

Genotip I. razreda glavnog sustava histokompatibilnosti kao prognostički čimbenik liječenja kroničnog hepatitisa C interferonom

Ivić, Ivo

Doctoral thesis / Disertacija

2007

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:080261>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-18**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivo Ivić

**GENOTIP I. RAZREDA GLAVNOG SUSTAVA
HISTOKOMPATIBILNOSTI KAO PROGNOŠTIČKI
ČIMBENIK LIJEČENJA KRONIČNOG HEPATITISA
C INTERFERONOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2007.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivo Ivić

**GENOTIP I. RAZREDA GLAVNOG SUSTAVA
HISTOKOMPATIBILNOSTI KAO PROGNOŠTIČKI ČIMBENIK
LIJEČENJA KRONIČNOG HEPATITISA C INTERFERONOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2007.

Rad je izrađen na Odjelu za zarazne bolesti i u Laboratoriju za tipizaciju tkiva

Odjela za kliničku patofiziologiju Kliničke bolnice Split

Voditelj rada:

Prof.dr.sci. Nikola Bradarić

SADRŽAJ	stranica
I. UVOD	1
I.1. Hepatitis C virus	1
I.2. Epidemiologija HCV infekcije	2
I.3. Klinička slika HCV infekcije	3
I.3.1 Akutni hepatitis C	3
I.3.2. Fulminanti hepatitis C.....	4
I.3.3. Kronični hepatitis C	4
I.3.4. HCV ciroza	8
I.3.5. Hepatocelularni karcinom.....	10
I.3.6. Ekstrahepatičke manifestacije HCV infekcije	11
I.4. Laboratorijska dijagnostika HCV infekcije	11
I.4.1. Serološko testiranje.....	11
I.4.2. Izravna dijagnostika	11
I.4.2.1. Testiranje HCV RNK.....	12
I.4.2.2. Kvantifikacija HCV	12
I.4.2.3. Dokazivanje HCV antigena	12
I.4.2.4. Genotipizacija HCV	12
I.4.3. Biopsija jetara	12
I.5. Liječenje kroničnog hepatitisa C	13
I.5.1. Virološki odgovor na liječenje.....	14
I.5.2. Histološki odgovor na liječenje.....	15
I.5.3. Lijekovi	15
I.5.3.1 Interferon- α	15
I.5.3.2 Peginterferon- α	16
I.5.3.3 Ribavirin	16
I.5.4. Pokazatelji odgovora na liječenje i učinkovitost liječenja.....	16
I.6. Perzistencija HCV infekcije i HLA sustav	17
I.6.1. Virusni mehanizmi perzistencije HCV infekcije.....	17
I.6.2. Domaćinovi mehanizmi obrane i perzistencija HCV	17
I.6.3. Interferon- α i HLA sustav	20

II. CILJ RADA	22
III. ISPITANICI I POSTUPCI	22
III.1. Plan ispitivanja i ispitanici.....	22
III.2. Postupci	24
III.2.1. HCV protutijela	24
III.2.2. HCV RNK.....	24
III.2.2.1. Određivanje HCV RNK.....	24
III.2.2.2. Genotipizacija HCV.....	24
III.2.2.3. Kvantifikacija HCV RNK.....	25
III.2.3. Određivanje HLA	25
III.2.3.1. Izolacija DNK	25
III.2.3.2. Tipizacija HLA	25
III.2.4. Biopsija jetara	25
III.2.5. Određivanje ALT	26
III.3. Statistička analiza	26
III.4. Etički standardi	26
IV. REZULTATI	27
V. RASPRAVA	48
VI. ZAKLJUČCI	54
VII. SAŽETAK	55
VIII. SUMMARY	56
IX. LITERATURA	57
X. ŽIVOTOPIS	80

I. UVOD

I.1. HEPATITIS C VIRUS

Hepatitis C virus (HCV) je hepatotropni virus koji pripada koljenu *Hepacivirusa* iz porodice *Flaviviridae*. Kružnog je oblika i veličine oko 50 nm, sadrži ribonukleinsku kiselinu (RNK) i ima vanjsku ovojniciu (1). Jednostruka pozitivno uvijena RNK kodira tri skupine bjelančevina: 1) strukturne u koje spadaju nukleokapsidna, jezgrena (protein C), te bjelančevine ovojnice (E1 i E2); 2) nestrukturne (NS) bjelančevine koje pripadaju sustavu replikaza (NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B); 3) dvije bjelančevine, p7 polipeptid i nestrukturna bjelančevina NS2, kojih uloga u životu virusa nije jasna. Smatra se da protein C na više načina utječe na imunološki odgovor domaćina protiv HCV-a, što uključuje: inhibiciju prirodno ubilačkih stanica (NK) preko I. razreda glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC), inhibiciju proliferacije T-stanica putem interakcije s njihovim receptorom gC1qR (engl.: globular head portion of C1q complement receptor), te interakciju s citoplazmatskim krajem nekoliko receptora iz skupine receptora tumor nekrotizirajućeg faktora (TNF) (2-6). Protein C i protutijela na protein C mogu se naći u serumu bolesnika s HCV infekcijom. Na amino kraju E2 bjelančevine nalazi se mutacijama najsklonije područje od 30 aminokiselina i nazvano je hipervarijabilna regija-1 (HVR-1). HVR-1 ima neutralizirajuće epitope koji su mjesto mutacija važnih za imunološko izbjegavanje (7-9). Nestrukturne bjelančevine (proteaze i helikaze) su važne u procesu replikacije virusa (10,11), a ciljno su mjesto djelovanja nove generacije antivirusnih lijekova- inhibitora proteaza (12,13). Osim toga NS3 protein interferira s antivirusnim učincima endogenog interferona i tako HCV-u omogućava zaobići urođenu obranu stanice od infekcije virusom (14). Virus se

primarno razmnožava u jetrenim stanicama (15), ali postoje dokazi da se može razmnožavati i u perifernim mononuklearnim stanicama (16). U osoba s kroničnom HCV infekcijom dnevno se stvara do 1×10^{12} virusnih čestica, što je više od produkcije virusa humane imunodeficijencije (HIV) u osoba s HIV infekcijom (17).

Genotipovi i kvazisojevi HCV

Prema nalazima HCV sljedova u ljudi s različitih zemljopisnih područja HCV se može filogenetski podijeliti na šest glavnih genotipova (genotipovi 1-6). Pojedini genotipovi mogu se podudarati i u manje od 60% nukletidnih sljedova (18). Za sada nema podataka da se oni međusobno razlikuju prema infekcioznosti, stupnju replikacije ili brzini napredovanja jetrene bolesti koju uzrokuju. Međutim razlikuju se prema odgovoru na terapiju interferonom (19). Pojedini glavni genotipovi mogu se razvrstati na podtipove koji se obično podudaraju u oko 80% neukleotidnih sljedova (20).

Zbog visokog stupnja replikacije HCV-a dolazi do brzog nakupljanja virusnih mutacija u osobe s HCV infekcijom. To ima za posljedicu pojavu većeg broja kvazisojeva čija je podudaranost nukleotidnih nizova preko 90% (21,22). Pojavu kvazisojeva najvjerojatnije uzrokuje imunološki pritisak domaćina. To se događa ili pod pritiskom neutralizirajućih protutijela koja virus izbjegava promjenama HVR-1 regije na E2 proteinu (23,24) ili pod pritiskom staničnog imuniteta (25).

I.2. EPIDEMIOLOGIJA

Kronični hepatitis C (KHC) danas pogađa oko 1-3% svjetske populacije. U Hrvatskoj približno 1% stanovništva ili oko 58500 osoba boluje od KHC (26). Glavni put prijenosa infekcije je parenteralno izlaganje krvi, u prvom redu

intravenska narkomanija s korištenjem zajedničkog injekcijskog pribora (27). Širom svijeta između 50-95% intravenskih ovisnika ima HCV infekciju (28-30). Spolni kontakt, transfuzije krvi i profesionalna izloženost su od znatno manjeg značaja (31). Iako je, osim u krvi, prisustvo HCV RNK dokazano i u drugim tjelesnim tekućinama poput sline, suza, cerebrospinalne tekućine, sperme i ascitesa, nema uvjerljivih podataka o njihovoj stvarnoj infekcioznosti (33-36). Transfuzije krvi i krvnih produkata do kraja 80-ih godina prošlog stoljeća bili su važan put prijenosa infekcije (37,38). Nakon uvođenja obaveznog testiranja krvi na prisustvo anti-HCV protutijela rizik od posttransfuzijske infekcije HCV smanjen je na manje od 1/100000 doza (39). Uz to, značajno smanjenje rizika od infekcije koncentratima krvnih produkata (faktori zgrušavanja, gamaglobulini) postignuto je primjenom različitih procedura za inaktivaciju virusa (40,41). Prijenos infekcije s majke na dijete najvjerojatniji je u perinatalnom razdoblju, a rizik od prijenosa je od 0-8% (42,43). HCV RNK dokazana je u majčinom mlijeku, ali dojena djeca nisu u većem riziku od infekcije nego djeca hranjena bočicom (44,45).

I.3. KLINIČKA SLIKA

I.3.1. Akutni hepatitis C

Akutna infekcija najčešće protječe subklinički, a ako je simptomatska ne razlikuje se od drugih akutnih virusnih hepatitisa. Vrijeme inkubacije je oko 7 tjedana (raspon 14-120 dana). Većina opisa akutne infekcije potječe od postranfuzijskog hepatitisa C. Svega 15-25% oboljelih je ikterično, pa je udio subkliničkih infekcija vrlo visok. Žutica i vrijednosti aminotransferaza općenito su niže nego u akutnom A i B hepatitisu. Ostali klasični simptomi kao što su

mučnina, mukla bol u epigastriju, vrućica, te osip i artralgijske slabije su izraženi. Za razliku od postransfuzijskog, na druge načine stečeni akutni hepatitis C još češće je anikteričan, a od tegoba najčešće se registrira neobjašnjivi umor u trajanju do nekoliko dana i nešto slabiji apetit. Aminotransferaze ostaju znatnije povišene približno 6-12 tjedna (raspon 1-26 tjedana). Bolesnici s ikteričnim oblikom bolesti imaju manje izgleda za nastanak kronične infekcije. Oko 70-80% inficiranih kasnije razvija kroničnu infekciju (46,47).

I.3.12. Fulminantni hepatitis C

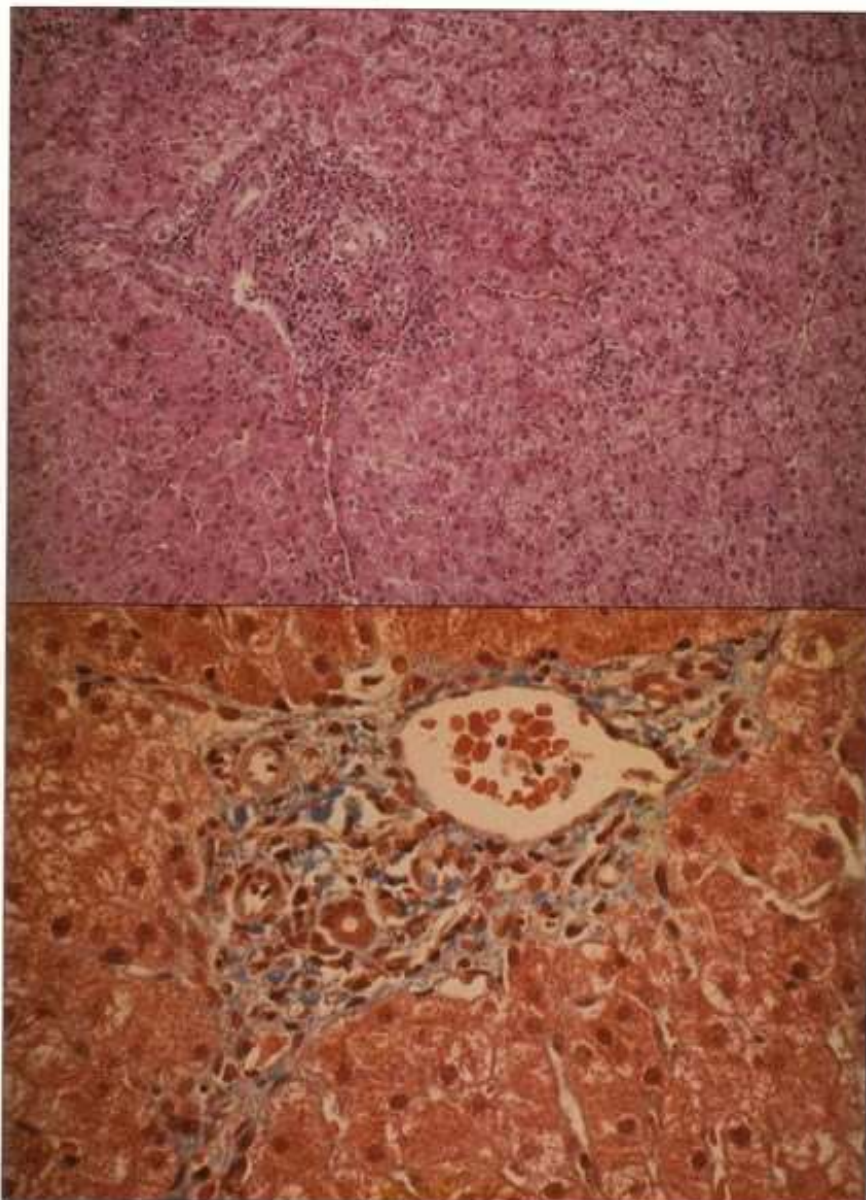
Ovo je najozbiljnija manifestacija virusnog hepatitisa. Definiran je kao teško akutno zatajenje jetara s pojavom koagulopatije i encefalopatije unutar 8 tjedana od pojave žutice. Bolesnik je ikteričan, može imati visoku temperaturu, prisutan je tremor poput udaranja krilima, hiperventilira, u početku može biti hipertenzivan, protrombinsko vrijeme je narušeno i pojavljuju se krvarenja na koži i sluznicama. Vrijednosti aminotransferaza u početku mogu biti jako visoke, a s razvojem jetrene insuficijencije počinju naglo padati uz porast bilirubina. Glavni uzrok smrti je edem mozga s respiratornim arestom. U najvećem broju slučajeva smrtni ishod nastupa unutar 10-14 dana (48). Na Zapadnoj hemisferi HCV vrlo rijetko uzrokuje fulminantni hepatitis. U Japanu je HCV doveden u vezu s oko 50% fulminantnih non-A, non-B hepatitisa za što još nije dano pouzdano objašnjenje (49).

