

Povezanost koncentracije faktora rasta trombocita-AA u serumu i oštećenja jetre kod infekcije virusom hepatitisa C

Parać, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:997431>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Petra Parać

Povezanost koncentracije faktora rasta trombocita-AA u
serumu i oštećenja jetre kod infekcije virusom hepatitisa C

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti “dr. Fran Mihaljević”, pod vodstvom doc. dr. sc. Snježane Židovec Lepej. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Veliko hvala želim uputiti mentorici, doc. dr. sc. Snježani Židovec Lepej na iskustvu, vodstvu, pristupačnosti i razumjevanju pri izradi i pisanju ovog rada.

Željela bih zahvaliti i dr. sc. Lani Gorenec na pomoći tijekom izrade ovog rada te svim ostalim djelatnicima u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti “dr. Fran Mihaljević” na susretljivosti i ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem i prijateljima na dugogodišnjem prijateljstvu i potpori.

Najveće hvala obitelji na velikoj podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

POVEZANOST KONCENTRACIJE FAKTORA RASTA TROMBOCITA-AA U SERUMU I OŠTEĆENJA JETRE KOD INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA C

Petra Parać

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus hepatitisa C (HCV) je RNA-virus iz porodice *Flaviviridae* i jedan je od vodećih uzroka pobola i smrti u svijetu. Kronična infekcija virusom HCV povezana je s nastankom fibroze jetre, ciroze te hepatocelularnog karcinoma. Faktori rasta trombocita (PDGF) reguliraju proliferaciju, migraciju, preživljavanje, kemotaksiju stanica i angiogenezu. Homodimer faktora rasta PDGF-AA važan je regulator uloge fibroblasta u zacjeljivanju rana. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti koncentraciju faktora rasta PDGF-AA u serumu osoba zaraženih virusom HCV i zdravih kontrola te usporediti koncentraciju ovog faktora rasta u osoba s različitim stupnjevima tvrdoće jetre (LMS) i fibroze. Analizirana je povezanost između koncentracije faktora rasta PDGF-AA i stupnja fibroze, koncentracije jetrenih enzima, lipida i proteina u serumu te kinetike virusne replikacije. Za kvantifikaciju faktora rasta PDGF-AA korišten je enzimski imunotest, a za kvantifikaciju RNA virusa HCV korištena je kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu. Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajnu razliku u koncentraciji faktora rasta PDGF-AA u zdravih osoba i osoba s infekcijom virusom HCV te značajnu korelaciju između koncentracije faktora rasta PDGF-AA i triglicerida, albumina te kolesterola LDL. Dokazana je pozitivna korelacija između LMS i vrijednosti enzima jetre AST, ALT, GGT i bilirubina, a negativna korelacija između LMS i koncentracije kolesterola, albumina i kolesterola LDL. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na moguću važnost faktora rasta PDGF-AA u patogenezi kroničnog hepatitisa C.

(52 stranice, 12 slika, 9 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: kronični hepatitis C, fibroza, viremija, patogeneza

Voditelj: Dr. sc. Snježana Židovec Lepej, doc.

Ocjenjivači: dr. sc. Snježana Židovec Lepej, doc.; dr. sc. Silvija Černi, doc.; dr. sc. Domagoj Đikić, izv. prof.

Zamjena: dr. sc. Petar Kružić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 01.03.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

CORRELATION BETWEEN PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR-AA CONCENTRATION IN SERUM AND LIVER DAMAGE IN HEPATITIS C VIRUS INFECTION

Petra Parać
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hepatitis C virus (HCV) is an RNA-virus belonging to *Flaviviridae* family and is one of the leading causes of death and morbidity in the world. Chronic hepatitis C infection is related to the occurrence of liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Platelet derived growth factors (PDGF) regulate cell proliferation, migration, survival, chemotaxis and angiogenesis. Homodimer PDGF-AA is an important regulator of fibroblasts during wound healing. The aim of this study was to determine concentrations of PDGF-AA in serum of patients with HCV infection and healthy controls and to compare concentrations of PDGF-AA with the difference in levels of liver stiffness (LMS) and fibrosis. Connection between PDGF-AA concentration and fibrosis stage, concentration of liver enzymes, lipids and proteins in the serum as well as viral replication kinetics has been analyzed. Enzyme immunoassay was used for the quantification of PDGF-AA while quantitative real time polymerase chain reaction was used to quantify HCV RNA. The results of this research showed a statistically significant difference in the concentration of PDGF-AA in healthy people and people infected with HCV and significant correlation between the concentration of PDGF-AA and triglycerides, albumins and LDLs. Positive correlation was found between LMS and serum levels of AST, ALT, GGT and bilirubin and negative correlation was found between LMS and serum levels of cholesterol, albumin and LDL. The results of this research show a possible part PDGF-AA might play in the pathogenesis of chronic hepatitis C.

