hepatitis. *J R Coll Physicians Lond* 2000; 34:481-484.
47. Ferrari C, Urbani S, Penna A, et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31:31-8.
48. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 532-62.

49. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporel bridge between a CD4⁺ T helper and a T- killer cell. *Nature* 1998; 393: 474-478.
50. Pape GR, Gerlach TJ, Diepolder HM, Gruner N et al. Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus. *J Viral Hepatitis* 1999; 6 (suppl 1):36-40.
51. Biron CA. Cytokines in the generation of immune response to, and resolution of, virus infection. *Current Opinion in Immunology* 1994; 6:530-538.
52. Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology* 1996; 23: 909-16.
53. Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev* 1992; 127: 183-204.
54. Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994; 369: 407-410.
55. Fan XG, Liu WE, Wang ZC. Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. *Med Inflamm* 1998; 7:295-7.
56. Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW. Generation of polarized antigen- specific CD8 effector populations: Reciprocal action of interleukin (IL) – 4, and IL- 12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 1994; 180:1715-1728.
57. Prezzi K, Casciaro MA, Francavilla V et al. Virus-specific CD8 T cells with type 1 or type 2 cytokine profile are related to different disease activity in chronic hepatitis C virus infection. *Eur J. Immunol* 2001;31:894-906.
58. Chisari FV. Cytotoxic T cells and Viral Hepatitis. *J Clin Invest* 1997; 99 (7):1472-1477.

59. Berke G. The CTL 'kiss of death. *Cell* 1995;81: 9-12.
60. Kazuki A, Kazumasa H, Takashi K et al. Perforin, Fas/Fas ligand and TNF α pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus – specific human CTL. *J Immunol* 1997; 158:5283-5291.
61. Sester U, Sester M, Hank M, et al. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1217.
62. Woitas RP, Lechmann M, Jung G, et al. CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* 1997; 159: 1012-1018.
63. Chang MK, Thimme R, Melpolder JJ et al. Differential CD4+ i CD8+ T cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; 33 (1): 267-276.
64. Abayli B, Canataroglu A, Akkiz H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Turk J Gastroenterol* 2003;14 (1): 7-11.
65. Mosmann TR, Subash S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 1996;17 (3):138-146.
66. Reiser M, Marousis CG, Nelson DR, et al. Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1997; 26:471-8.
67. Bergamini A, Bolacchi F, Cerasari G, et al. Lack of evidence for Th2 predominance in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol* 2001; 123:451-458.
68. Sarih M, Bouchrit N, Benslimane A. Different cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from patients with persistent and self-limited hepatitis C virus infection. *Immunology Letters* 2000; 74: ,117-120.

69. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V. Et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98 (3):706-714.
70. Wang JH, Layden TJ, Eckels DD. Modulation of the peripheral T-cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: Transition from Th1 to a Th2 response. *Human Immunology* 2003; 64:662-673.
71. Osna N, Silonova G, Vilgert N, et al. Chronic hepatitis C : T-helper 1/ T-helper 2 imbalance could cause virus persistence in peripheral blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 703-10.
72. Woitas RP, Petersen U, Moshage D et al. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002 ; 8 (3): 562-566.
73. Reherman B, Chang KM, McHutchison JG et al. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 1996; 98 (6): 1432-1440.
74. Reherman B, Chang KM, McHutchison J et al. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J. Vrol* 1996; 70: 7092-102.
75. Diepolder HM, Zachoval RZ, Hoffman RM et al. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 345:1006-1007.
76. Ploegh HD. Viral strategies of immune evasion. *Science* 1998; 280:248-153.
77. Koziel MJ, Dudley D, Johnson TW, et al. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J of Immunology* 1992;149 (10): 3339-3344.

78. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N et al. HLA Class I-restricted T lymphocytes specific for hepatitis C virus. *J. Clin Invest* 1995; 96:2311-2321.
79. Descamps-Latscha B, Jungers P, Witko-Sarsat V. Immune system dysregulation in uremia: Role of oxydative stress. *Blood Purif* 2002; 20: 481-484.
80. Zaoui P, Green W, Hakim RM. Hemodialysis with cuprophane membrane modulates interleukin-2 receptor expression. *Kidney Int* 1991; 39:1020-1026.
81. Hakim RM. Clinical implications of hemodialysis membrane biocompatibility. *Kidney Int* 1993; 44: 484-49.
82. Pereira BJG, Dinarello CA. Production of cytokine and cytokine inhibitory proteins in patients on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994; (suppl 2): 60-71.
83. Girndt M. Humoral immune responses in uremia and the role of IL-10. *Blood Purif* 2002; 20:285-488.
84. Steinvinkel P, Malnutrition and chronic inflammation as risk factors for cardiovascular disease in chronic renal failure. *Blood Purif* 2001; 19:143-151.
85. Sester U, Sester M, Hauk M et al. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1217-1223.
86. Morita Y, Yammamura M, Kashihara N, Makino H. Increased production of interleukin-10 and inflammatory cytokines in blood monocytes of hemodialysis patients. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 98:19-33.
87. Zamauskaite A, Perez- Cruz I, Yaqoob MM, Madrigal JA, Cohen SBA. Effect of renal dialysis therapy modality on T-cell cytokine production. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 49-57.