I.3.3. Kronični hepatitis C

Kao što je rečeno, približno 80% osoba nakon akutne razvija kroničnu HCV infekciju i danas je to u svijetu vodeći infektivni uzrok kronične bolesti jetara. Sve dok se ne razviju znaci ciroze jetara, velika većina bolesnika ima oskudne simptome (npr. umor, nemoć) (50). Kvaliteta života osoba koje se izliječe

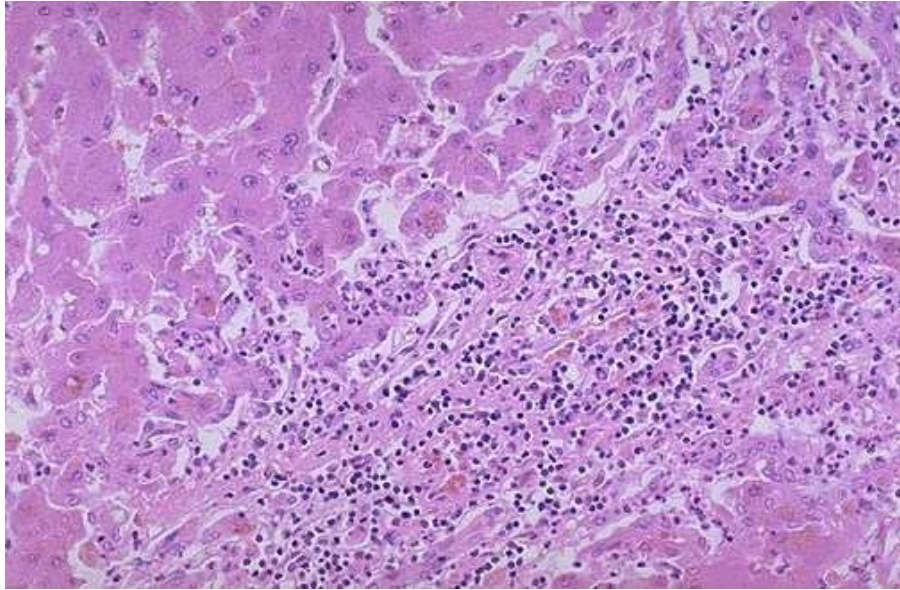
od kroničnog hepatitisa C osjetno je bolja, no još uvijek nije jasno koliko je to tjelesni učinak izlječenja od infekcije, a koliko psihološki učinak oslobađanja od kronične bolesti ili depresije povezane s intravenskom ovisnošću (51). Međutim, neliječen KHC često napreduje prema cirozi jetara i hepatocelularnom karcinomu. Procjenjuje se da će 5-25% osoba s KHC razviti cirozu jetra unutar 10-20 godina trajanja infekcije. Stupanj fibroze jetara je u vrlo slaboj korelaciji s nekroinflamatornim promjenama u jetrima, serumskom razinom alanin aminotransferaze (ALT), kao i viremijom izraženom serumskom razinom HCV RNK (52). Stoga je histološki pregled jetara najbolji pokazatelj uznapredovalosti bolesti. Iskustvo stečeno s kroničnim hepatitisom C pokazalo je da prijašnja podjela na kronični aktivni, kronični perzistentni i kronični lobularni hepatitis ovdje ne zadovoljava jer zatečena histološka slika nije stacionarna i s vremenom se može pogoršati, ali i poboljšati uz terapiju. Stoga se na temelju nekroinflamatornih promjena i stupnja fibroze (vidi dalje poglavlje I.1.4.3. Biopsija jetara) može podijeliti na blagi, umjereni i teški kronični hepatitis. U blagom kroničnom hepatitisu (stadij 0-1 prema Ishaku i Kondellu, F 0-1 po METAVIR sustavu) u portalnim prostorima je prisutna upalna aktivnost ali nema *interface* hepatitisa (peacemale nekroze), dok fibroze nema ili je minimalna u nekim periportalnim prostorima (Slika 1). U umjerenom kroničnom hepatitisu (stadij 2-3 prema Ishaku i Kondellu, F2 po METAVIR sustavu) u portalnim prostorima postoji upala bez ili s blagim *interface* hepatitisom, dok je fibroza portalna i periportalna uz mjestimična porto-portalna septa (Slika 2). U teškom kroničnom hepatitisu (stadij 4-5 prema Ishaku i Kondellu, F 3 po METAVIR sustavu) značajna je upalna aktivnost s konfluirajućim i/ili premoštavajućim nekrozama, dok je fibroza periportalna s obilnim porto-portalnim i porto-

centralnim septima uz mogućnost mjestimičnih regenerativnih čvorića (Slika 3). Neki bolesnici imaju kronični hepatitis s trajno normalnim vrijednostima alanin aminotransferaze, ali u oko 20% njih postoje značajne histološke promjene (53).



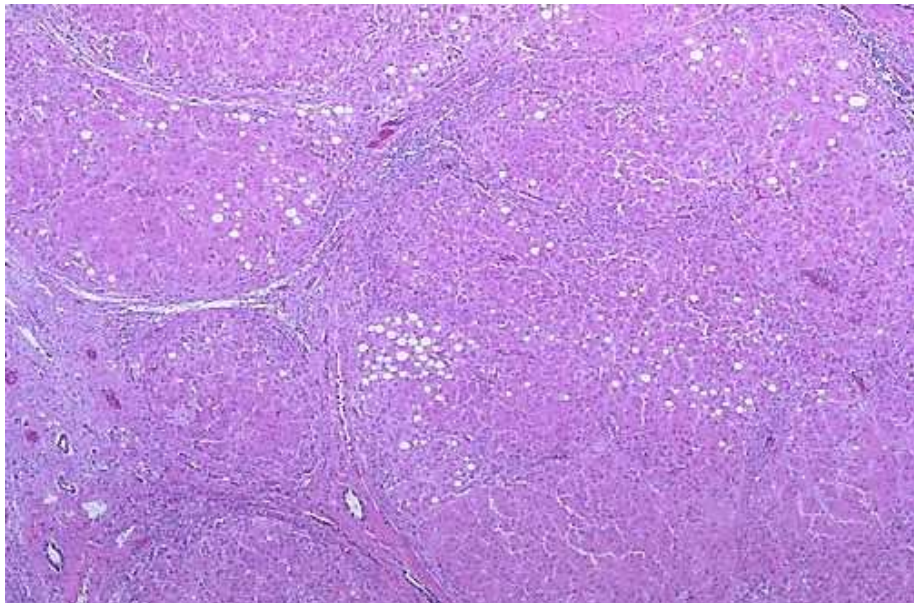
Slika 1. Histološka slika blagog kroničnog hepatitisa (malo i veliko povećanje mikroskopa).

(Izvor: <http://amedd.army.mil/booksdocks/vietnam/GenMedVN/Figures/figure79.jpg>)



Slika 2. Histološka slika umjerenog kroničnog hepatitisa C.

(Izvor: http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2002_Groups/liver)

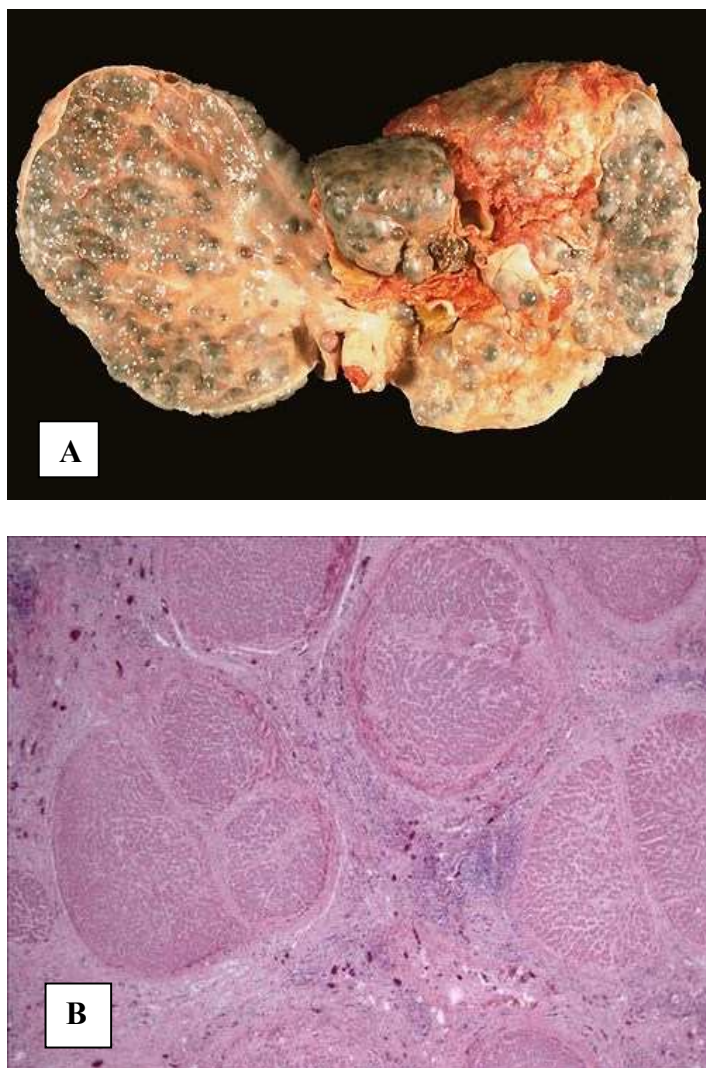


Slika 3. Histološka slika teškog kroničnog hepatitisa C.

(Izvor: <http://www.pathology.vcu.edu/education/gi/images/3.3h.c.jpg>)

I.3.4. HCV ciroza

U nekih bolesnika s KHC fibroza napreduje prema cirozi jetara (Slika 4). Bolesnik s kompenziranom cirozom može dugo biti bez simptoma ili ga prate simptomi kroničnog hepatitisa poput osjećaja umora, težine ili bola pod desnim rebranim lukom. Nekoliko čimbenika je povezano s bržom progresijom fibroze: starija dob u vrijeme infekcije, muški spol, neumjereno konzumiranje alkohola, infekcija s virusom humane imunodeficijencije i virusom hepatitisa B, određeni haplotipovi humanih leukocitnih antigena (HLA) (54,55), druge popratne bolesti jetara kao što su hemokromatoza i steatohepatitis (56). Desetogodišnje preživljavanje bolesnika s kompenziranom cirozom jetara uzrokovanom kroničnim hepatitisom C je oko 80%. No kada se pojave znaci dekompenzacije (gubitak apetita i tjelesne težine, varikoziteti jednjaka, ascites, ikterus, encefalopatija, citopenija, snižena sintetska funkcija jetara) desetogodišnje preživljanje pada na oko 50%. Među bolesnicima s cirozom njih 4-5% godišnje razvija dekompenzaciju jetara, smrtnost im je 2-6% godišnje, a učestalost nastanka hepatocelularnog karcinoma je 1-5% godišnje (57,58).



Slika 4. Makronodularna ciroza jetara (A- makroskopski, B- mikroskopski izgled).

(Izvor A: <http://www.md.huji.ac.il/mirror/webpath/LIVER009.jpg>;

Izvor B: http://www.path.utah.edu/casepath/PM%20Cases/PMCase4/ALL4_files/image045.jpg)

I.3.6. Ekstrahepatične manifestacije HCV infekcije

I do polovice bolesnika s KHC ima *esencijalnu miješanu krioglobulinemiju*, no samo manji broj njih razvija vaskulitis (59). *Membranoproliferativni glomerulonefritis* obično prati krioglobulinemiju ali bez vaskulitisa (60). *Porphyria cutanea tarda* je u preko 60% osoba sa sporadičnom formom bolesti uzrokovana HCV-infekcijom (61). U žena je moguć Hashimotov tireoiditis i hipotireoza u vezi s HCV infekcijom (62). Druge, znatno rjeđe, manifestacije su Sjögrenov sindrom, lihen planus, te idopatska plućna fibroza (63).

I.4. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA HCV INFEKCIJE

I.4.1. Serološko testiranje

Danas se za serološko testiranje HCV infekcije u pravilu koristi treća generacija enzimskih imunoeseja (EIA) čija je osjetljivost 97% (64). Osnovna svrha testa ovako visoke osjetljivosti je probir osoba koji će dalje biti testirane metodama dokazivanja HCV RNK u krvi. Preko 98% intravenskih ovisnika s pozitivnom EIA-om ima dokazivu HCV RNK, dok s druge strane među EIA pozitivnim zdravim dobrovoljnim davateljima krvi najviše 50% njih ima dokazivu HCV RNK (65). Za razliku od vremena kada je u upotrebi bila druga generacija EIA testova, danas više nije nužno korištenje rekombinantnog imunoblot eseja (RIBA) kao potvrdnog testa.

I.4.2. Izravna dijagnostika

I.1.4.2.1. Testiranje HCV RNK. HCV RNK može se dokazati pomoću tehnike reverzna transkriptaza-lančana reakcija polimeraze (RT-PCR), zatim transkripcijki posredovane amplifikacije (TMA), te tehnologije račvaste DNK

(bDNK). Donja granica osjetljivosti većine komercijalnih testova je 50 IJ/mL (66).

I.1.4.2.2 Kvantifikacija HCV. Komercijalni testovi za određivanje viremije niže su osjetljivost nego testovi za dokazivanje prisustva virusa. U osoba s kroničnom HCV infekcijom razine HCV RNK godinama su stabilne i promjene se kreću unutar $0,5\log_{10}$ (67).

I.1.4.2.3. Dokazivanje antigena. Ovo je tehnološki manje zahtjevan test koji pomoću EIA metodologije dokazuje virusni antigen. Rezultati testa dobro se podudaraju s razinom HCV RNK (68).

I.1.4.2.4. Genotipizacija HCV. U jednom od postupaka za genotipizaciju koristi se tehnika sekvencioniranja virusne RNK (npr. genoma E1 ili NS5) i potom filogenetska analiza prema referentnim sljedovima (69), dok se u drugoj vrsti testova koristi tehnika reverzne hibridizacije (70). Obje tehnike precizno određuju genotip, ali su moguće pogreške prilikom određivanja podtipova što, međutim, nije od značaja za određivanje terapije.

I.1.4.3. Biopsija jetara

Biopsija jetara je najpouzdaniji način za konačno utvrđivanje stadija jetrene bolesti. Histološkim pregledom uzoraka dobiva se uvid u nekroinfalatorne promjene (periportalna nekroza, parenhimno oštećenje, portalna inflamacija) i fibrozu. Iako postoje različiti sustavi bodovanja histopatološkog nalaza, određivanje stupnja fibroze svakako je najvažniji nalaz (71). Najčešće korišteni sustavi bodovanja histoloških promjena su: 1) indeks histološke aktivnosti (HAI) po Knodellu (72), 2) HAI bodovanje modificirano po Ishaku (73), i 3) METAVIR sustav bodovanja (74) (Tablica 1). HAI sustav je jednostavan, ali mu je nedostatak što su stadiji fibroze određeni kao 0, 1, 3 i 4.

Ovaj diskontinuitet između stadija 1 i 3 otežava statističku obradu i usporedivost u velikim multicentričnim istraživanjima. Ishakova modifikacija HAI bodovanja je bez diskontinuiteta i mnogo je osjetljivija u ocjenjivanju stadija fibroze. METAVIR sustav je najjednostavniji: stadiji fibroze se boduju kontinuirano od 0-4, te tako osigurava dobru reproducibilnost rezultata unutar skupine i između različitih skupina bolesnika.

Tablica 1. Najčešći sustavi bodovanja histoloških promjena u kroničnom hepatitisu C.

	Nekroinflamatorne promjene	Fibroza	Ukupno bodova
Indeks histološke aktivnosti (HAI)	0 - 18	0 - 4	0 - 22
Ishakova modifikacija HAI	0 - 18	0 - 6	0 - 24
METAVIR	0 - 3	0 - 4	0 - 7

1.5. LIJEČENJE KRONIČNOG HEPATISA C

Glavni cilj liječenja je spriječiti komplikacije HCV infekcije, a da bi se to postiglo najbolje je iskorijeniti virus. To se može postići primjenom rekombinantnog interferona- α , ali su rezultati liječenja znatno bolji ako se primjeni pegilirani interferon- α (peginterferon- α) u kombinaciji s ribavirinom. Terapijski uspjeh obilježen je trajnim odsustvom HCV RNK u krvi i jetrima, padom titra anti-HCV i zaustavljanjem ili poboljšanjem histoloških promjena (75).

I.5.1. Virološki odgovor na terapiju

U nekih bolesnika već nakon 4 tjedna antivirusne terapije nema dokazivih HCV RNK u krvi i to se naziva *brzi virološki odgovor* (engl. rapid viral response- RVR). Pod *ranim virološkim odgovorom* (engl: early virological response- EVR) podrazumijeva se razina HCV RNK nakon 12 tjedana terapije. Ukoliko je tada HCV RNK nedokaziv govorimo o potpunom EVR (engl.: complete EVR- cEVR), a ako je razina HCV RNK barem za 100 puta ($\leq 2 \log_{10}$) manja od početne govorimo o djelomičnom EVR (engl.: partial EVR- pEVR). Odgovor na kraju terapije (engl.:end of treatment response- ETR) podrazumijeva bolesnike bez dokazive HCV RNK na kraju terapije. *Trajni virološki odgovor* (engl.: sustained virological response- SVR) označava odsustvo HCV RNK iz seruma 6 mjeseci nakon postizanja ETR. *Relaps* je ponovna pojava HCV RNK u osoba koje su imale ETR. *Nonresponderi* su osobe koje tijekom cijelog liječenja imaju stabilne titrove HCV RNK. *Parcijalni responderi* su osobe koje u toku terapije postižu pad razine ali nikada ne postaju HCV RNK negativni (26). Određivanje vremena tijekom terapije KHC postaje jedan od najvažnijih elemenata u kreiranju načina liječenja. Do nedavno je u slučaju infekcije HCV-om genotipa 1 i 4 bilo uobičajeno 48 tjedana liječenja ukoliko je postignut cEVR ili pEVR, a u slučaju infekcije genotipom 2 i 3 preporučeno je 24 tjedna liječenja bez provjere EVR. Pokazalo se da je bolesnicima s RVR u slučaju infekcije HCV-om genotipa 2 i 3 moguće skratiti trajanje liječenja s uobičajenih 24 na 16 tjedna, a u slučaju infekcije genotipom 1 s uobičajenih 48 na 24 tjedna, a da se pri tome ne utječe na šansu za SVR (76). S druge strane, u slučaju infekcije HCV-om genotip 1 postotak relapsa nakon 48 tjedana terapije znatno je veći u bolesnika s pEVR nego u bolesnika s cEVR. Pokazalo se da ovim bolesnicima, ukoliko su postigli pEVR i

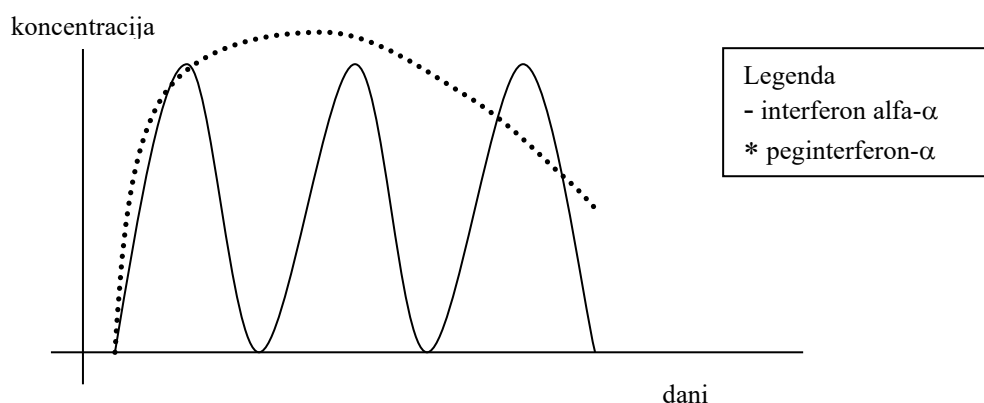
ETR, produživanje terapije na 72 tjedna značajno povećava postotak SVR (77,78).