(52 pages, 12 figures, 9 tables, 89 references, original in: croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: chronic hepatitis C, fibrosis, viremia, pathogenesis

Supervisor: Dr. Snježana Židovec Lepej, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Snježana Židovec Lepej, Asst. Prof.; Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.;
Dr. Domagoj Đikić, Prof.

Replacement: Dr. Petar Kružić, Prof.

Thesis accepted: 01.03.2018.

KRATICE

ALT - alanin aminotransferaza
AST - aspartat aminotransferaza
CD – diferencijacijski biljezi
CLDN1 – kladin 1
ECM – ekstracelularni matriks
EGF – epidermalni faktor rasta
ELISA – enzimski imunotest na čvrstoj fazi
FGF – faktor rasta fibroblasta
GGT - gamaglutamil transferaza
HBEGF – faktor rasta koji veže fibrin
HCV – virus hepatitisa C
HDL – lipoprotein velike gustoće
HLA – ljudski leukocitni antigen
HSC – zvjezdolike stanice jetre
IGF-I – faktor rasta nalik inzulinu
IFN - interferon
IL – interleukin
IQR – interkvartalni raspon
IRES - regija internog vезnog mjesta ribosoma
JAK – Janus kinaze
KGF – faktor rasta keratinocita
LD – lipidne kapljice
LDL – lipoprotein male gustoće
LMS – tvrdoća jetre
MAPK – mitogen aktivirane proteinske kinaze
MCP – monocitni kemotaktični protein
MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti
MMP – matriks metaloproteinaze
NGF – faktor rasta neurona
NS – nestrukturirani protein
NK – prirodno ubilačke stanice
OCLN – okcludin
PAMP – molekularni motivi asocirani s patogenima
PDGF – faktor rasta trombocita
PDGFR – receptor faktora rasta trombocita
PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza
PKC – protein kinaza C
PLCγ – fosfolipaza Cγ
RNA – ribonukleinska kiselina
ROS – reaktivne kisikove vrste
SR-BI – čistački receptor B razreda tip 1
STAT – prijenosnici signala i aktivatori transkripcije
TGF – transformirajući faktor rasta
TLR – receptori nalik Tollu
UTR – netranslatirajuća regija
VEGF – faktor rasta vaskularnog endotela
WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Virus hepatitisa C	1
1.1.1	Struktura i genom virusa HCV	2
1.1.2	Replikacijski ciklus virusa HCV	6
1.1.3	Epidemiologija infekcije virusom HCV i distribucija genotipova	8
1.1.4	Imunosni sustav i patogeneza virusa HCV	9
1.1.4.1	Akutna faza infekcije	11
1.1.4.2	Kronična faza infekcije	12
1.2	Faktori rasta	14
1.2.1	Faktori rasta trombocita	15
1.2.1.1	PDGF-A	18
1.2.1.2	PDGF-B	19
1.2.1.3	PDGF-C	20
1.2.1.4	PDGF-D	20
1.2.1.5	PDGFR- α i - β	21
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
3	MATERIJALI I METODE	26
3.1	Materijali	26
3.1.1	Biološki uzorci	26
3.1.2	Komplet reagensa	27
3.1.3	Uređaji i dodatni materijali	27
3.2	Metode	29
3.2.1	Kvantifikacija RNA virusa HCV	29
3.2.2	Određivanje koncentracije faktora rasta PDGF-AA	30
3.2.3	Statistička obrada podataka	32
4	REZULTATI	33
4.1	Kvantifikacija RNA virusa HCV	33
4.2	Koncentracija faktora rasta PDGF-AA	33
4.3	Statistička analiza	34
4.3.1	Analiza koncentracije faktora rasta PDGF-AA	34
4.3.2	Analiza koncentracije faktora rasta PDGF-AA i stupnja fibroze	35
4.3.3	Analiza korelacija faktora rasta PDGF-AA, viroloških i kliničkih parametara	37
5	RASPRAVA	39
6	ZAKLJUČAK	44
7	LITERATURA	45
8	ŽIVOTOPIS	52

1 UVOD

1.1 Virus hepatitisa C

Virus hepatitisa C (HCV, engl. *Hepatitis C virus*) pripada porodici *Flaviviridae*, rod *Hepacivirus* (International Committee for Taxonomy of Viruses). Otkriven je 1989.g. istraživanjem prethodno nepoznatog uzročnika bolesti jetre (tzv. non-A non-B hepatitisa) u osoba koje su primile transfuziju krvi (Choo i sur. 1989).