88. Kaul H, Girndt M, Sester U, Sester M, Kohler H. Initiation of hemodialysis treatment leads to improvement of T-cell activation in patients with end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:611.
89. Girndt M, Sester M, Sester U, et al. Molecular aspects of T- and B- cell function in uremia. *Kidney Int* 2001; 59 (suppl 78): S 206-311.
90. Degiannis D, Mowat AM, Galloway E, Tsakiris DJ, Briggs JD et al. In vitro analysis of B lymphocyte function in uremia. *Clin Exp Immunol* 1987; 70:463-470.
91. Beaman M, Michael J, Mac Lennan IC, Adu D. T-cell –independent and T-cell-dependent antibody responses in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4:216-221.
92. Rostaing L, Peres C, Tkaczuk J et al. Ex vivo flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, INF- γ , and TNF- α in monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2000; 20:18-26.
93. Spanakis NE, Garinis GA, Alexopoulos EC et al. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection. *J Clin Lab Anal* 2002; 16 (1):40-46.
94. Rostaing L, Borde JS, Hasle C et al. Lack of effect of chronic hepatitis C virus infection on T-cell cytokine production in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2001; 21:194-199.
95. Fishman MA, Perelson AS. Th1/Th2 crossregulation. *J Theor Biol* 1994; 7; 170: 25-56.
96. Bansal AS, Bruce J, Hogan PG, et al. Serum soluble CD 23 but not IL-8, IL-10, GM-CSF or INF gamma is elevated in patients with hepatitis C infection. *Clin Immunol Immunopatol* 1997; 84: 139-44.
97. Weber F. Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system. *World J Gastroenterol* 2007; 13 (36):4818-23.

98. Semmo N, Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4831-8.
99. Neumann-Haefelin C, Spangenberg HC, Blum HE, Thimme R. Host and viral factors contributing to CD8+ T cell failure in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13:4839-47.
100. Billerbeck E, Bottler T, Thimme R. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13:4858-64.
101. Li S, Gowans EJ, Chougnet C, Plebanski M, Dittmer U. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 2008; 82:21-30.
102. Cecere A, Marotta F, Vangieri B, tancredi L, Gattoni A. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different cytokine profile. *Panminerva Med* 2004;46 (3):171-87.

13. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, 1951.godine. 1972. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a diplomirala sam 18.7.1977.g.

Specijalistički ispit iz Pedijatrije položila sam 1984.g.

Od 1986.g. zaposlena sam u Centru za dijalizu Klinike za urologiju a od 1.11.2011.g. u Zavodu za nefrologiju Klinike za pedijatriju.

Završila sam poslijediplomski studij iz Nefrologije 1987.g.

Magistarski rad pod naslovom “**Liječenje izmjenom plazme u djece s teškim otrovanjem gljivama**”, obranila sam 16. listopada 1995. g.

Godine 1998. položila sam poslijediplomski tečaj iz ultrazvuka abdominalnih organa.

18. prosinca 2002. g. priznat mi je naslov Primarijus.

Od 2003. g. voditelj sam Jedinice za dijalizu djece i druge postupke.

8.6.2004. g. položila sam ispit iz uže specijalizacije- pedijatrijske nefrologije te stekla naziv pedijatar nefrolog.

Tijekom 25-godišnjeg rada bavila sam se hemodijalizom, peritonejskom dijalizom, plazmaferezom i transplantacijom bubrega prvenstveno u djece ali i u odraslih. U Ambulanti za kroničnu renalnu insuficijenciju pratim djecu s preterminalnim bubrežnim zatajenjem, nefrološke bolesnike dječje dobi te djecu s transplantiranim bubregom. Boravila sam na kraćem stručnom usavršavanju iz transplantacije bubrega u djece u pet navrata, u bolnici *Edouard Herriot* u Lyonu, u Francuskoj.

Objavila sam 193 rada u domaćim i stranim stručnim časopisima. Od toga je 84 radova objavljeno u indeksiranim časopisima (45 radova CC , 39 radova Medline). Područje užeg interesa - kronični C hepatitis u bolesnika na dijalizi i u bolesnika s transplantiranim bubregom.

Sudjelujem u dodiplomskoj nastavi kao i u poslijediplomskoj nastavi iz Kliničke pedijatrije, nefrologije i urologije.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Hrvatskog društva za pedijatriju, Hrvatskog društva za pedijatrijsku nefrologiju te međunarodnih društava: European Dialysis and Transplantation Assotiation, International Society of Peritoneal Dialysis, European Society for Organ Transplantation, European Society for Paediatric Nephrology.