I.5.2. Histološki odgovor na terapiju

Brojna istraživanja su pokazala da liječenje, osobito u slučaju postizanja SVR, popravljaju histologiju jetara (prvenstveno upalu, a donekle i fibrozu) (75,79). Ima studija koje upućuju da je u bolesnika s cirozom učestalost karcinoma manja ukoliko se liječe (80), ali još nije jasno kolika je stvarana korist od dugotrajnog liječenja osoba bez SVR.

I.5.3. Lijekovi

I.5.3.1. Interferon- α . Interferon- α je mali polipeptid koji se veže za specifični receptor na površini stanice i preko STAT-3 puta (engl.: signal transducer and activator of transcription 3 pathway) utječe na aktivaciju nekoliko stotina gena, među kojima i onih s antivirusnim i antiproliferativnim svojstvima (81,82). Međutim, točan mehanizam antivirusnog djelovanja interferona- α još nije poznat. Važan nedostatak mu je pad koncentracije na nedokazivu razinu 16 sati nakon potkožne primjene (Slika 6). Zato ga treba primjenjivati najmanje tri puta tjedno, a može se davati i svakodnevno.



Slika 6. Shema farmakokinetike interferona- α kod primjene 3 puta i peginterferona- α jedan put tjedno.

I.5.3.2. Peginterferon- α Dobiven je konjugacijom interferona- α s polietilen-glikolom. Na taj način mu je značajno produženo poluvrijeme života, pa ga je uz puni terapijski učinak moguće primijeniti samo jednom tjedno (Slika 6)(83).

I.5.3.3. Ribavirin. Ribavirin je analog gvanozina, a pretpostavlja se da djeluje antivirusno na barem četiri načina : 1) utječe na raspoloživost intracelularnih nukleozida, 2) inhibira, mada slabo, virusnu RNK polimerazu, 3) povećava mutagenost virusa, te 4) utječe na domaćinov imuni odgovor modulirajući omjer Th1/Th2. Međutim, monoterapija KHC ribavirinom je praktički nedjelotvorna, pa je moguće da je u kombinaciji s interferonom- α bitno njegovo imunomodulacijsko djelovanje (84,85).

I.5.4. Pokazatelji terapijskog odgovora i djelotvornost terapije

Nakon 2004. godine kombinira terapija peginterferonom i ribavirinom postala je standard u liječenju KHC. Najveći postotak SVR postiže se u bolesnika inficiranih genotipom 2 i 3 HCV, koji imaju nižu razinu HCV RNK prije terapije, koji su mlađe životne dobi, manje tjelesne mase, te u kojih nema premoštavajuće fibroze, ciroze i steatoze. U bolesnika inficiranih genotipom 1 koji se prvi put liječe kombiniranom terapijom (peginterferon + ribavirin) u trajanju od 48 tjedana postiže se SVR u oko 50%, dok se u bolesnika inficiranih genotipom 2 ili 3 nakon 24-tjedna terapije postiže SVR u oko 80% osoba. (86,87).

I.6. PERZISTENCIJA HCV INFEKCIJE I HLA SUSTAV

Suvremena terapija KHC je skupa, a njena djelotvornost u određenim kategorijama jedva da prelazi izlječenje (SVR) od 50%. Zbog mogućih ozbiljnih posljedica KHC veliko je zanimanje usmjereno prema razumijevanju mehanizmima virusne perzistencije i domaćinovog imunološkog odgovora. KHC razvija se usprkos lako dokazivom multispecifičnom humoralnom i celularnom imunološkom odgovoru koji je usmjeren protiv svih strukturnih i nestrukturnih virusnih bjelančevina (88,89).

I.6.1. Virusni mehanizmi perzistencije HCV infekcije

Za razliku od virusa hepatitisa B, perzistiranje HCV nije povezano s integracijom virusa u domaćinov genom. HCV ima sposobnost replicirati se uz visoku učestalost mutacija što uzrokuje pojavu niza različitih varijanti ili kvazi-sojeva virusa koji mu omogućavaju izbjeći imunološkoj kontroli (90). Neutralizirajuća antivirusna antitijela su specifična za izolat i mijenjaju se tijekom vremena (91,92). Vjerojatno je zato i moguća reinfekcija istim ili različitim tipom virusa. Posebno je velika učestalost mutacija na HVR1 području E2 bjelančevina. Točna funkcija te regije još nije poznata, ali je dokazano da ima neutralizirajuće epitope i da u osoba s kroničnom infekcijom sudjeluje u održavanju varijanti HCV koje izmiču odgovoru citotoksičnih T limfocita (CTL) (9,93-95). I protein C utječe na imunološki odgovor domaćina tako što putem I. razreda MHC inhibira aktivnost NK stanica, a također smanjuje i proliferaciju T-stanica djelujući preko gC1qR receptora komplementa (3-5).

I.6.2. Domaćinovi mehanizmi odbrane i perzistencija HCV

Općenito domaćinovi obrambeni mehanizmi protiv virusnih patogena obuhvaćaju prirodene odgovore koji uključuju barem sljedeće:

1. stvaranje neutralizirajućih antivirusnih protutijela koja ograničavaju reinfekciju hepatocita cirkulirajućim virusima;
2. aktivaciju antigen-specifičnih CD8⁺ (CTL) i CD4⁺ pomagačkih T limfocita (HTL);
3. aktivaciju prirodnoubilačkih stanica (NK);
4. intrahepatalno stvaranje citokina koji sudjeluju u izravnom i neizravnom ubijanju inficiranih hepatocita;
5. stvaranje interferona koji induciraju antivirusno stanje hepatocita, smanjuju replikaciju virusa, i na površini hepatocita pospješuju ekspresiju molekula I. razreda MHC (89).

Infekcija HCV-om inducira jasan humoralni imunološki odgovor koji može neutralizirati pojedine varijante virusa, može vjerojatno i ublažiti težinu infekcije, ali je od malog značaja u konačnom ozdravljenju od infekcije (96,97). Usprkos sposobnosti HCV-a da u ranim fazama infekcije stvara varijante koje izbjegavaju djelovanje CTL nije vjerojatno da je samo ta pojava od presudnog značenja za nastanak perzistentne infekcije. Naime, CTL-odgovor na HCV je multispecifičan pa gubitak jednog ili više epitopa zbog njihove mutacije ne može značajno povećati preživljavanje virusa (98). Nadalje, simultana mutacija više CTL-epitopa nije vjerojatna čak ni u virusa s visokom sklonošću mutacijama. Doista, Tsai i sur. (90) našli su epitopne varijante u hipervarijabilnoj regiji u onih bolesnika koji su uspješno odstranili virus kao i u onih koji to nisu uspjeli. Proučavajući genetsku varijabilnost HCV genotipa 1b Lopez-Labrador i sur. su pokazali da ona ne utječe na težinu kroničnog hepatitisa (99).

Dok je pojava mutiranih varijanti virusa gotovo univerzalna u osoba koje razviju kroničnu infekciju, pokazano je da se one malokad pojavljuju u osoba čija

akutna infekcija završava eliminacijom virusa (93,94). To upućuje da potonje osobe učinkovitom eliminacijom virusa ne dopuštaju pojavu njegovih varijanti. S druge strane, očito je da osobe koje imaju kroničnu infekciju zbog drugačijeg imunološkog odgovora dopuštaju nastanak virusnih varijanti. Gotovo sigurno da nesposobnost velikog broja ljudi da spontano eliminiraju HCV ima svoju prirođenu imunološku pozadinu.

Različiti aleli I. i II. razreda MHC povezani su s nastankom kroničnog hepatitisa, razvojem ciroze jetara i hepatocelularnog karcinoma, odgovorom na terapiju interferonom- α i ekstrahepatičkim manifestacijama infekcije HCV-om (100). Geni MHC sustava upravljaju imunološkim odgovorom domaćina. Oni nadziru ekspresiju HLA koji su odgovorni za prezentaciju prerađenih virusnih antigena prema receptorima T limfocita (101-105). Konačno virus-specifični CTL inhibiraju replikaciju virusa putem izravnih i citokinima posredovanih citolitičkih učinaka. Nasuprot akutnoj HCV infekciji, koja je obilježena snažnom aktivacijom CTL i HTL, u kroničnoj infekciji HCV-specifični T stanični odgovor je kvantitativno slab (106-108). Budući da nakon akutne faze infekcije 20-30% osoba ipak uspijeva spontano eliminirati HCV virus, za očekivati je da naslijeđene razlike HLA sustava imaju za posljedicu različitu sposobnost eliminacije virusne infekcije. Prema imunološkoj teoriji, antigeni I. razreda MHC važni su za preradu i predočavanje virusnih antigena, pa je za očekivati da je i perzistencija HCV infekcije u najužoj svezi s tim sustavom. Međutim, brojni rezultati upućuju da su antigeni II. razreda MHC i HTL-odgovor značajno povezani s perzistencijom HCV infekcije. Najprije su Peano i sur. (109), a zatim i Zavaglia sa sur. (110) pokazali da HLA-DR5 ima ulogu zaštite od perzistentne HCV infekcije bolesnika u Italiji. Congia i suradnici (111) su to utvrdili za HLA-DRB1*1601 i

DRB1*0502 na Sardiniji, a Tibbs i sur. (112) za HLA-DQ*03 alele u Engleskoj. Alric i suradnici su ukazali da su u Francuskoj u odstranjivanju HCV uspješnije osobe koje imaju HLA-DRB1*0301 i DRB1*1101 alele bez obzira na njihovu dob, spol ili serotip virusa (54). To znači da bi perzistencija HCV mogla biti dijelom uvjetovana izostankom odgovora pomagačkih T limfocita. Prema Kazushiti i sur. HLA DR13 povezan je sa slabijim staničnim imunim odgovorom i kroničnim hepatitisom C niske aktivnosti (113). Higashi i sur. pokazali su da određene kombinacije alela I. i II. razreda MHC imaju aditivni učinak na povećanu sklonost za nastanak ciroze u toku kroničnog hepatitisa C, dok drugi aleli opet imaju zaštitnu ulogu kod progresije prema cirozi (114).

I.6.3. Interferon- α i HLA sustav

Interferon- α je temeljni kamen svakog liječenja KHC. Ovaj citokin je multifunkcionalni imunomodulator koji ima snažan učinak na citokinsku kaskadu, uključujući tu i neka protuupalna djelovanja (115). Izgleda da interferon- α postiže svoj antivirusni učinak pomoću STAT-3 signalnog puta, te putem intracelularne aktivacije gena. Ovo ima za posljedicu zaustavljanje umnožavanja subgenomske RNA i suzbijanje sinteze nestrukturiranih bjelančevina virusa (116,117). Nadalje, interferon- α povećava aktivnost NK stanica, poboljšava sazrijevanje CTL, te na površini hepatocita povećava ekspresiju molekula I. razreda HLA podupirući tako djelotvornije odstranjivanje inficiranih hepatocita putem pojačane aktivnosti CTL (118-121). Stoga je moguće da terapija interferonom- α u osoba s nedostatkom određenih HLA alela koji su bitni za proces eliminacije HCV neće dovesti do trajnog izlječenja.

Brojni autori su istraživali povezanost između ishoda liječenja interferonom- α i genotipa II. razreda HLA u bolesnika s KHC (122-127). Međutim, iako se prepoznavanje i odstranjivanje hepatocita inficiranih HCV-om događa u kontekstu HLA-A,B,C antigena, rijetko je istraživana uloga imunogenetskog profila I. razreda HLA u odgovoru na terapiju interferonom- α . Tako su Miyaguchi i sur. našli da je učestalost HLA-B55, -B62, -CW3 i -CW4 bila značajno veća u osoba koje su odgovorile nego u osoba koje nisu odgovorile na terapiju interferonom- α (128). S druge strane, oni nisu dokazali povezanost antigena I. razreda MHC sustava s perzistencijom HCV infekcije. Suprotno japanskim autorima, Romero-Gomez i sur. (123) nisu našli povezanosti između HLA A,B,C genotipa i uspješnosti monoterapije interferonom- α . Na važnost aktivacije sustava HLA upućuje rad Ballardinija i suradnika (102). Poznato je da osobe koje imaju kroničnu infekciju s visokom viremijom slabo odgovaraju na terapiju interferonom. Ti su istraživači našli da osobe s visokom viremijom i prije terapije interferonom imaju vrlo veliku ekspresiju molekula HLA-A,B,C i ne odgovaraju na terapiju interferonom. Obrnuto je u bolesnika s niskom viremijom. Oni imaju slabu ekspresiju HLA-A,B,C molekula i bolje odgovaraju na terapiju interferonom. U tom radu nisu analizirane genotipske razlike sustava MHC niti razine endogenog interferona u te dvije skupine. Iz njihovih rezultata i rezultata prije spomenutih autora proistječu dvije mogućnosti: 1) da su određeni naslijeđeni genotipovi sustava HLA uspješniji u eliminaciji virusa, i 2) da su neke osobe, usprkos povoljnom genotipu sustava HLA, neuspješne u njegovoj aktivaciji pri čemu bi im egzogeni interferon mogao biti od pomoći.

II. CILJ RADA

Cilj rada je istražiti povezanost između HLA-A,B,C genotipa bolesnika s KHC i uspješnosti terapije interferonom-alfa. Rezultati ovog istraživanja trebali bi pokazati postoje li među bolesnicima takvi HLA-A,B,C genotipovi koji značajno uspješnije ili, obrnuto od toga, značajno neuspješnije odgovaraju na primjenjenu terapiju. Dobiveni rezultat mogao bi biti doprinos boljem odabiru bolesnika za primjenu interferona- α , a u određenoj mjeri i doprinos boljem razumijevanju ključnih mehanizma djelovanja egzogenog interferona- α u osoba s KHC .

III. ISPITANICI I POSTUPCI

III.1. Plan ispitivanja i ispitanici

Na sudjelovanje u istraživanju pismenim putem je pozvano 60 uzastopnih bolesnika s trajnim virološkim odgovorom i 60 bolesnika bez trajnog virološkog odgovora na terapiju interferon- α . Svi bolesnici su zbog svog kroničnog hepatitisa C liječeni interferonom- α na Odjelu za zarazne bolesti Klinike bolnice Split u razdoblju od 1998-2001. godine.

Dijagnoza kroničnog hepatitisa C postavljena je na temelju pozitivnog nalaza HCV RNK i povećanih vrijednosti alanin aminotransferaze (ALT) kroz razdoblje praćenja od 6 ili više mjeseci. Ispitivanjem su obuhvaćeni muški i ženski bolesnici u dobi 18-65 godina koji su prije otpočinjanja terapije interferonom- α imali negativan HBsAg, negativan IgManti-HAV, negativan anti-HIV, pozitivan anti-HCV, pozitivan HCV RNK, povišene vrijednosti serumske ALT, histopatološki nalaz kroničnog aktivnog hepatitisa nakon biopsije jetara,

kompenziranu jetrenu bolest, hrvatsko podrijetlo, te žene fertile dobi koje su prije uvođenja terapije imale negativan test na trudnoću i koje su koristile djelotvornu kontracepciju tijekom liječenja. Kriteriji za isključenje iz ispitivanja obuhvaćali su bolesnike koji su prije otpočinjanja terapije imali jedno ili više od sljedećih stanja: dekompenziranu C cirozu, podatke o ascitesu, krvarenje iz varikoziteta jednjaka, tešku portalnu hipertenziju, serumske albumine <30 g/L, serumski bilirubin >50 mmol/L, leukocite $< 3,0 \times 10^9$ /L, trombocite $<75 \times 10^9$ /L, podatke o prirođenoj bolesti jetara, druge kronične bolesti jetara osim infekcije HCV, konzumiranje alkohola i drugu izloženost hepatotoksičnim tvarima, značajnu kardiovaskularnu bolest, tešku bolest bubrega, mijeloičnu disfunkciju, maligne neoplazme unutar 3 godine prije početka terapije, podatke o autoimunnoj bolesti (npr. sistemni lupus eritematosus, upalna bolest crijeva, teška psorijaza, reumatoidni artritis, idiopatska trombocitopenična purpura itd.), primjenu imunosupresivne ili antivirusne terapije prethodnih 6 mjeseci.