Virus HCV se prenosi putem krvi tj. transfuzijom, neadekvatno dezinficiranim instrumentima koji se koriste pri operacijama, tetoviranju te umetanju piercinga, transplantacijom krvotvornih stanica ili organa, dok je u razvijenim zemljama najčešći prijenos kontaminiranim injekcijama tijekom intravenskog korištenja droge (Pawlotsky 2004).

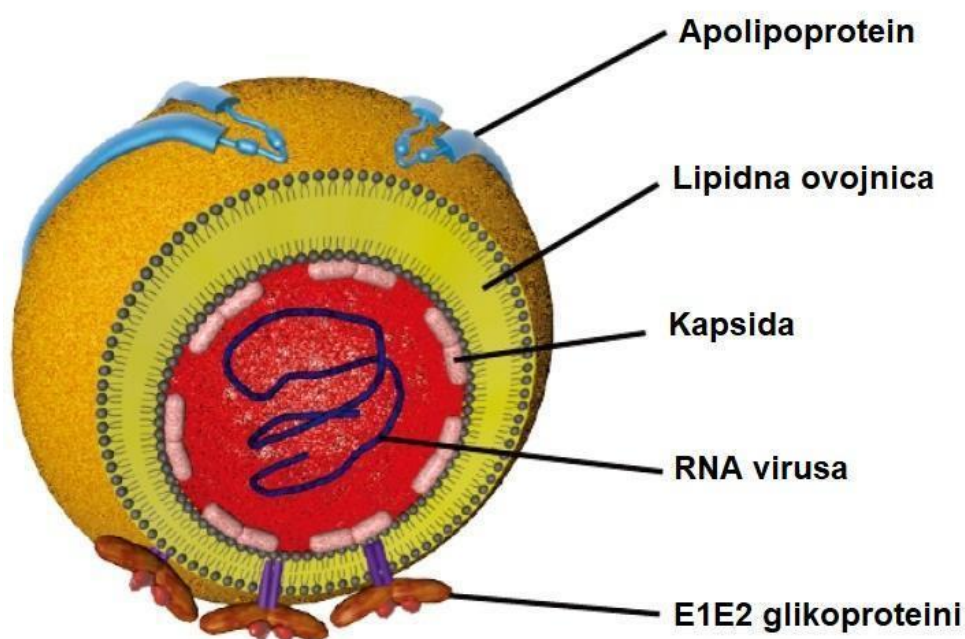
Virus HCV uzrokuje akutni i kronični hepatitis C. Tijekom akutne faze infekcije, efektorski mehanizmi urođene i specifične imunosti (posebice citotoksični CD8⁺ T-limfociti) eliminiraju virus u 20-50% zaraženih osoba, dok se 50-80% osoba uspostavi kronična infekcija. Najvažniji prediktor ishoda akutne infekcije virusom HCV je polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) promotorske regije gena za interleukin-28B (IL-28) tj. rs12979860 pri čemu oko 80% C homozigota uspije eliminirati virus (Thomas i sur. 2013). Obzirom na to da se tijekom akutne infekcije kliničkim simptomima bolesti javljaju u samo 20-30 % zaraženih osoba te je bolest uglavnom asimptomatska, infekcija virusom HCV u ovoj fazi infekcije najčešće ostaje neprepoznata (Nouroz i sur. 2015). Kronični hepatitis u 10-20 % bolesnika uzrokuje cirozu jetre koja se postepeno razvija tijekom 10 do 20 godina od infekcije. U 1-4% osoba s kroničnim hepatitisom C i cirozom dolazi do pojave hepatocelularnog karcinoma (Pawlotsky 2004).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organization*), u svijetu je oko 170 milijuna ljudi zaraženo hepatitisom C dok ukupno 71 milijun ljudi ima kronični oblik ove bolesti. Iako su se od otkrića virusa do danas razvili brojni dijagnostički serološki testovi detekcije protutijela na hepatitis C (anti-HCV) i antigena virusa HCV kao i molekularni testovi za kvantifikaciju RNA virusa HCV, procjenjuje se da je kronični hepatitis C dijagnosticiran u samo 20% bolesnika. Obzirom na važnost kroničnog virusnog hepatitisa, WHO je 2016.g. donijela strategiju za globalnu eliminaciju virusnih hepatitisa u svijetu do 2030.g. koja se temelji na pojačanim naporima u razvoju cjepiva,

mjerama prevencije, povećanom opsegu testiranja na infekciju virusima hepatitisa, te antivirusnom liječenju (Svjetska zdravstvena organizacija, Global hepatitis report 2017).

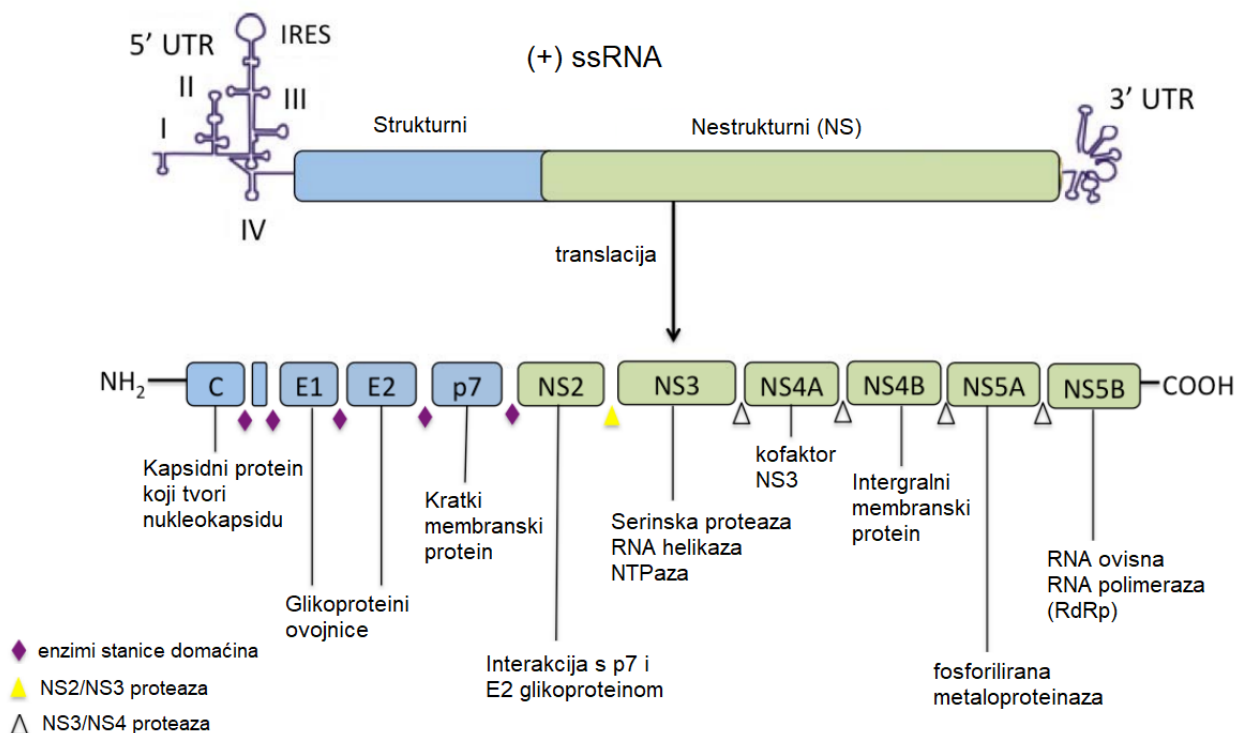
1.1.1 Struktura i genom virusa HCV

Virusna čestica HCV sastoji se od virusnog genoma koji je obavljen nukleokapsidom i lipidnom ovojnica s usidrenim heterodimerima glikoproteina E1 i E2 (Slika 1). Filtracijom *in vivo* dokazano je da je veličina čestice 50 do 80 nm (Gastaminza i sur. 2010).



Slika 1. Struktura virusa HCV s vezanim apolipoproteinima (Preuzeto od Feneant i sur. 2014)

Genom virusa HCV sastoji se od jednolančane pozitivne RNA (ssRNA, engl. *single-stranded RNA*) veličine 9.6 kb s 5' i 3' netranslatirajućim regijama (UTR, engl. *untranslated region*). Genom virusa HCV kodira sintezu ne-strukturnih i strukturnih virusnih proteina (Slika 2), a tijekom translacije nastaje poliprotein kojeg enzimi stanice domaćina i virusni enzimi cijepaju na 10 manjih funkcionalnih proteina. Strukturni proteini virusa HCV su: nukleokapsidni protein (C, engl. *core protein*), glikoproteini ovojnice (E1 i E2) te protein p7. Ne-strukturni proteini virusa HCV (NS, engl. *non structural proteins*) su: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B (Bertenschlager i sur. 2011).