Određivanje HCV RNA učinjeno je prije otpočinjanja terapije i nakon 12 tjedana terapije. Onima koji su nakon 12 tjedana terapiji postali HCV RNA negativni ponovljeno je određivanje HCV RNK nakon 48 tjedana liječenja i nakon 24 tjedna praćenja po dovršenju terapije. Prije otpočinjanja terapije određen je genotip i učinjena kvantifikacija HCV. Svi bolesnici liječeni su konvencionalnim interferonom- α (Roferon[®]A, F.Hoffmann-La Roche LTD., Basel, CH) u dozi od 3 milijuna jedinica tri puta tjedno. Bolesnici koji su nakon 12 tjedana terapije postali HCV RNK negativni dovršili su ukupno 48 tjedana liječenja. Prema terapijskom odgovoru ispitanici su razvrstani u 2 skupine:

1. Skupina s trajnim virološkim odgovorom obuhvatila je bolesnike koji su ostali HCV RNK negativni nakon 24 tjedna od kompletiranja 48-tjedne terapije.

2. Skupina bez trajnog virološkog odgovora obuhvatila je bolesnike koji nisu imali rani terapijski odgovor (HCV RNA pozitivan nakon 12 tjedan terapije), kao i bolesnike koji su imali odgovor na kraju terapije (HCV RNK negativan nakon 12 i 48 tjedana terapije) ali su nakon 6 mjeseci od kompletiranja terapije opet postali HCV RNA pozitivni.

Tri bolesnika nisu udovoljila kriterijima uključenja, a pet bolesnika je odbilo sudjelovati u ispitivanju. Konačno je u ispitivanje uključeno 112 bolesnika, od kojih 55 s trajnim i 57 osoba bez trajnog virološkog odgovora na terapiju interferonom- α .

Za sve ispitanike prikupljeni su sljedeći podaci: dob, spol, HLA-A,B,C genotip, genotip virusa, kvantitativne vrijednosti HCV RNK, stupanj fibroze jetara i indeks histološke aktivnosti (HAI).

III.2. Postupci

III.2.1. HCV protutijela (anti-HCV) su određena pomoću Abbott AxSYM[®] SYSTEM aparata i reagensija (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Irving, TX, SAD) koji se temelji na Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) tehnologiji određivanja protutijela na strukturne i nestrukturne bjelančevine HCV genoma (HCcr43, c200, c100-3, NS-5) (130). Test je učinkovit u Centralnom laboratoriju Kliničke bolnice Split.

III.2.2. HCV RNK

III.2.2.1 Određivanje HCV RNK . HCV RNK u serumu je određena pomoću Amplicor HCV test, verzija 2.0 (Roche, Indianapolis, IN, SAD) čija je osjetljivost 50 IU/mL seruma.

III.2.2.2. Genotipizacija HCV. HCV je genotipiziran s pomoću INNO-LiPA II HCV (Innogenetics, Technology Park-Ghent, Belgija) metodom

reverzne hibridizacije (131), a rezultati su prikazani u skladu sa Simmondsovom klasifikacijom (132).

III.2.2.3. Kvantifikacija HCV RNK. Kvantifikacija HCV RNK je učinjena pomoću Amplicor HCV MONITOR test, verzija 2.0 (Roche, Indianapolis, IN, SAD) prema uputama proizvođača (133). Serumska HCV RNK izražena je u IJ/mL. Sve tri pretrage su učinjene u Imunološkom laboratoriju Klinike za infektivne bolesti “Dr Fran Mihaljević” u Zagrebu.

III.2.3. Određivanje HLA

III.2.3.1. Izolacija DNK učinjena je pomoću QIAamp®DNK Blood Midi Kit (QUIAGEN GmbH, Hilden, SR Njemačka) iz uzorka od 2 mL heparinizirane pune krvi.

III.2.3.2. Tipizacija HLA učinjena je u Laboratoriju za tipizaciju tkiva Odjela za kliničku patofiziologiju Kliničke bolnice Split aparatu Auto-LIPA (Abbot GmbH Diagnostica, Delkenheim, SR Njemačka) metodom reverzne hibridizacije (134). Učestalost HLA-A, -B i -Cw alela u zdravoj hrvatskoj populaciji prikazana je u radovima Čečuk-Jeličić u sur. (135,136).

III.2.4. Biopsija jetara učinjena je pomoću slijepa biopsije iglom. Preparate je pregledao histopatolog i odredio indeks histološke aktivnosti (HAI) od 0-22 po Kondell-Ishaku (72). Stupanj fibroze (F) je određen pomoću METAVIR sustava (F0= nema fibroze, F1= portalna fibroza bez pregrada, F2= portalna fibroza s rijetkim pregradama, F3= brojne pregrade bez ciroze, F4= ciroza) (74).

III.2.5. Određivanje ALT učinjeno je na aparatu OLYMPUS 600 (MISHIMA OLYMPUS CO. LTD., Nagaizumi-cho, Japan) s pomoću reagencija iste tvrtke.

III.3. Statistička analiza

Statistička analiza učinjena je korištenjem statističkog paketa SPSS 13 for WINDOWS. Razlike između promatranih varijabli analizirane su pomoću χ^2 testa, a *P*-vrijednosti <0.050 smatrane su statistički značajnim.

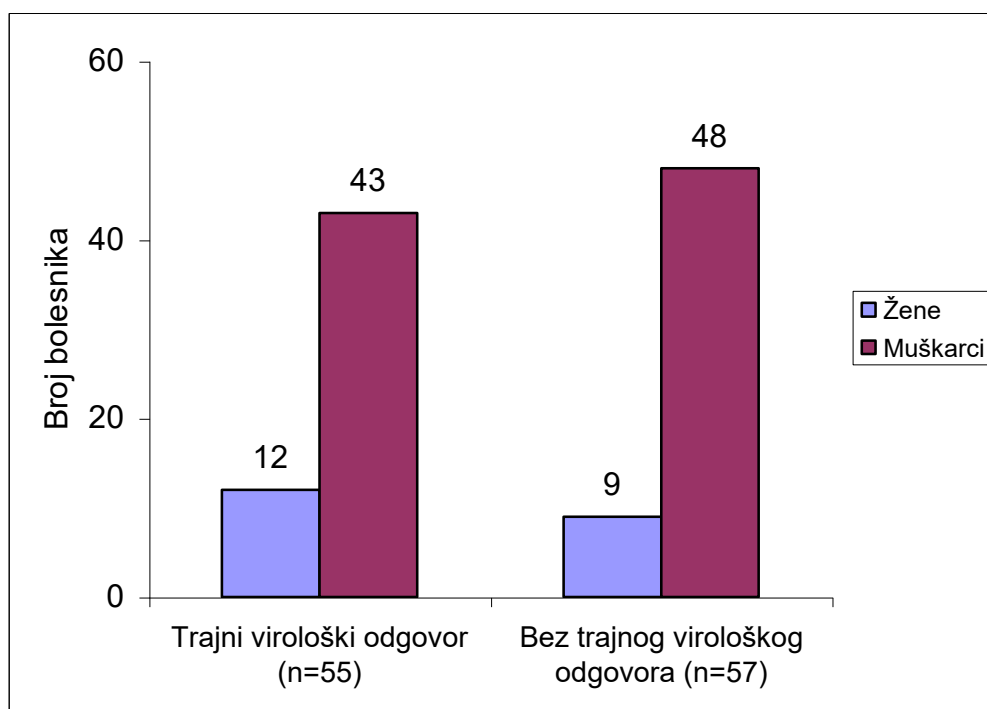
III.4. Etički standardi

Poštivane su etičke norme i hrvatski zakoni, kao i međunarodne konvencije. Suglasnost za istraživanje dobiveno je od Etičkog komiteta Kliničke bolnice Split. Bolesnici su uključeni u istraživanje nakon što su potpisali informativni pristanak.

IV. REZULTATI

U ispitivanju je sudjelovala 21 žena i 91 muškarac (Slika 7). U skupini s trajnim virološkim odgovorom žena je bilo 12/55 (22%), a u skupini bez trajnog virološkog odgovora 9/57 (16%). Nije bilo statistički značajne razlike po spolu između dvije skupine bolesnika ($\chi^2=0,3306$; $P>0,050$).

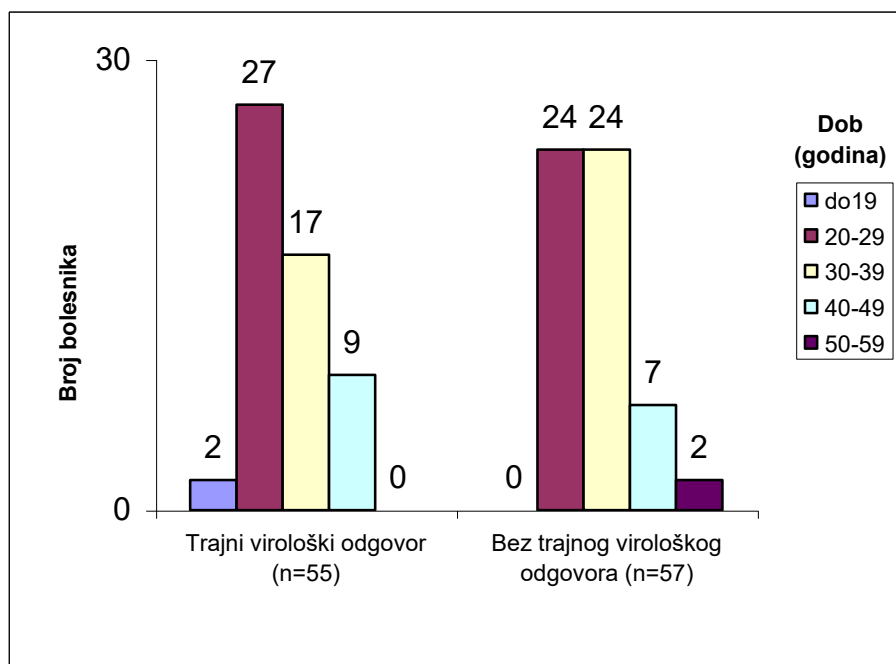
Slika 7. Rodna raspodjela bolesnika prema odgovoru na terapiju interferonom- α .



Prosječna dob ispitanika bila je $30,4 \pm 7,8$ godina u skupini s trajnim virološkim odgovorom, a $31,8 \pm 7,6$ godina u skupini bez trajnog virološkog odgovora na interferon- α .

Dobna raspodjela bolesnika bila je ujednačena u obje skupine (Slika 8). Dob ≤ 29 godina imalo je 52% ispitanika s trajnim i 42% bez trajnog virološkog odgovora što nije bila statistički značajno različito ($\chi^2=0,546$; $P>0,050$).

Slika 8. Dobna raspodjela bolesnika prema odgovoru na terapiju interferonom- α .



Genotipizacija HLA-A učinjena je u svih ispitanika i dobivena učestalost alela nije se značajno razlikovala od zdravih hrvatskih kontrola (Tablica 2).

Tablica 2. Učestalost HLA-A alela u ispitanika kroničnim hepatitisom C i zdravih hrvatskih kontrola.

HLA	Učestalost alela (%)	
	Ispitanici s KHC* (N=112)	Zdrave kontrole# (N= 150)
A 01	10,7	9,7
A 02	23,2	28,2
A 03	9,4	11,0
A 11	5,8	4,0
A 23	2,2	2,3
A 24	15,6	16,0
A 25	3,6	3,3
A 26	8,5	5,3
A 29	0,6	1,0
A 30	1,8	1,6
A 31	4,5	3,0
A 32	4,9	6,7
A 33	3,1	2,3
A 66	0,4	0,3
A 68	4,9	4,7
A 74	0,9	0,0

$\chi^2= 9,21$; $P= 0,863$

Legenda

*kronični hepatitis C

Čečuk-Jeličić E i sur. Human Immunology 2004.

Učestalost HLA-A alela nije se statistički značajno razlikovala između skupine bolesnika s trajnim i skupine bolesnika bez trajnog virološkog odgovora (Tablica 3). Homozigotnost za HLA-A utvrđena je u 3 bolesnika s trajnim virološkim odgovorom (A01/01 u dva, A02/02A u jednog), te u 9 ispitanika bez trajnog virološkog odgovora (A01/01 u jednog, A02/02 u 4, A03/03 u jednog, A24/24 u 2, A31/31 u jednog).

Tablica 3. Raspodjela HLA-A u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prema terapijskom odgovoru na interferon- α .

HLA	Broj alela		Ukupno
	Trajni virološki odgovor (n= 55)	Bez trajnog virološkog odgovora (n=57)	
A 01	11	13	24
A 02	24	28	52
A 03	8	13	21
A 11	8	5	13
A 23	4	1	5
A 24	19	16	35
A 25	3	5	8
A 26	11	8	19
A 29	1	0	1
A 30	2	2	4
A 31	3	7	10
A 32	8	3	11
A 33	2	5	7
A 66	1	0	1
A 68	4	7	11
A 74	1	1	2

$\chi^2=10,13$; $P= 0,518$

Nije bilo značajne razlike u učestalosti HLA-B alela između ispitanika s KHC i zdravih kontrola (Tablica 4).

Tablica 4. Učestalost HLA-B alela u ispitanika kroničnim hepatitisom C i zdravih hrvatskih kontrola.

HLA	Učestalost alela (%)	
	Ispitanici s KHC* (N=112)	Zdrave kontrole# (N=150)
B 06	0,5	np [§]
B 07	6,0	9,7
B 08	4,0	3,7
B 13	2,0	2,0
B 14	2,5	2,3
B 15	7,1	7,4
B 16	1,0	np
B 18	10,0	11,3
B 27	5,1	6,1
B 35	11,6	12,1
B 36	0,5	np
B 37	1,5	2,0
B 38	6,6	6,7
B 39	2,5	2,0
B 40	3,0	3,7
B 41	1,5	1,7
B 44	8,1	8,3
B 49	2,5	0,0
B 50	1,0	1,3
B 51	11,6	12,7
B 52	0,5	0,3
B 55	0,5	0,7
B 56	0,5	1,3
B 57	2,0	2,0
B 58	1,0	1,3
B 59	1,0	0,0
B 60	1,0	np
B 61	1,0	np
B 62	1,0	np
B 67	1,5	0,0
B 75	1,0	np

$\chi^2 = 10,40$; $P = 0,296$;

Legenda

* kronični hepatitis C

Čečuk-Jeličić E i sur. Human Immunology 2004.

§ nema podataka

Učestalost HLA-B alela nije se značajno razlikovala između bolesnika s trajnim i bolesnika bez trajnog virološkog odgovora (Tablica 5). Međutim, određivanje HLA-B nije uspjelo u 13 ispitanika: u 4 bolesnika s trajnim i 9 bolesnika bez trajnog virološkog odgovora. Homozigotnost B08/08 je nađena u jednog bolesnika koji je imao trajni virološki odgovor na terapiju interferonom- α .

Tablica 5. Raspodjela HLA-B u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prema terapijskom odgovoru na interferon.

HLA	Broj alela		
	Trajni virološki odgovor (n= 55)	Bez trajnog virološkog odgovora (n=57)	Ukupno
B 06	1	0	1
B 07	8	4	12
B 08	6	2	8
B 13	2	2	4
B 14	2	3	5
B 15	8	6	14
B 16	2	0	2
B 18	12	8	20
B 27	4	6	10
B 35	14	9	23
B 36	0	1	1
B 37	1	2	3
B 38	5	8	13
B 39	3	2	5
B 40	3	3	6
B 41	1	2	3
B 44	8	8	16
B 49	2	3	5
B 50	2	0	2
B 51	8	15	23
B 52	1	0	1
B 55	1	0	1
B 56	1	1	1
B 57	3	1	4
B 58	0	2	2
B 59	0	2	2
B 60	2	0	2
B 61	1	1	2
B 62	0	2	2
B 67	1	2	3
B 75	1	1	2

$\chi^2 = 8,397$; $P = 0,396$

Nije bilo značajne razlike u učestalosti HLA-Cw alela između ispitanika s KHC i zdravih kontrola (Tablica 6).

Tablica 6. Učestalost HLA-Cw alela u ispitanika kroničnim hepatitisom C i zdravih hrvatskih kontrola.