Slika 2. Genom virusa hepatitisa C i proteini (preuzeto od: Baharuddin i sur. 2013)

Regija 5' UTR sastoji se od 340 nukleotida. Podjeljena je u 4 domene (I - IV). Domena I je mjesto vezanja miRNA-122, mikro-RNA specifične za hepatocite koja služi u reguliranju lipidnog metabolizma, cirkadijskog ritma i homeostaze željeza. Pretpostavka je da vezanjem na 5' kraj utječe na translaciju virusnih proteina (Luna i sur. 2015). Domene II, III i IV obuhvaćaju regiju internog veznog mjesta ribosoma (IRES, engl. *Internal ribosome entry site*). Zbog nedostataka 5' kape, translacija u virusa hepatitisa C započinje tako da se ribosomska podjedinica 40S preko P-proteina veže za domenu III na kojoj se nalazi mjesto početka translacije (Adams i sur. 2017).

Regija 3' UTR je sastavljena od 220 nukleotida i podijeljena je u 3 regije: varijabilnu regiju od 40 nukleotida, poli (U/UC) lanaca i 3'X regiju od 98 nukleotida. Regija 3' UTR bitna je za učinkovitost translacije i RNA-replikacije (Bai i sur. 2013, Firebe 2002).

Nukleokapsidni protein veličine je 21 kDa i sastoji se od dvije domene: hidrofilne D1 na N' kraju i hidrofobne D2 na C' kraju te dijela od ~14 aminokiselina koji služe kao signalna sekvenca za E1. Domena D1 bitna je za vezanje RNA te za sastavljanje komponenata u nukleokapsidu, dok je domena D2 bitna za stabilnost proteina te služi u povezivanju s membranama lipidnih kapljica (LD, engl. *lipid droplets*) i endoplazmatskog retikuluma (Gawlik i Gallay 2014). Osim formiranja kapside, proteini imaju ulogu i u moduliranju

transkripcije, inhibicije i stimulacije apoptoze, induciranju produkcije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*) te supresije imunskog odgovora domaćina. Kod transgeničnih miševa potiču nastanak steatoze, a kao posljedicu i kasniji nastanak hepatocelularnog karcinoma (Suzuki i sur. 2015). Uz to, potencijalni su medijatori u nastanku fibroze jer povećavaju gensku ekspresiju ciklooksigenaze-2 (COX-2) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u stanicama hepatocita (Nunez i sur. 2004).

Glikoproteini E1 i E2 pripadaju membranskim proteinima tipa 1 i nalaze se u ovojnici virusa. Sadrže transmembransku hidrofobnu domenu te dugačku N' domenu na koju se N' glikozilacijom u endoplazmatskom retikulumu vežu glikani. E1 sadrži 6 mjesta vezanja, dok ih E2 ima 11 (de Beeck i sur. 2004). Zbog svoje koncentracije i količine, glikani mogu ometati pristup epitopima na virusnoj čestici, a time i imunski odgovor organizma (Helle i sur. 2010). Zajedno tvore heterodimere koji su u unutarstaničnoj formi povezani nekovalentnim vezama, dok su na virusnoj čestici povezani kovalentnim disulfnim mostovima (Vieyres i sur. 2010). Imaju ključnu ulogu u prepoznavanju stanice preko membranskih receptora poput CD81, ulasku virusa i sastavljanju novih virusnih čestica (Steinmann i sur. 2013).

Protein p7 pripada skupini viroporina jer djeluje kao ionski kanal. Građen je od dvije transmembranske domene s krajevima koji su orijentirani prema lumenu endoplazmatskog retikuluma. Sastoji se od 63 amino kiseline te uzrokuje povećanje pH (smanjenje kiselosti) čime stvara povoljan okoliš za virusne čestice koje sazrijevaju i nisu otporne na niski pH (Wozniak i sur. 2010; Atoom i sur. 2014).

NS2 je nestrukturani protein veličine 217 amino kiselina. Sadrži dvije transmembranske domene i C' kraj u citoplazmi na koji se spaja N' kraj NS3 i tvori NS2-3 cisteinsku proteazu. Enzim cijepa poliprotein između podjedinica NS2 i NS3. Ima ulogu u moduliranju procesa u stanici povezanih uz sastavljanje novih virusnih čestica, kao poveznica između strukturnih elemenata i virusne RNA te stvara kompleks s p7 i E2 pri čemu stupaju u kontakt s lipidnim kapljicama (Popescu i sur. 2011). Primjećeno je da je sposobnost cijepanja pojačana dodatkom cinka što dovodi do zaključka da bi NS2-3 mogla biti metaloproteinaza (Lorenz 2010).

NS3 protein veličine je 631 amino kiselinu. Ima dvojaku funkciju. Trećina N' kraja tvori proteazu, a ostatak RNA-helikazu i NTPazu. Povezanost tih domena utječe na povećanu specifičnost funkcije svakog enzima. Proteaza NS3 pripada serinskim proteazama i za djelovanje je bitno vezanje cinkovog iona i kofaktora NS4A. Ona cijepa poliprotein na četiri mjesta nizvodno od NS3. Uz to, djeluje kao antagonist urođenog imunskog sustava blokiranjem aktivacije ekspresije IFN- β vezujući se na substrate MAVS (engl. *mitochondrial antiviral signaling protein*) i TRIF (engl. *toll/interleukin-1 receptor resistance domain-containing*

adaptor-inducing IFN protein) (McGivern i sur. 2015). NS3 helikaza pripada skupini SF2 (engl. *superfamily*) te ima ulogu u sintezi RNA i sastavljanju viriona (Raney i sur. 2010).

NS4A protein sastoji se od 54 aminokiseline a najvažniju ulogu ima u modulaciji proteazne aktivnosti NS3 te zajedno s njom RNA-helikaznu aktivnost i u fosforilaciji NS5A (Raney i sur. 2010). Nalazi se na membrani endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija (Dabral i sur. 2014).

NS4B je protein veličine 261 amino kiseline. Sastoji se od dva amfipatska heliksa sa citoplazmatske strane endoplazmatskog retikuluma, neophodna za replikaciju genoma, te četiri transmembranske domene. Ima ulogu u stvaranju “membranske mreže” (engl. *membranous web*), nakupine membranskih vezikula nastalih iz endoplazmatskog retikuluma koje služe kao mjesta replikacije genoma virusa HCV (Choi i sur. 2013).

NS5A je fosforilirana cink ovisna metaloproteinaza koja se sastoji od tri domene. Ima ulogu u replikaciji RNA, povezivanju s lipidnim kapljicama (preko domene I) te, djelovanjem na signalne puteve, modificira okoliš stanice kako bi odgovarao virusu (Tellinghuisen i sur. 2008).

NS5B je protein veličine 591 amino kiselina. Ima ulogu kao RNA-ovisna RNA-polimeraza tako da, koristeći lanac RNA kao kalup, sintetizira komplementarnu RNA. Uz to, uzajamno djeluje s različitim faktorima stanice, primjerice translacijskim faktorima, metaboličkim enzimima ili se direktno veže za neke stanične proteine poput pRb te tako potiče onkogenost virusa. Zbog svoje uloge u replikaciji virusa, koristi se kao ciljna struktura za djelovanje antivirusnih lijekova poput sofosbuvira (Marascio i sur. 2014).

Genom virusa HCV izrazito je varijabilnog sastava nukleotida te aminokiselina zbog nepreciznosti biološkog učinka polimeraze NS5B (Twes i sur. 2010). Zahvaljujući napretku u tehnologiji sekvenciranja, virus HCV se na temelju genomskih razlika izolata svrstava u različite genotipovi i podtipove. Prema organizaciji ICTV (engl. *International Committee for Taxonomy of Viruses*) trenutno postoji 7 genotipa i 86 podgenotipa virusa HCV. Razlika između genotipova je u najmanje 15% nukleotidnih sekvenci, dok je razlika između podtipova manja od 13% (Smith i sur. 2014).