HLA	Učestalost alela (%)	
	Ispitanici s KHC* (N=112)	Zdrave kontrole# (N= 144)
Cw 01	9,5	4,2
Cw 02	10,0	8,0
Cw 03	10,0	8,7
Cw 04	6,0	20,5
Cw 05	7,5	9,1
Cw 06	7,5	9,7
Cw 07	17,5	18,1
Cw 08	4,5	2,8
Cw 09	1,0	np ^{&}
Cw 11	0,5	np
Cw 12	12,5	6,9
Cw 14	2,5	1,7
Cw 15	4,0	0,7
Cw 16	4,5	2,0
Cw 17	2,5	0,7
Cw 19	0,5	np
Cw 20	0,5	np
Cw 23	0,5	np
Cw 25	0,5	np

$\chi^2=13,725; P= 0,403$

Legenda

* kronični hepatitis C

Čečuk-Jeličić E i sur. Period Bilog. 1999.

& nema podatka

Učestalost HLA-Cw07 alela je bila statistički značajno veća u skupini ispitanika s trajnim nego u skupini bolesnika bez trajnog virološkog odgovora (Tablica 7). Određivanje HLA-Cw nije uspjelo u 5 bolesnika s trajnim i u 5 bolesnika bez trajnog virološkog odgovora na terapiju interferonom- α . Homozigotnost Cw03/03 nađena je u jednog bolesnika koji je bio bez trajnog virološkog odgovora.

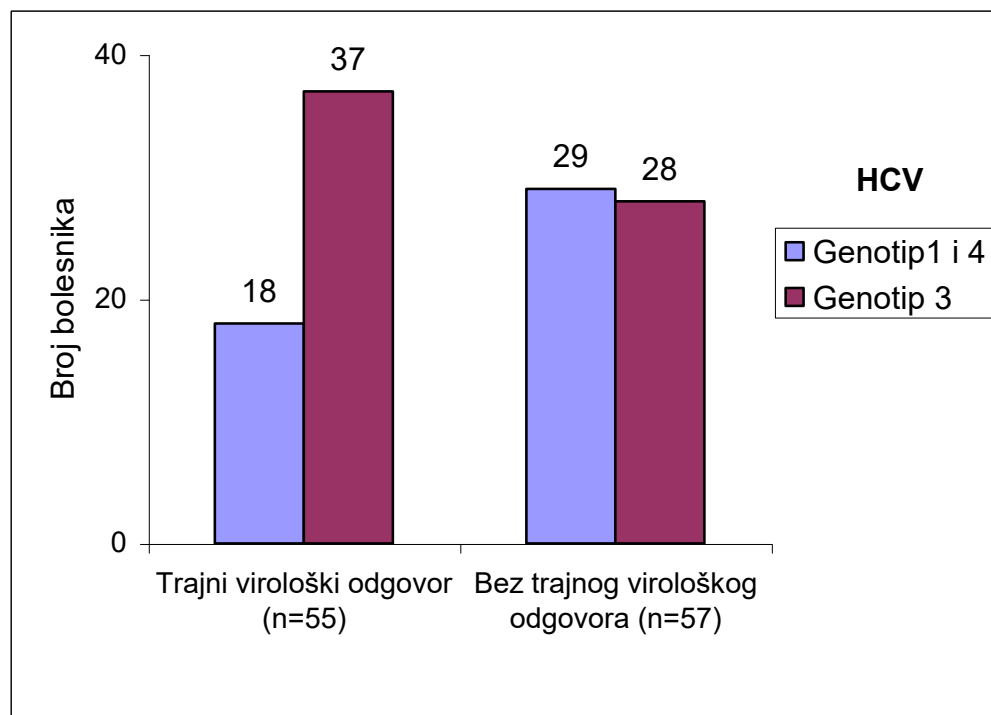
Tablica 7. Raspodjela HLA-Cw u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prema terapijskom odgovoru na interferon- α .

HLA	Broj alela		Ukupno
	Trajni virološki odgovor (n= 55)	Bez trajnog virološkog odgovora (n=57)	
Cw 01	6	13	19
Cw 02	9	11	20
Cw 03	8	12	20
Cw 04	8	5	13
Cw 05	9	6	15
Cw 06	5	10	15
Cw 07	27*	7*	34
Cw 08	3	6	9
Cw 09	0	2	2
Cw 11	0	1	1
Cw 12	15	10	25
Cw 14	2	3	5
Cw 15	2	6	8
Cw 16	3	6	9
Cw 17	2	3	5
Cw 19	1	0	1
Cw 20	0	1	1
Cw 23	0	1	1
Cw 25	0	1	1

* χ^2 -test= 11,77 ; P= 0,011

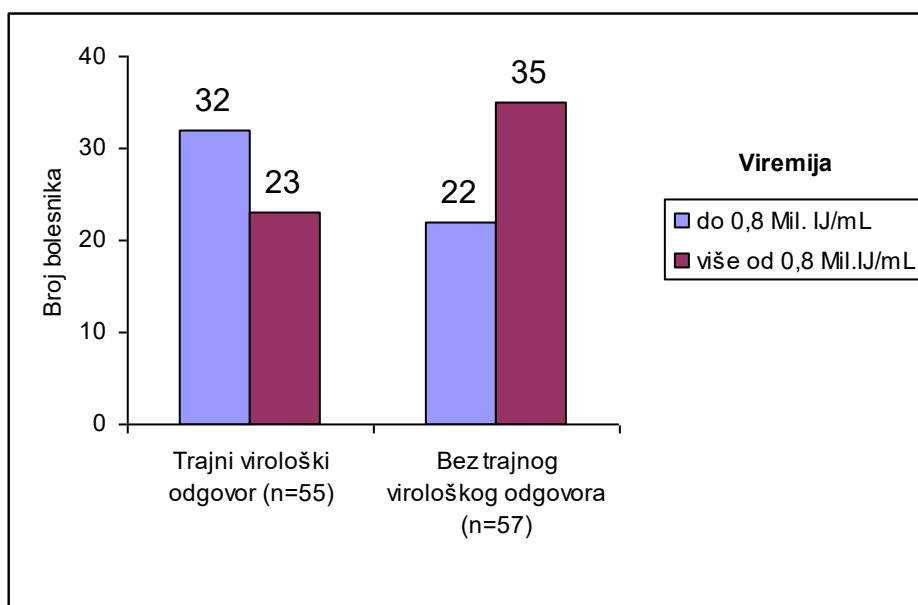
HCV genotip 1 imalo je 47/112 (41,9%), dok je genotip 3 imalo 65/112 (58%) ispitanika (Slika 9). Nijedan bolesnik nije imao HCV genotip 2. Samo jedan bolesnik imao je HCV genotip 4 i nije odgovorio na terapiju interferonom- α . U skupini s trajnim virološkim odgovorom bilo je dva puta više ispitanika s HCV-om genotip 3 (66%) nego ispitanika s HCV genotip 1 (33%). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova virusa između skupine s trajnim i skupine bez trajnog virološkog odgovora ($\chi^2=3,077$; $P < 0,050$).

Slika 9. Raspodjela genotipova HCV prema terapijskom odgovoru na interferon- α .



S obzirom na viremiju prije početka liječenja bolesnici su razvrstani u dvije glavne skupine: skupina s nižom viremijom ($\leq 0,8$ milijuna IU/mL) i skupina s visokom viremijom ($\geq 0,8$ milijuna IU/mL) (Slika 10). Iako je u skupini s trajnim virološkim odgovorom nižu viremiju imalo 32/55 (58%), a u skupini bez trajnog virološkog odgovora 22/57 (38%) ispitanika, dobivene frekvencije nisu se statistički značajno razlikovale ($\chi^2 = 3,55$; $P > 0,050$).

Slika 10. Raspodjela bolesnika s kroničnim hepatitisom C prema na viremiji prije početka liječenja i odgovoru na terapiju interferon- α .



Nije bilo statički značajne povezanosti između HLA-A alela i razine viremije prije početka terapije interferonom- α (Tablica 8).

Tablica 8. Raspodjela HLA-A u bolesnika kroničnim hepatitisom C prema viremiji prije otpočinjanja terapije interferonom- α .

HLA	Broj alela		Ukupno
	Viremija $\leq 0,8$ Mil IJ/mL	Viremija $> 0,8$ Mil IJ/mL	
A 01	11	13	24
A 02	25	27	52
A 03	12	9	21
A 11	6	7	13
A 23	3	2	5
A 24	14	21	35
A 25	5	3	8
A 26	7	12	19
A 29	1	0	1
A 30	2	2	4
A 31	4	6	10
A 32	4	7	11
A 33	2	7	7
A 66	1	0	1
A 68	6	5	11
A 74	0	2	2

$\chi^2 = 5,41$; $P = 0,381$

Nije bilo statistički značajne povezanosti između HLA-B alela i razine viremije prije početka liječenja interferonom- α (Tablica 9).

Tablica 9. Raspodjela HLA-B prema viremiji u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije početka terapije interferonom- α .

HLA	Broj alela		Ukupno
	Viremija $\leq 0,8$ Mil IJ/mL	Viremija $> 0,8$ Mil IJ/mL	
B 06	1	0	1
B 07	9	3	12
B 08	7	6	8
B 13	1	3	4
B 14	3	2	5
B 15	11	3	14
B 16	1	1	2
B 18	13	7	20
B 27	6	4	10
B 35	11	12	23
B 36	0	1	1
B 37	3	0	3
B 38	3	10	13
B 39	3	2	5
B 40	2	4	6
B 41	2	1	3
B 44	7	9	16
B 49	1	4	5
B 50	2	0	2
B 51	12	11	23
B 52	0	1	1
B 55	0	1	1
B 56	1	1	1
B 57	1	3	4
B 58	1	1	2
B 59	2	0	2
B 60	1	1	2
B 61	0	2	2
B 62	1	1	2
B 67	1	2	3
B 75	1	1	2

$\chi^2 = 8,80$; $P = 1,091$

Nije bilo statistički značajne povezanosti između HLA-Cw alela i viremije prije početka liječenja (Tablica 10).

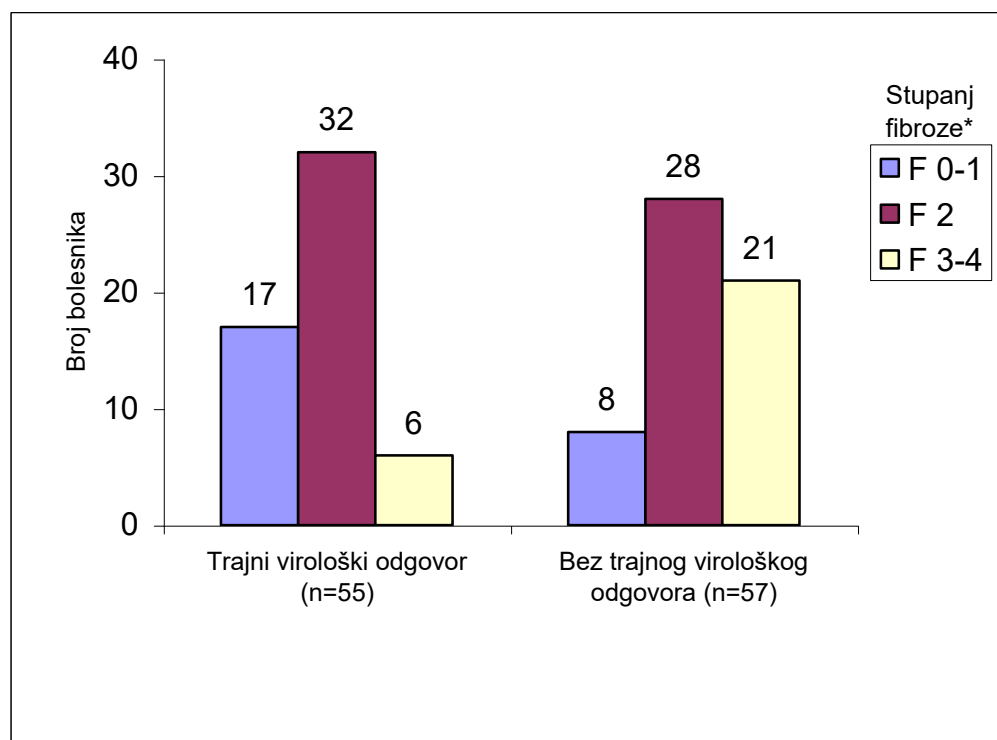
Tablica 10. Raspodjela HLA-Cw prema viremiji u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije početka terapije interferonom- α .

HLA	Broj alela		Ukupno
	Viremija $\leq 0,8$ Mil IJ/mL	Viremija $> 0,8$ Mil IJ/mL	
Cw01	12	10	19
Cw02	8	12	20
Cw03	8	11	20
Cw04	6	7	13
Cw 05	9	6	15
Cw 06	5	9	15
Cw 07	18	16	34
Cw 08	4	4	9
Cw09	0	2	2
Cw 11	0	1	1
Cw12	16	9	25
Cw14	1	3	5
Cw15	2	6	8
Cw16	5	4	9
Cw17	4	1	5
Cw19	1	0	1
Cw20	0	1	1
Cw23	0	1	1
Cw25	0	1	1

$\chi^2 = 4,54$; $P = 0,920$

Među ispitanicima je najviše bilo onih s umjerenim stupnjem fibroze jetara (F2) s podjednakom zastupljenošću u obje skupine (Slika 11). Niti jedna osoba nije bila bez fibroze jetara (F0). Samo tri bolesnika imala su cirozu (F4) i sva tri su bila bez odgovora na terapiju inteferonom- α . Iako je niži stupanj fibroze (F1) u skupni s trajnim virološkim odgovorom imalo 17/55 (31%), a u skupini bez trajnog virološkog odgovora 8/57 (14%) ispitanika, uočena razlika nije bila statistički značajna ($\chi^2=3,674$ $P> 0,050$). Viši stupanj fibroze (F3-4) imalo je u skupini s trajnim virološkim odgovorom 6/55 (11%) ispitanika, a u skupini bez trajnog virološkog odgovora 21/57 (36%) ispitanika. Razlika je statistički značajna ($\chi^2=6,180$, $P<0,050$).

Slika 11. Raspodjela stupnjeva fibroze u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prema terapijskom odgovoru na interferon- α .



Legenda:

* (F0= nema fibroze, F1= portalna fibroza bez pregrada, F2= portalna fibroza s rijetkim pregradama, F3= brojne pregrade bez ciroze, F4= ciroza)

Nije bilo statistički značajne povezanosti između HLA-A alela i stupnjeva fibroze jetara (Tablica 11).

Tablica 11. Raspodjela HLA-A u bolesnika kroničnim hepatitisom C prema stupnju fibroze.

HLA	Broj alela			ukupno
	F*= 0-1	F= 2	F= 3-4	
A 01	5	11	8	24
A 02	9	32	11	52
A 03	4	12	5	21
A 11	1	7	5	13
A 23	2	2	1	5
A 24	4	26	5	35
A 25	4	2	2	8
A 26	3	8	8	19
A 29	0	0	1	1
A 30	2	2	0	4
A 31	2	7	1	10
A 32	4	7	0	11
A 33	2	4	1	7
A 66	0	1	0	1
A 68	4	5	2	11
A 74	1	1	0	2

$\chi^2=7,33$; $P= 0,504$

Legenda:

*Stupnjevi fibroze (F0= nema fibroze, F1= portalna fibroza bez pregrada, F2= portalna fibroza s rijetkim pregradama , F3= brojne pregrade bez ciroze , F4= ciroza).

Nije bilo statistički značajne povezanosti između HLA-B alela i stupnjeva fibroze jetara (Tablica 12).

Tablica 12. Raspodjela HLA-B u bolesnika kroničnim hepatitisom C prema stupnju fibroze.

HLA	Broj alela			Ukupno
	F*= 0-1	F= 2	F= 3-4	
B 06	0	1	0	1
B 07	5	4	3	12
B 08	2	4	2	8
B 13	1	2	1	4
B 14	2	3	0	5
B 15	5	5	4	14
B 16	0	0	1	2
B 18	8	11	2	20
B 27	1	7	2	10
B 35	7	11	6	23
B 36	0	1	0	1
B 37	1	1	1	3
B 38	0	8	5	13
B 39	0	4	1	5
B 40	0	5	1	6
B 41	1	1	1	3
B 44	1	9	6	16
B 49	0	3	2	5
B 50	0	2	0	2
B 51	4	9	10	23
B 52	1	0	0	1
B 55	0	1	0	1
B 56	0	0	1	1
B 57	2	2	0	4
B 58	1	0	1	2
B 59	0	1	1	2
B 60	0	1	1	2
B 61	0	2	0	2
B 62	0	2	0	2
B 67	0	2	1	3
B 75	0	1	1	2

$\chi^2= 8,99; P= 0,459$

Legenda:

* Stupnjevi fibroze (F0= nema fibroze, F1= portalna fibroza bez pregrada, F2= portalna fibroza s rijetkim pregradama , F3= brojne pregrade bez ciroze , F4= ciroza).