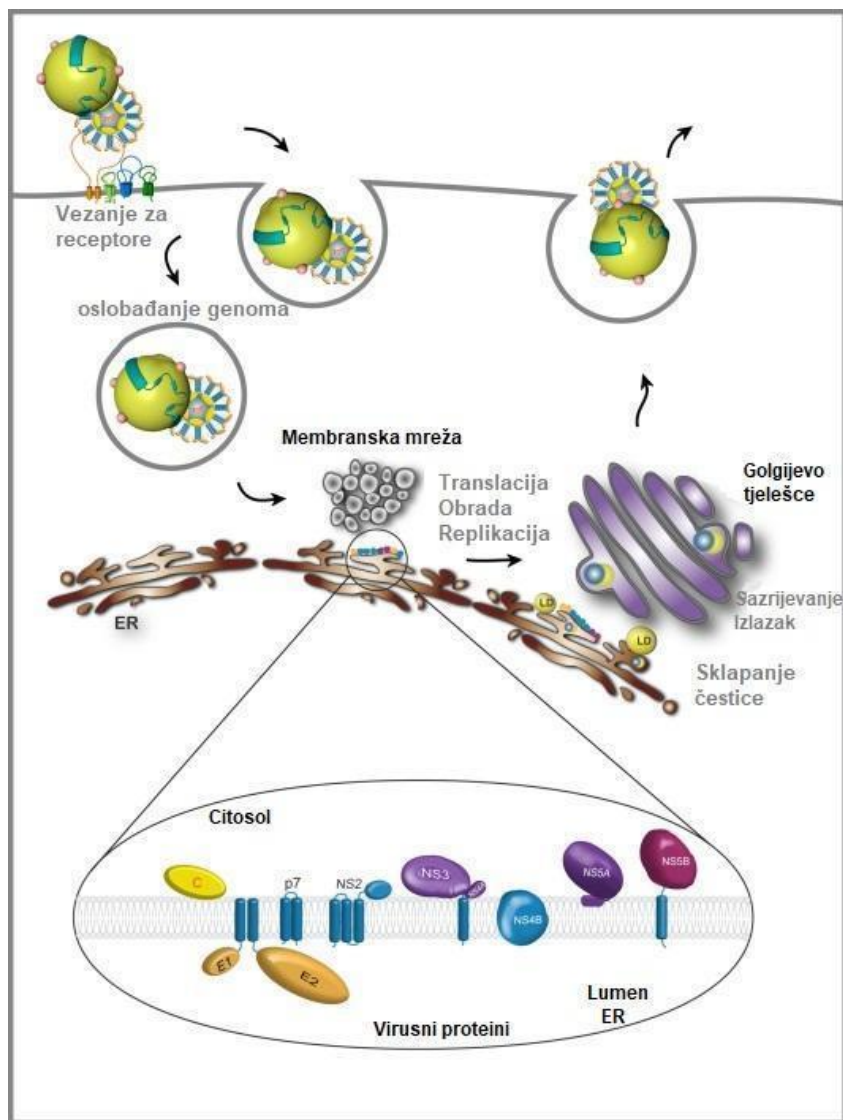
1.1.2 Replikacijski ciklus virusa HCV

Nakon zaraze, virus HCV se u krvi veže s lipoproteinima seruma (Slika 1) - ApoA1, ApoB48, ApoB100, ApoC1 i ApoE. Vezanje utječe na gustoću čestica koja je niska i varira od manje od 1.06 do 1.25 g/ml. Infektivnost čestice povezana je s gustoćom te one čestice s manjom gustoćom pokazuju veću infektivnost (Gawlik i Gallay 2014). Vezanje za lipoproteine pomaže u vezanju za ciljanu stanicu, ali i u obrani od neutralizacijskih protutijela pokrivajući površinske antigene (Lindenbach i Rice 2013).

Replikacijski ciklus započinje prepoznavanjem specifičnih receptora na ciljanim stanicama pri čemu glikoproteini virusa pokazuju specifični tropizam za površinske molekule na hepatocitima. Četiri su ključna receptora za ulazak virusa u stanicu: SR-BI (engl. *Scavenger Receptor class B type 1*), tetraspanin CD81 te proteini čvrstih veza CLDN1 (engl. *claudin-1*) i OCLN (engl. *occludin*). Ovi receptori također sudjeluju u prijenosu virusa HCV iz zaražene na susjedne stanice (engl. *cell to cell transfer*) iako je uloga molekule CD81 u ovom procesu za sada nedostavno istražena. Prvi receptor na koji se veže virus HCV je SR-BI koji vezanjem na E1/E2 dimere uzrokuje konformacijske promjene koje omogućuju povezivanje E2 s idućim receptorom, CD81, u procesu ulaska virusa. Uz to SR-BI ključan je receptor za kolesterol HDL (engl. *High density lipoprotein*) i pomaže u vezanju za virus HCV preko lipidnih komponenata na virusnoj čestici. Receptor CD81 nalazi se na bazolateralnim membranama hepatocita i na sinusoidalnim endotelnim stanicama te distribucija ovog receptora ograničava tropizam virusa HCV. Genotip virusa utječe na afinitet vezanja za CD81. Uloga CLDN1 i OCLN manje je poznata. Pretpostavlja se da CLDN1 stvara komplekse s molekulom CD81 te pojačava vezanje glikoproteina za receptor, ali još nije razjašnjeno veže li se i za virus HCV. Otkrivene su dodatne molekule značajne za vezanje virusa HCV za stanicu uključujući EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*), Ephrin receptor A2 i receptor kolesterola sličnog Neimmann-Pick C1 (NPC1L1) (Fénéant i sur 2014). Virus HCV vezan za CD81/CLDN1 ulazi u stanicu endocitozom posredovanom klatrinom te dolazi do fuzije s Rab5 pozitivnim endosomima (Farquahar i sur. 2012). Unutar endosoma, pod utjecajem niskog pH, dolazi do fuzije i otpuštanja virusne RNA u citosol prilikom čega dolazi do translacije virusnih proteina.