Nije bilo statistički značajne povezanosti između HLA-Cw alela i stupnjeva fibroze jetara (Tablica 13).

Tablica 13. Raspodjela HLA-Cw u bolesnika kroničnim hepatitisom C prema stupnju fibroze.

HLA	Broj alela			Ukupno
	F*= 0-1	F= 2	F= 3-4	
Cw01	6	9	4	19
Cw02	3	11	6	20
Cw03	2	15	3	20
Cw04	4	8	1	13
Cw 05	2	10	3	15
Cw 06	5	7	3	15
Cw 07	7	19	8	34
Cw 08	3	3	3	9
Cw09	1	1	0	2
Cw 11	0	0	1	1
Cw12	7	14	4	25
Cw14	0	3	2	5
Cw15	4	2	2	8
Cw16	2	4	3	9
Cw17	0	4	1	5
Cw19	0	1	0	1
Cw20	0	1	0	1
Cw23	1	0	0	1
Cw25	0	1	0	1

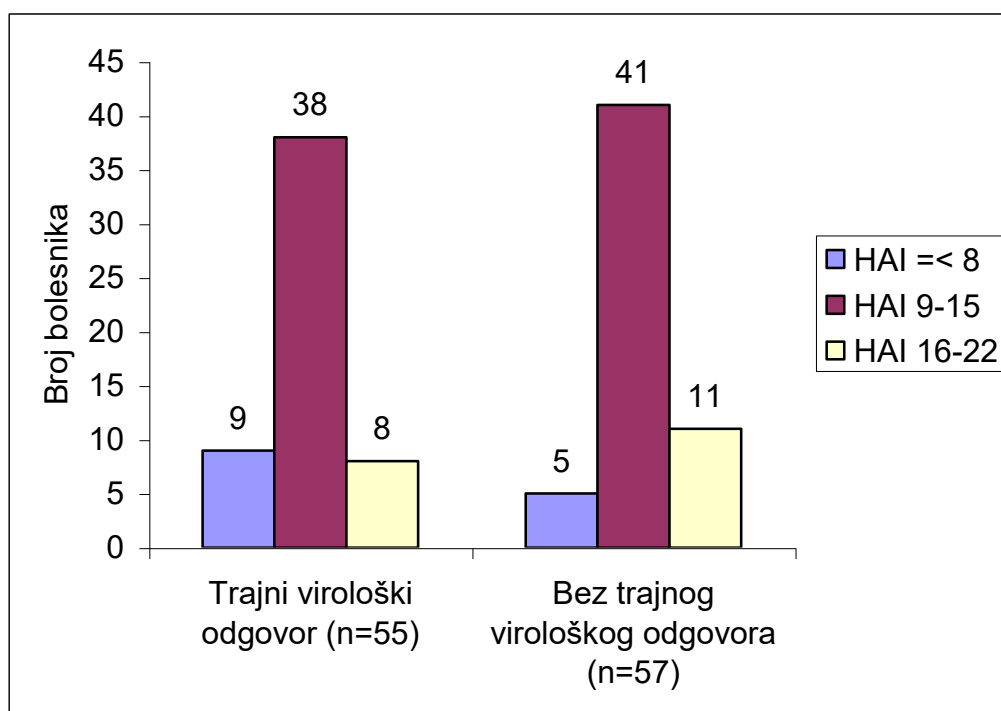
$\chi^2= 3,04 ; P= 0,613$

Legenda:

* Stupnjevi fibroze (F0= nema fibroze, F1= portalna fibroza bez pregrada, F2= portalna fibroza s rijetkim pregradama , F3= brojne pregrade bez ciroze , F4= ciroza).

Između ispitivanih skupina bolesnika nije bilo značajne razlike u raspodjeli prema indeksu histološke aktivnosti (HAI) (Slika 12). U obje skupine najveći broj ispitanika imao je umjereni stupanj histološke aktivnosti (HAI= 9-15). Niži stupanj histološke aktivnosti (HAI≤ 8) u skupini tajnim virološkim odgovorom imalo je 9/55 (16%), a u skupini bez trajnog virološkog odgovora 5/57 (8%) ispitanika. Ova razlika nije bila statistički značajna ($\chi^2= 0,862$; $P>0,05$).

Slika 12. Raspodjela bolesnika prema indeksu histološke aktivnosti (HAI) i odgovoru na terapiju interferonom- α .



Nije bilo statistički značajne povezanosti između raspodjele HLA-A alela i indeksa histološke aktivnosti (HAI) u bolesnika s kroničnim hepatitisom C (Tablica 14).

Tablica 14. Raspodjela HLA-A u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prema indeksu histološke aktivnosti (HAI).

HLA	Broj alela			Ukupno
	HAI ≤8	HAI 9-15	HAI 16-22	
A 01	6	15	3	24
A 02	11	29	12	52
A 03	1	17	3	21
A 11	2	8	3	13
A 23	1	2	2	5
A 24	7	23	5	35
A 25	1	5	2	8
A 26	5	8	6	19
A 29	0	1	0	1
A 30	1	2	1	4
A 31	3	6	1	10
A 32	2	6	3	11
A 33	0	5	2	7
A 66	0	0	1	1
A 68	3	6	2	11
A 74	1	1	0	2

$\chi^2= 9,812; P= 0,601$

Nije bilo statistički značajne povezanosti između raspodjela HLA-B alela i indeksa histološke aktivnosti (HAI) u bolesnika s kroničnim hepatitisom C (Tablica 15).

Tablica 15. Raspodjela HLA-B u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prema indeksu histološke aktivnosti (HAI).

HLA	Broj alela			Ukupno
	HAI ≤8	HAI 9-15	HAI 16-22	
B 06	0	1	0	1
B 07	3	7	2	12
B 08	2	4	2	8
B 13	2	3	0	4
B 14	1	2	2	5
B 15	5	6	3	14
B 16	0	1	1	2
B 18	3	11	6	20
B 27	2	4	4	10
B 35	6	12	5	23
B 36	0	0	1	1
B 37	0	2	1	3
B 38	5	5	3	13
B 39	3	1	1	5
B 40	1	3	2	6
B 41	0	3	0	3
B 44	4	9	3	16
B 49	1	2	2	5
B 50	0	1	1	2
B 51	6	13	4	23
B 52	1	0	0	1
B 55	0	1	0	1
B 56	1	1	0	1
B 57	0	3	1	4
B 58	1	1	0	2
B 59	2	0	0	2
B 60	0	1	1	2
B 61	0	1	1	2
B 62	1	1	0	2
B 67	2	0	1	3
B 75	0	1	1	2

$\chi^2=7,930$; $P= 0,184$

Nije bilo statistički značajne povezanosti između raspodjela HLA-C alela i indeksa histološke aktivnosti (HAI) u bolesnika s kroničnim hepatitisom C (Tablica 16).

Tablica 16. Raspodjela HLA-C u bolesnika s kroničnim hepatitisom C prema indeksu histološke aktivnosti (HAI).

HLA	Broj alela			ukupno
	HAI ≤8	HAI 9-15	HAI 16-22	
Cw01	2	13	4	19
Cw02	4	11	5	20
Cw03	1	16	3	20
Cw04	2	10	1	13
Cw 05	3	8	4	15
Cw 06	3	9	3	15
Cw 07	5	22	7	34
Cw 08	1	6	2	9
Cw09	0	1	1	2
Cw 11	0	1	0	1
Cw12	5	17	3	25
Cw14	2	2	1	5
Cw15	1	3	4	8
Cw16	4	3	2	9
Cw17	2	1	2	5
Cw19	0	1	0	1
Cw20	1	0	0	1
Cw23	0	0	1	1
Cw25	0	0	1	1

$\chi^2 = 6,605$; $P = 0,296$

V. RASPRAVA

Među 112 ispitanika bilo je 19% žena (Slika 7). Znatno veća zastupljenost muškaraca među oboljelim od KHC odražava činjenicu da je preko 90% naših ispitanika inficirano HCV-m putem intravenske ovisnosti, a što je u Hrvatskoj i drugdje raširenija pojava među muškarcima nego među ženama (137-139). Žene s KHC bolje odgovaraju na terapiju interferonon- α nego muškarci, pa je ženski spol jedan od prediktora povoljnog terapijskog ishoda (140,141). Udio žena među našim ispitanicima bio je neznajno veći u skupini s trajnim nego u skupini bez trajnog virološkog odgovora (22% naprama 16%). Vrlo je vjerojatno da bi s povećanjem broja ispitanika ova razlika dobila na značajnosti.

Starija dob bolesnika ima nepovoljan utjecaj na ishod liječenja KHC pomoću interferona- α (141-143). Međutim, među našim ispitanicima samo su 2/112 (0,8%) bila u dobi ≥ 50 godina i obojica su bila bez trajnog terapijskog odgovora (Slika 8). U dobnoj skupini od 40-49 godina bilo je 16/112 (14%) ispitanika s ravnomjernom zastupljenošću u skupini s trajnim i skupini bez trajnog virološkog odgovora (16% naprama 12%). Preko 80% ispitanika bilo je u dobi ≤ 39 godina starosti što se podudara s činjenicom o izbijanju epidemije intravenske ovisnosti početkom 1990-ih u Hrvatskoj (137). Ovoliko prevaga mlađih dobnih skupinama najvjerojatniji je razlog što se u relativno malom uzorku ispitanika ovog ispitivanja nije i utvrđena statistički značajna povezanost starije dobi i nepovoljnog terapijskog ishoda nakon primjene interferona- α .

Učestalost HLA-A alela u naših ispitanika (Tablica 2) nije se razlikovala od njihove učestalosti u zdravoj hrvatskoj populaciji (135). Među 112 ispitanika najveća je bila učestalost A01 (11%), A02 (23%) i A24 (15%) alela. Raspodjela HLA-A alela je bila ravnomjerna u skupini s trajnim i skupini bez trajnog

virološkog odgovora (Tablica 3), pa nije niti nađena veza između nekog od ovih gena i povoljnog ili nepovoljnog ishoda liječenja KHC interferonom- α . Niti drugi autori nisu našli povezanost između HLA-A genotipa i terapijskog ishoda (128,129).

Učestalost HLA-B alela u 112 ispitanika s KHC i u zdravih kontrola nije se značajno razlikovala (Tablica 4). Za 7 alela (B06, B16, B36, B60, B61, B62 i B75) koji su bili niske učestalosti (0,5-1%), nije bilo poredbenih podataka u zdravoj hrvatskoj populaciji. Pored toga Čečuk-Jeličić (135) i sur. nisu našli nijednog zdravog ispitanika s alelom B67, dok ih je u ovom istraživanju bilo 3%. No, daljnjom obradom podataka nije nađena povezanost HLA-B67 s niti jednom od osobina KHC ispitivanih bolesnika.

Raspodjela HLA-B alela nije bila značajno različita u skupni bolesnika s trajnim i skupini bez trajnog virološkog odgovora (Tablica 5). Romero-Gomez i sur. našli su povezanost HLA-B44 i uspješnog liječenja kroničnog hepatitisa C pomoću kombinacije interferonom- α i ribavirinom, ali te povezanosti nije bilo u bolesnika koji su liječeni samo interferonom- α (129). Rezultat je zanimljiv jer otvara pitanje mogućeg imunomodulacijskog mehanizma djelovanja ribavirina u kombiniranoj terapiji. Drži se da je glavni način djelovanja ribavirina na HCV infekciju inhibicija domaćinove inozin monofosfat dehidrogenaze i inhibicija RNK-ovisne RNK polimeraze (144). No poznato je da ribavirin u drugim vrstama RNK virusnih infekcija ima i brojna druga djelovanja među kojima je i modulacija domaćinovog imunog odgovora (84,85,145). Rad ovih autora sugerira da bi to moglo biti od značaja u HCV infekciji.

Učestalost HLA-Cw07 alela je bila značajno veća u skupini s trajnim nego u skupini bolesnika bez trajnog virološkog odgovora (Tablica 7). Ovaj rezultat

upućuje da bi prisustvo Cw07 alela moglo utjecati na djelotvornije odstranjivanje inficiranih hepatocita u bolesnika koji se liječe interferonom- α . Prava je oskudica dostupnih radova koji ispituju povezanost HLA-A,B,C gena s liječenjem interferonom, a rezultati su im proturječni. Miyaguchi i sur. našli su u japanskih bolesnika s KHC da je bolji terapijski odgovor na interferon- α bio povezan s alelima HLA-B55, -B62, -Cw03 i Cw04, ali i s nižim vrijednostima viremije prije početka terapije (128). Stoga njihov rezultat ne dopušta zaključiti da je povoljan terapijski ishod posljedica izravnog međusobnog utjecaja HLA i interferona- α . Kao što je već rečeno, a za razliku od japanskih autora, Romero-Gomez i suradnici nisu našli povezanost između HLA-A,B,C alela i monoterapije interferonom- α (129). Uz mogućnost da u nekoj populaciji određeni HLA-A,B,C genotipovi mogu biti povezani s ishodom terapije interferonom- α , još uvijek ne znači da je upravo ta povezanost od presudnog značenja za terapijski ishod. Štoviše, nije moguće niti kazati koji je stvarni mehanizam ovakvog utjecaja. Rezultati Paula i sur. upućuju na to da interferonom- α potaknuta ekspresija molekula I. razreda HLA nije bila presudna odrednica terapijskog ishoda u kroničnom hepatitisu B (121). Rezultati Shiine i sur. upućuju na mogućnost da povoljan učinak interferona- α u bolesnika s KHC ne mora uključivati indukciju citotoksičnih T limfocita (146). Osim toga, rad Frenija i sur. upućuje da je odstranjivanje virusa tijekom uspješnog liječenja KHC prije posljedica izravnog antivirusnog učinka nego imunološki posredovanih mehanizama djelovanja interferona- α (147). Konačno, Sim i sur. našli su utjecaj alela II. razreda HLA, i to -DRB1 alela, na povoljan terapijski učinak interferona- α u KHC (116), dok rad Tajvanskih autora (148) govori o složenosti imunološkog odgovora u kojoj terapija interferon- α pokazuje povezanost i s I. i II. razredom HLA.

NK stanice su važna prva linija prirođenog imuniteta i njihova aktivnost može utjecati na tijek akutne HCV infekcije (149). Interferon- α povećava aktivnost NK stanica, a HLA-Cw7 pripada skupni 1 liganada KIRs (engl.: killer immunoglobulin-like receptors) koji su ključni regulatori aktivnosti NK stanica (150) Stoga je moguće da u hrvatskih bolesnika interferon- α djeluje putem HLA-Cw7 koji vezuje određene KIRs. Naravno, za ocjenu važnosti NK stanica u liječenju kroničnog hepatitisa C pomoću interferona- α potrebna su daljnja istraživanja. Stoga je vrlo vjerojatno da interferon- α u većine bolesnika postiže svoj terapijski učinak kombinacijom svojih imunomodulacijskih i izravnih antivirusnih svojstava.

Značajnost rezultata dobivenih u ovom istraživanju ograničena je relativno malim brojem ispitanika, nedostatkom od kojeg pate i ostale usporedive studije (128,129,148). Povezanost između HLA-A,B,C genotipa i terapijskog odgovora na interferon- α rijetko je ispitivana u bolesnika bijele rase. Osim u ovom radu, izgleda da je to bio slučaj jedino u istraživanju španjolskih autora, mada se iz njihovog opisa bolesnika ne vidi da je rasna pripadnost bila kriterij uključenja u istraživanje (129).

U skupni bolesnika s trajnim virološkim odgovorom bilo je dva puta više bolesnika s HCV-om genotipa 3 nego genotipa 1 i 4 (Slika 9). Ovaj rezultat je u skladu s poznatom činjenicom da osobe s HCV genotipom 2 i 3 odgovaraju bolje, a osobe s genotipom 1 i 4 slabije na terapiju interferonom- α (151-153). Međutim, raspodjela HCV genotipova u skupini bez trajnog virološkog odgovora bila je ravnomjerna pa i nije nađena statistički značajna razlika u raspodjelu genotipova između ispitivanih skupina bolesnika. Iako je trend u zastupljenosti genotipova u skladu s literaturom, odsustvo statistički značajne razlike možda leži u načinu

uzorkovanja. Naime, na učešće u istraživanju je pozvano po 60 uzastopnih bolesnika s trajnim i 60 bolesnika bez trajnog virološkog, a ne 120 uzastopnih bolesnika bez obzira na ishod terapije.

Pored genotipa HCV, razina HCV RNK prije početka liječenja je drugi važan prediktor terapijskog odgovora na interferon- α (19,151,152). Što je niža viremija to su i veći izgledi za postizanje trajnog virološkog odgovora. Mada je i u ovom istraživanju s viremijom $\leq 0,8$ milijuna IU/mL bilo više bolesnika u skupini s trajnim nego u skupini bez trajnog virološkog odgovora (Slika 10), ova razlika nije bila statistički značajna. Odsustvo statistički značajnosti možda i ovdje leži u načinu uzorkovanja. Isto tako obradom nije nađena povezanost između viremije i HLA-A (Tablica 8), HLA-B (Tablica 9) i HLA-Cw (Tablica 10) alela. Drugi autori koji su se bavili ovim pitanjem našli su povezanost između HLA sustava i razine viremije u KHC. Tako su jedni u bolesnika s KHC našli da su HLA-A34, -B56 i -DR1502 povezani s većom, a -B4011 manjom viremijom (154), dok su drugi našli povezanost isključivo s genima II. razreda HLA (155). Slično kao i u slučaju povezanosti HLA sustava i održavanju kronične HCV infekcije, za očekivati je da postoji i povezanost genetskih faktora i razine viremije. Različitost rezultata koje su polučili pojedini autori tek treba objasniti.

U pogledu raspodjela stupnjeva fibroze jetara (Slika 11) niži stupanj fibroze (F=0-1) imalo je više bolesnika u skupini s trajnim virološkim odgovorom. Ovaj podatak je u skladu s literaturom da niži stupanj fibroze nosi bolji terapijski odgovor (19,156), premda u ovom istraživanju u tom pogledu nije nađena statistički značajna razlika između dvije skupine ispitanika. Međutim, u skupini bez trajnog virološkog odgovora bilo je značajno više ispitanika s višim stupnjevima fibroze jetara (F=3-4). Rezultat je očekivan jer je visoki stupanj

fibroze jedan od najznačajnijih faktora slabog virološkog odgovora na terapiju interferonom- α (157). Nije nađena povezanost između stupnja fibroze jetara i HLA-A (Tablica 11), HLA-B (Tablica 12) i HLA-Cw (Tablica 13) alela. Niti drugi autori nisu našli povezanost između stupnjeva fibroze jetara i alela I. razreda HLA (158). Kuzushita i suradnici su našli da HLA-B54 utječe na progresiju bolesti prema cirozi (55). Ispitivana je i povezanost fibroze s molekulama II. razreda HLA pri čemu su neki autori našli slabu ili nikakvu (159,160), dok su drugi našli značajnu povezanost (55,161,162).

Raspodjela HAI prema terapijskom odgovoru nije se razlikovala između dviju ispitivanih skupina (Slika 12). Iako su periportalna nekroza, te lobularna i portalna upala u izravnoj vezi s razvojem fibroze, za razliku od fibroze, HAI samo po sebi nema tako jasnu prediktivnu snagu za ishod liječenja KHC pomoću interferona- α (163). Isto tako nije bilo niti značajne razlike u učestalosti HLA-A (Tablica 14), HLA-B (Tablica 15) i HLA-Cw (Tablica 16) alela prema stupnjevima histološke aktivnosti. Ispitujući alele II. razreda HLA Alric i sur. (54) su našli značajno veću učestalost HLA-DRB1 u bolesnika s nižim skorom histološke aktivnosti. Czaja i sur. nisu našli povezanosti između HLA-DR antigena i intenziteta kroničnog hepatitisa C (164). U dostupnoj literaturi nije nađeno radova koji istražuju povezanost HAI s HLA razreda I.

VI. ZAKLJUČCI

1. Prisustvo HLA-Cw07 u hrvatskih bolesnika s kroničnim hepatitisom C može poslužiti kao prognostički faktor povoljnog terapijskog odgovora na interferon- α .
2. Prisustvo HLA-Cw07 može ukazivati na povoljni terapijski odgovor i u slučaju primjene kombinirane terapije, posebno peginterferonom i ribavirinom.
3. Odsustvo HLA-Cw07 ne može poslužiti kao isključni kriterij za liječenje, posebno ako se koristi kombinirana terapija.

VII. SAŽETAK

Cilj. Cilj istraživanja bio je ocijeniti povezanost između humanih leukocitnih antigena (HLA) klase I i terapijskog odgovora na interferon- α u hrvatskih bolesnika s kroničnim hepatitisom C. **Metode.** HLA-A,B,C genotipizacija učinjena je u 55 bolesnika s trajnim virološkim odgovorom i 57 bolesnika bez trajnog odgovora na terapiju interferonom- α . Ispitanici su liječeni u razdoblju od 1998.-2001. godine interferonom- α u dozi od 3 milijuna jedinica tri puta tjedno. Bolesnici koji su nakon 12 tjedana terapije postali hepatitis C virus RNA negativni kompletirali su 48 tjedana liječenja. **Rezultati.** Nije bilo povezanosti između terapijskog ishoda i učestalosti HLA-A, kao i HLA-B alela. HLA-Cw07 alel bio je značajno učestaliji u skupini s trajnim virološkim odgovorom nego u skupini bez trajnog virološkog odgovora ($P < 0.050$). **Zaključak.** U hrvatskih bolesnika s kroničnim hepatitisom C nalaz HLA-Cw07 alela je pozitivan prediktor trajnog virološkog odgovora na terapiju inteferonom- α .

VIII. SUMMARY

Objective. The aim of the study was to evaluate association between human leukocyte antigens (HLA) class I and therapeutic response to interferon- α in Croatian patients with chronic hepatitis C. **Methods.** HLA-A,B,C genotyping was done in 55 patients with sustained virological response and in 57 patients without sustained virological response to interferon- α therapy. Examinees were treated in the period from 1998-2001 with interferon- α at dose of 3 million units three times a week. Patients that after 12 weeks of therapy became hepatitis C virus RNA negative completed 48 weeks of therapy. **Results.** There was no association between therapeutic outcome and frequency of HLA-A, as well as of HLA-B alleles. HLA-Cw07 was significantly more frequent in patients with than in patients without sustained virological response ($P < 0.050$). **Conclusion.** In Croatian patients with chronic hepatitis C finding of HLA-Cw07 is predictor of sustained virological response to interferon- α therapy.

IX. LITERATURA

1. Robertson B, Meyers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et.al.
Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol. 1998;143:2493-503.
2. Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. J Virol. 1997;71:9417-26.
3. Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, Van Arsdale T, Hwang SB, Jeng KS, et.al.
Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. J Virol. 1997;71:1301-9.
4. Zhu NL, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, et.al. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. J Virol. 1998;72:3691-7.
5. Herzer K, Falk CS, Encke J, Eichhorst ST, Ulsenheimer A, Seliger B, et.al.
Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. J Virol. 2003;77:8299-309.
6. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Barciale TJ, Hahn YS.
Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. J Clin Invest. 2000;106:1239-49.
7. Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Goianis D, Strazzer A, et.al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by

- hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:15394-9.
8. Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Hijikata M, Ohkoshi S, Shimothono K. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol*. 1993;67:3923-30.
9. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, et.al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:3468-72.
10. Tanji Y, Hijikata M, Satoh S, Kaneko T, Shimotohno K. Hepatitis C virus polyprotein processing: kinetics and mutagenic analysis of serine proteinase-dependent cleavage. *J Virol*. 1994;68:8418-22.
11. Failla C, Tomei L, Francesco R. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*. 1994;68:3753-60.
12. Yao NH, Hesson T, Cable M, Hong Z, Kwong AD, Le HV, et.al. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol*. 1997;4:463-7.
13. Kim JL, Morgenstern KA, Griffit JP, Dwyer MD, Thomson JA, Marucko MA, et.al. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure*. 1998;6:89-100.
14. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, et.al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*. 2003;300:1145-8.

15. Negro F, Pacchioni D, Shimitzu Y, Miller RH, Bussolati G, Purcell RH, et.al. Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization and comparison with histopathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:2247-51.
16. Shimitzu YK, Igarashi H, Kanematu T, Fujiwara K, Wong DC, Purcell RH, et.al. Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol*. 1997;71:5769-73.
17. Lam NP, Neumann AU, gretch DR, Wiley TE, Perelson AS, Layden TJ. Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology*. 1997;26:226-31.
18. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol*. 2004;85:3173-88..
19. Gheorghe L, Iacob S, Sporea I, Grigorescu M, Sirli R, Damian D, et.al. Efficacy, tolerability and predictive factors of sustained virological response in patients with weight based dosing regimen of PegIFN alpha-2b ribavirin in real life healthcare setting. *J Gastrointest Liver Dis*. 2007;16:23-9.
20. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8239-43.
21. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et.al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*. 1992;66:3225-9.

22. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Sem Liver Dis.* 1995;15:41-63.
23. Kao J-H, Chen PJ, Lai MY, Wanh TH, Chen DS. Quasispecies of hepatitis C virus and genetic drift of the hypervariable region in chronic type C hepatitis. *J Infect Dis.* 1995;172:261-4.
24. Kato N, Ootsuyama Y, Sekiya H, Ohkoshi S, Nakazawa T, Hijakata M, et al. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol.* 1994;68:4776-84.
25. Weiner A, Arickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, Hughes AL, et al. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:2755-9.
26. Vucelić B, Hrستیć I, Begovac J, Bradarić N, Burek V, Čolić-Cvrlje V, et al. Viral hepatitis: Croatian consensus statement. *Acta Med Croat.* 2005;5:359-75.
27. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PJ, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA.* 1990;264:2231-5.
28. Bolumar F, Hernandez-Aguado I, Ferrer L, Ruiz I, Avino MJ, Rebagliato M. Prevalence of antibodies to hepatitis C in a population of intravenous drug users in Valencia, Spain, 1990-1992. *Int J Epidemiol.* 1996 Feb;25(1):204-9.
29. Bell J, Batey RG, Farrel GC, Crewe EB, Cunningham AL, Byth K. Hepatitis C virus in intravenous drug users. *Med J Aust.* 1990;153:274-6.

30. Patti AM, Santi AL, Pompa MG, Giustini C, Vescia N, Mastroeni I, Fara GM. Viral hepatitis and drugs: a continuing problem. *Int J Epidemiol.* 1993;22:135-9.
31. Alter MJ, Mast EE, Moyer LA, Margolis HS. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am.* 1998;12:13-26.
32. Liou TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol.* 1992;37:197-202.
33. Chen M, Yun ZB, Sallberg M, Schvarcz R, Bergquist I, Berglund HB, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in the cell fraction of saliva before and after oral surgery. *J Med Virol.* 1995;45:223-6.
34. Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin JT, Chen DS. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses. *J Med Virol.* 1992;36:28-31.
35. Fiore RJ, Potenza D, Monno L, Appica A, DiStefano M, Gianelli A, et al. Detection of HCV RNA in serum and seminal fluid from HIV-1 co-infected intravenous drug addicts. *J Med Virol.* 1995;46:364-7.
36. Mendel I, Muraine M, Riachi G, el Forzli F, Bertin C, Colin R, et al. Detection and genotyping of the hepatitis C RNA in tear fluid from patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 1997;51:231-3.
37. Lai Me, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgili S, Balestrieri A, Purcell RH, et al. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet.* 1994;343:889-90.

38. Brettler DB, Alter HJ, Dienstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood*. 1990;76:254-6.
39. Blajchman MA, Bull SB, Feinman SV. Post-transfusion hepatitis: impact of non-A, non-B hepatitis surrogate tests. Canadian Post-Transfusion Hepatitis Prevention Study Group. *Lancet*. 1995 7;345:21-5.
40. Morfini M, Mannucci PM, Ciavarella N, Schiavoni M, Gringeri A, Rafanelli D, et.al. Prevalence of infection with the hepatitis C virus among Italian hemophiliacs before and after the introduction of virally inactivated clotting factor concentrates: a retrospective evaluation. *Vox Sang*. 1994;67:178-82.
41. Yap L, McOmish F, Webster AD, Hammarstrom L, Smith C, Bjorkander J, et.al. Hepatitis C virus transmission by intravenous immunoglobulin. *J Hepatol*. 1994;21:455-60.
42. Reinus JF, Leikin EL, Alter HJ, Cheung L, Shindo M, Jett B, et.al. Failure to detect vertical transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med*. 1992;117:881-6.
43. Lam JP, McOmish F, Burns SM, Yap PL, Mok JY, Simmonds P. Infrequent vertical transmission of hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 1993;167:572-6.
44. Ogasawara S, Kage M, Kosai K, Shimatsu K, Kojiro M. Hepatitis C virus RNA in saliva and breastmilk of hepatitis C carrier mothers. *Lancet*. 1993;341:561.
45. Kumar RM, Shahul S. Role of breast-feeding in transmission of hepatitis C virus to infants of HCV-infected mothers. *J Hepatol*. 1998;29:191-7.

46. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, et.al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med.* 1991;325:1325-9.
47. Tomg MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med.* 1995 1;332:1463-6.
48. Wright TL,, Hsu H, Donegan E, Feinstone S, Greenberg H, Read A, et.al. Hepatitis C virus not found in fulminant non-A, non-B hepatitis. *Ann Intern Med.* 1991;115:111-2.
49. Yanagi M, Kaneko S, Unoura M, Marukami S, Kobayashi K, Sugihara J, et.al. Hepatitis C virus in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med.* 1991;324:1895-6.
50. Koretz RL, Abbey H, Coleman E, Gitnick G. Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. Looking back in the second decade. *Ann Intern Med.* 1993;119:110-5.
51. Foster GR, Goldin RD, Thomas HC. Chronic hepatitis C virus infection causes a significant reduction in quality of life in the absence of cirrhosis. *Hepatology.* 1998;27:209-12.
52. Shakil AO, Conry-Cantilena C, Alter HJ, Hayashi P, Kleiner DE, Tedeschi V, et.al. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. The Hepatitis C Study Group. *Ann Intern Med.* 1995;123:330-7.
53. Vucelić B, Hrstić I. Virusni hepatitis: klinička i histološka ocjena. *Acta Med Croat.* 2005;59:397-404.

54. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel J-P, Charlet J-P, Selves J, et al. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 1997;113:1675-81.
55. Kuzushita N, Hayashi N, Maribe T, Katayama K, Kanto T, Nakatani S, Kaneshige T, et al. Influence of HLA haplotypes on the clinical course of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology*. 1998;27: 240–244.
56. Shakil AO, Conry-Cantilena C, Alter HJ, Hayashi P, Kleiner DE, Tedeschi V, et al. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: Clinical, biochemical, virologic, and histologic features. *Ann Intern Med*. 1995;123:330–337.
57. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: A retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*. 1997;112:463–472.
58. Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzi F, Leandro G, Bono F, et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*. 1997;25:754-8.
59. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med*. 1992;327:1490-5.
60. Misiani R, Bellavita P, Fenilli D, Borelli G, Marchesi D, Massazza M, et al. Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med*. 1992;117:573-7.
61. Herrero C, Vicente A, Burugera M, Ercilla MG, Barrera JM, Vidal J, et al. Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda? *Lancet*. 1993;341:788-9.

62. Tran A, Quaranta JF, Benzaken S, Thiers V, Chau HT, Hastier P, et.al. High prevalence of thyroid autoantibodies in a prospective series of patients with chronic hepatitis C before interferon therapy. *Hepatology*. 1993 ;18:253-7.
63. Gumber SC, Chopra S. Hepatitis C: a multifaceted disease. Review of extrahepatic manifestations. *Ann Intern Med*. 1995;123:615-20.
64. Couruce AM, Le Marrec N, Girault A, Duxamp S, Simon N. Anti-hepatitis C virus (anti-HCV) seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second- and third-generation anti-HCV assays. *Transfusion*. 1994;34:790-5.
65. Damen M, Zaaier HL, Cuypers HT, Vrieling H, van der Poel CL, Reesink HW, et.al. Reliability of the third-generation recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus. *Transfusion*. 1995;35:745-9.
66. Lau JY, Davis GL, Kniffen J, Quian KP, Urdea MS, Chan CS, et.al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet*. 1993;341:1501-4.
67. Nguyen TT, Sedghi-Vaziri A, Wilkes LB, Mondala T, Pockors PJ, Lindsay KL, et.al. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepat*. 1996;3:75-8.
68. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahri H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et.al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology*. 2002;36:211-8.
69. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H, et.al. Typing of hepatitis C virus isolates and

- characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol.* 1993;74:1093-102.
70. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2259-66.
71. Perillo RP, The role of liver biopsy in hepatitis C. *Hepatology.* 1997;26:57S-61S.
72. Knodell AJ, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application to a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology.* 1981;1:431-5.
73. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Guadt F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995;22:696-9.
74. Bedossa P, Poynard T. The METAVIR cooperative group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996;24:289-93.
74. Poynard T, McHutchinson J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2002;122:1303-13.
75. Marellin P, Boyer N, Gervais A, Martinot M, Pouteau M, Castelnau C, et al. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med.* 1997;127:875-81.

76. Davis GL. Tailoring antiviral therapy in hepatitis C. *Hepatology*. 2006;43:909-11.
77. Sanchez-Tapias JM, Diago M, Escartin P, Enriquez J, Romero-Gomez M. Peginterferon-alfa2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. *Gastroenterology*. 2006;131:451-60.
78. Ferenci P. Pegylated interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C: the role of combination therapy today, tomorrow and in the future. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2006;52:157-74.
79. Poynard T, McHutchinson J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, et.al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;122:1303-13.
80. Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, Morimoto H, Takeda T, Nakajima S, et.al. Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet*. 1995;346:1051-5.
81. Morgenstern KA, Llandro JA, Hsiao K, Lin C, Gu Y, Su MS, et.al. Polynucleotide modulation of the protease, nucleoside triphosphatase, and helicase activities of a hepatitis C virus NS3-NS4A complex isolated from transfected COS cells. *J Virol*. 1997;71:3767-75.
82. Neumann AU, Lam NP, Dahri H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, et.al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. 1998;282:103-7.

83. Zeuzem S, Feinman SV, rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, et.al.
Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med.*
2000;343:1666-72.
84. Lanford RE, Guerra B, Lee H, Averett DR, Pfeifer B, Chavez D, et.al.
Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon,
gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin
in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol.* 2003;77:1092-104.
85. Patterson JL, Fernandez-Larsson R. Molecular mechanisms of action of
ribavirin. *Rev Infect Dis.* 1990;12:1139-46.
86. National Institutes of Health Consensus Development Conference
Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002.
Hepatology. 2002;36:S3-20.
87. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL,
et.al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus
infection. *N Engl J Med.* 2002;347:975-82.
88. Chang KM. The mechanisms of chronicity in hepatitis C virus infection.
Gastroenterology 1998;115:1015-8.
89. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C. *Int J Med Sci*
2006;3:47-52.
90. Tsai S-L, Chen Y-M, Chen M-H, Huang C-Y, Sheen I-S, Yeh C-T, et al.
Hepatitis C virus variants circumventing Cytotoxic T lymphocyte activity as
a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1988;115:954-66.
91. Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H.
Neutralization antibodies against hepatitis C virus and emergence of
neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 1994;68:1494-500.

92. Ishii K, Rosa D, Katayama T, Harada H, Wyatt C, Kiyosawa K, *i sur.* High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;28:1117-20.
93. Yamaguchi K, Tanaka E, Higashi K, Kiyosawa K, Matsumoto A, Furuta S, *i sur.* Adaptation of hepatitis C virus for persistent infection in patients with acute hepatitis. *Gastroenterology* 1994;106:1344-8.
94. Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Marumo F, Sato C. Sequential change of hypervariable region of hepatitis C virus genome in acute infection. *J Med Virol* 1994;42:103-8
95. Kato N, Ootsuyama Y, Sekiya H, Ohkoshi S, Nakazawa T, Hijakata M, *i sur.* Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 1994;68:4476-84.
96. Adams G, Kuntz S, Rabalais G, Bratcher D, Tamburro CH, Kotwal GJ. Natural recovery from acute hepatitis C virus infection by agammaglobulinemic twin children. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16:533-4.
97. Feray C, Gigou M, Samuel D, Ducot B, Maisonneuve P, Reynes M, *et al.* Incidence of hepatitis C in patients receiving different preparations of hepatitis B immunoglobulins after liver transplantation. *Ann Intern Med.* 1998;128:810-6)
98. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Grakoui A., Rice CM, Choo Q-L. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterisation of patterns of cytokine release. *J Clin Invest* 1995;96:2311-21.

99. Lopez-Labrador FX, Ampurdanes S, Gimenez-Barcons M, Gulera M, Costa J, Jimenez de Anta MT, i sur. Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology*. 1999;29:897-903.
100. Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. A comparative review of HLA association with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol*. 2007;13:1770-87.
101. Marušić M, Kovač Z. Immunopathophysiology: Immunopathogenic role of HLA. In: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, editors. *Pathophysiology*. Zagreb: Medicinska naklada; 2002. p.430-435.
102. Ballardini G, Groff P, Pontisso P, Giostra F, Francesconi R, Lenzi M, i sur. Hepatitis C virus (HCV) genotype, tissue HCV antigens, hepatocellular expression of HLA-A,B,C, and intercellular adhesion-1 molecules. *J Clin Invest*. 1995;95:2067-75.
103. Erickson AL, Houghton M, Choo QL, Weiner AJ, Ralston R, Muchmore E, i sur. Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol*. 1993;151:4189-99.
104. Battegay M, Fikes J, Di Bisceglie AM, Wentworth PA, Sette A, Celis E, i sur. Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus-encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecules. *J Virol*. 1995;69:2462-70.
105. Cerny A, McHutchinson JG, Pasquinelli C, Brown ME, Brothers MA, Grabscheid B, i sur. Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-

- derived peptides containing the HLA-A2.1 binding motif. *J Clin Invest.* 1995;95:521.
106. Lechner F, Gurener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kramer R, et al. CD8⁺ T lymphocytes responses are induced during acute C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol.* 2000; 39: 2479.
107. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4⁺ T cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 1999; 117:933.
108. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2003; 7:89-105.
109. Peano G, Menardi G, Ponzetto A, Ponzetto A, Fengolio LM. HLA-DR5 antigen. A genetic factor influencing the outcome of hepatitis C virus infection? *Arch Intern Med.* 1994;154:2733-6.
110. Zavaglia C, Martinetti M, Silini E, Botelli R, Daielli C, Ast M, i sur. Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology.* 1998;28:1-7.
111. Congia M, Clemente MG, Dessi C, Cucca F, Mazzoleni AP, Frau F, i sur. HLA class II genes in chronic hepatitis virus infections and associated immunological disorders. *Hepatology.* 1996;24:1338-41.
112. Tibbs C, Donaldson P, Underhill J, Thomson L, Monabe K, Williams R. Evidence that HLA DQA1*03 allele confer protection from chronic HCV-infection in Northern European caucasoids. *Hepatology.* 1996;24:1342-5.

113. Kuzushita N, Hayashi N, Katayama K, Hiramatsu N, Yasumaru M, Murata H, et al. Increased frequency of HLA DR13 in hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. *J Med Virol*. 1996;48:1-7.
114. Higashi Y, Kamikawaji N, Suko H, Ando M. Analysis of HLA alleles in Japanese patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 1996;11:241-6.
115. Tilg H. New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology*. 1997;112:1017-21.
116. Zhu H, Zhao H, Collins CD, Eckenrode SE, Run Q, McInnes RA, et al. Gene expression associated with interferon alfa antiviral activity in an HCV replicon cell line. *Hepatology*. 2003;37:1180-8.
117. Peters M. Action of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology* 1996; 23:909-16.
118. Pignatelli M, Walters J, Brown D, Lever A, Iwarson S, Schaff Z, et al. HLA class I antigens on the hepatocyte membrane during recovery from acute hepatitis B virus infection and during interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 1986;6:349-53.
119. Samuel C. Antiviral action of interferons. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology*. 1991;183:1-11.
120. Lohr HF, Schmitz D, Arenz M, Weyer S, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH. The viral clearance in interferon-treated chronic hepatitis C is associated with increased cytotoxic T cell frequencies. *J Hepatol*. 1999;31:407-15.

121. Paul RG, Roodman ST, Campbell CR, Bodicky CJ, Perillo RP. HLA class I antigen expression as a measure of response to antiviral therapy of chronic hepatitis B. *Hepatology*. 1991;13:820-5.
122. Sim H, Wojcik J, Margulies M, et al. Response to interferon therapy: influence of human leukocyte antigen alleles in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 1998;5:249-53.
123. Kikuchi I, Ueda A, Mihara K, Myanaga O, Machiodori H, Ishikawa E, Tamura K. The effects of HLA alleles on response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10:859-63.
124. Wawrzynowicz-Syczewska M, Underhill JA, Clare MA, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Donaldson PT. HLA class II genotypes associated with chronic hepatitis C virus infection and response to alpha-interferon treatment in Poland. *Liver*. 2000;20:234-9.
125. Almarri A, El Dwick N, Al Kabi S, Sleem K, Rashed A, Ritter MA, Batchelor JR. Interferon-alpha therapy in HCV hepatitis: HLA phenotype and cirrhosis are independent predictors of clinical outcome. *Hum Immunol*. 1998;59:239-42.
126. Muto H, Tanaka E, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kyosava K, and Nagano Interferon Treatment Research Group. Types of human leukocyte antigen and decrease in HCV core antigen in serum for predicting efficacy of interferon- α in patients with chronic hepatitis C: analysis by prospective study. *J Gastroenterol*. 2004;39:674-80.
127. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of HLA class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The

- HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet*. 1999; 354:2119-24.
128. Miyaguchi S, Saito H, Ebinuma H, et al. Possible association between HLA antigens and response to interferon in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens*. 1997;49:605-11.
129. Romero-Gomez M, Gonzalez-Escribano MF, Torres B, Barroso N, Montes-Cano MA, Sanchez-Munoz D, Nunez-Roldan A, et al. HLA Class I B44 is associated with sustained response to interferon + ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *American J Gastroenterology*. 2003;1621-6.
130. Hennig H, Schlenke P, Kirchner H, Bauer I, Schulte-Kellinghaus B, Bludau H. Evaluation of newly developed microparticle enzyme immunoassays for the detection of HCV antibodies. *J Virol Methods*. 2000 Feb;84(2):181-90.
131. Young KK, Resnick RM, Myers TW. Detection of HCV RNA by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol*. 1993;31:882-6.
132. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol*. 1999;31:54-60.
133. Saldanha J, Lelie N, Heath A, Establishment of the first international standards for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Wox Sang*. 1999;76:149-58.
134. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol*. 1996;2259-66.

135. Čečuk-Jeličić E, Grubić Z, Štingl K, Žunec R, Brkljačić-Kehirm V. HLA-A and -B frequencies in a population from Croatia. *Human Immunology*. 2004;65:912-16.
136. Čečuk-Jeličić E, Grubić Z, Brkljačić-Kehirm v, Kaštelan A. Comparison of serology and DNA methods for HLA-Cw typing in Croatian population. *Pediod Biol*. 1999;101:71-5.
137. Sakoman S. Substance abuse in the Republic of Croatia and National program for drug control. *CMJ*. 2000;41:270-86.
138. Shuterland I, Willner P. Patterns of alcohol, cigarette and illicit drug use in English adolescent. *Addiction*. 1998;93:1199-208.
139. Isralowitz R, Rawson R. Gender differences in prevalence of drug use among high risk adolescents in Israel. *Addict Behav*. 2006;31:355-8.
140. Xie Y, Xu DZ, Lu ZM, Luo KX, Jia YM, Zhao GZ, et.al. Predictive factors for sustained response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C: a randomized, open, and multi-center controlled trial. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2005;4:213-9.
141. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsui H, Sezaki H, Suzuki Y, et.al. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol*. 2007 Mar;46(3):403-10.
142. Narasimhan G, Sargios TN, Kalakuntla R, Homel P, Clain DJ, Theiese ND, et.al. Treatment rates in patients with chronic hepatitis C after liver biopsy. *J Viral Hepat*. 2006;13:783-6.

143. Hosogaya S, Ozaki Y, Enomoto N, Akahane Y. Analysis of prognostic factors in therapeutic response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Transl Reas.* 2006;148:79-86.
144. Ogawa M, Morisada A. Novel mode of action of ribavirin (Rebetol), a drug for the treatment of chronic hepatitis C: inducing the mutation of RNA viruses. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2002;120:398-408.
145. Picardi A, Gentilucci UV, Zardi EM, D'Avola D, Amoroso A, Afeltra A. The role of ribavirin in the combination therapy of hepatitis C virus infection. *Curr Pharm Des.* 2004;10:2081-92.
146. Shiina M, Kobayashi K, Kobayashi T, Kondo Y, Ueno Y. Dynamics of immature subsets of dendritic cells during antiviral therapy in HLA-A24-positive chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol.* 2006;41:758-64.
147. Freni MA, Ajello A, Sparado A, Fava A, Calapristi I, Marafioti T. Class I HLA antigens hepatic display and beta-2-microglobulin serum values in chronic hepatitis C: effect of treatment with recombinant alpha interferon. *Hepatogastroenterology.* 1997;44:1295-301.
148. Ming-Lung Y, Chi-Yen D, Shinn-Cherng C, Chao-Chin C, Li-Po L, Zu-Yau Lin, et al. Human leucocyte antigen class I and II alleles and response to interferon- α treatment, in Taiwanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2003;188:62-5.
149. Rauch A, Laird R, McKinnon E, Telenti A, Furrer H, Weber R, et al.; the Swiss HIV Cohort Study. Influence of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors and their HLA-C ligands on resolving hepatitis C virus infection. *Tissue Antigens.* 2007;69(Suppl 1):237-40.

150. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol.* 2007;149:1-8.
151. Reddy KR, Hoofnagle JK, Tong MJ, Lee WM, Pockros P, Heathcote EJ, et al. Racial differences in responses to therapy with interferon in chronic hepatitis C. Consensus Interferon Study Group. *Hepatology.* 1999 Sep;30:787-93.
152. Konlle PA, Kremp S, Hohler T, Krummenauer F, Schirmacher P, Gerken G. Viral and host factors in the prediction of response to interferon-alpha therapy in chronic hepatitis C after long-term follow-up. *J Viral Hepat.* 1998;5:339-406.
153. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.*
154. Wang LY, Lin HH, Lee TD, Wu YF, Hu CT, Cheng ML, et al. Human leucocyte antigen phenotypes and hepatitis C viral load. *J Clin Virol.* 2005;32:144-50.
155. Fanning LJ, Levis J, Kenny-Walsh E, Whelton M, O'Sullivan K, Shanahan F. HLA class II genes determine the natural variance of hepatitis C viral load. *Hepatology.* 2001;33:224-30.
156. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. 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.

157. Everson GT, Hoefs JC, Seff LB, Bonkovsky HL, Naishadham D, Shiffaman ML, et al. Impact of disease severity on outcome of antiviral therapy for chronic hepatitis C: Lessons from the HALT-C trial. *Hepatology*. 2006;44:1675-84.
158. Patel K, Norris S, Lebeck L, Feng A, Clare M, Pianko S, et al. HLA class I allelic diversity and progression of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2006;43:241-9.
159. McKiernan SM, Hagan R, Curry M, McDonald GS, Nolan N, Crowley J, et al. The MHC is a major determinant of viral status, but not fibrotic stage, in individuals infected with hepatitis C. *Gastroenterology*. 2000;118:1124-30.
160. Hue S, Cacoub P, Renou C, Halfon P, Thibault V, Charlotte F, et al. Human leukocyte antigen class II alleles may contribute to the severity of hepatitis C virus-related liver disease. *J Infect Dis*. 2002 ;186:106-9.
161. Higashi Y, Kamikawaji N, Suko H, Ando M. Analysis of HLA alleles in Japanese patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 1996;11:241-6.
162. Aikawa T, Kojima M, Onishi H, Tamura R, Fukuda S, Suzuki T, et al. HLA DRB1 and DQB1 alleles and haplotypes influencing the progression of hepatitis C. *J Med Virol*. 1996;49:274-8.
163. Wong VS, Wight DG, Palmer CR, Alexander GJ. Fibrosis and other histological features in chronic hepatitis C virus infection: a statistical model. *J Clin Pathol*. 1996;49:465-9.

164. Czaja AJ, Carpenter H, Santrach PJ, Moore SB. DR human leukocyte antigens and disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1996;24:666-73.

X. ŽIVOTOPIS

Ivo Ivić rođen je 22. lipnja 1957. godine u Trogiru. Nakon završene gimnazije u Splitu upisao je 1976. godine Medicinski fakultet u Zagrebu na kojem je diplomirao u veljači 1982. godine. Nakon obavljenog liječničkog staža radi u primarnoj zdravstvenoj zaštiti na području Splita, Omiša i Trogira. Specijalizaciju iz infektologije započeo je 1986. godine i položio specijalistički ispit 1991. godine. Od tada radi kao specijalist infektolog na Odsjeku dječje infektologije Odjela za zarazne bolesti KB Split i sudjeluje u radu sa studentima Medicinskog fakulteta kroz održavanje vježbi i seminara iz područja infektologije. Poslijediplomski studij iz Kliničke pedijatrije upisuje 1992. U veljači 1998. magistrirao je s temom «Epidemiološke osobine trudnica s pozitivnim nalazom markera HBV infekcije u Splitskoj regiji». 1999. izabran je u suradničko zvanje naslovnog asistenta na Katedri za zarazne, kožne i spolne bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Objavio je 18 radova u indeksiranim i 17 radova u neindeksiranim časopisima, te sudjelovao u pisanju poglavlja i prevođenju stručnih knjiga iz područja infekcijskih bolesti.