Nakon translacije na endoplazmatskom retikulumu, dobiveni poliprotein enzimatski se obrađuje. Signalne peptidaze stanice cijepaju poliprotein između prekursora nuklekapside i E1. Dodatnom obradom prekursora signalnom peptid peptidazom nastaje kapsidni proteini, E1, E2 te p7 (Gawlik i Gallay 2014). NS2/3 i NS3/4 cijepaju ostatak poliproteina. Dobiveni kapsidni proteini tvore homodimere i spremaju se u citosolne LD za što su potrebne MAPK citosolne

fosfolipaze A2, PLA2G4A i diacilglicerol acetiltransferaza 1 (DGAT1). E1 i E2 sintetiziraju se u nekovalentno vezane heterodimere. NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B tvori kompleks na membrani ER koji provodi replikaciju RNA (Lindenbach i Rice 2014). (Slika 3)



Slika 3. Replikacija virusa HCV (Preuzeto od: Tews i sur. 2010)

Prisutnost poliproteina uzrokuje promjene u membrani endoplazmatskog retikuluma, a NS4B dovodi do stvaranja specifične strukture zvane membranske mreže. Membranska mreža nalazi se uz endoplazmatski retikulum i sastoji se od nakupljenih vezikula s jednostrukom i dvostrukom membranom multivezikularnih tijela i lipidnih kapljica te ima ulogu u replikaciji, sklapanju čestica i štiti replikacijski ciklus od imunskog odgovora domaćina (Egger i sur. 2002, Neufeldt i sur. 2016).

Proces sastavljanja virusnih čestica započinje interakcijom nukleokapsidnih proteina i NS5A, dok NS2 i p7 sudjeluju u samoj organizaciji kompleksa za sastavljanje. Kapsidni proteini spremljeni u LD dovode se do novonastalih čestica međudjelovanjem p7, NS2 i NS3/4A i formiraju nukleokapsidu. Nastale virusne čestice zatim prolaze kroz sekretorni put pri čemu se dodatno modificiraju. Prolazak kroz Golgijevo tjelešće dovodi do modifikacije glikoproteini E1 i E2 glikozilacijom te stvaranjem stabilnih disulfidnih mostova. Također dolazi do povezivanja s apolipoproteinima i lipidima stanice čime se utječe na smanjenje gustoće čestica. Hipoteza da izlazak virusne čestice iz stanice ovisi o kolesterolu VLDL (engl. *very low density lipoprotein*) sekretornom putu i njemu esencijalnom apoB nije potvrđena. Upotrebom posebnih inhibitora za mikrosomalne trigliceridne transfer proteine (MTP) pokazalo se da se za otpuštanje bitan apoE protein te da su u sam proces sastavljanja uključene LD koje ga sadrže. Iako su provedena mnoga istraživanja i definirani mnogi dijelovi replikacijskog procesa, postoje još mnoge nepoznanice, posebice one vezane uz sekretorni put te utjecaj virusa HCV na lipidni metabolizam stanice (Lindenbach i Rice 2013).

1.1.3 Epidemiologija infekcije virusom HCV i distribucija genotipova

Petruzziello i sur. su 2016.g. objavili rezultate opsežne analize znanstvenih radova objavljenih između 2000. i 2015.g. provedenim u 138 zemalja koje obuhvaćaju 90% globalne populacije u svrhu određivanja rasprostranjenosti genotipova virusa HCV te postotka viremičnih osoba i prevalencije zaraze.

Procijenili su da je prevalencija protutijela na virus HCV u svijetu 2.5%. Najveći broj zaraženih osoba živi u Aziji i to njih 111,6 milijuna što čini 2.8% ukupnog stanovništva kontinenta. Veću prevalenciju ima jedino Afrika s 2.9% (26.9 milijuna zaraženih), dok je najmanja u Americi s 1.3% (12.4 milijuna zaraženih). Usporedivši regije, najveću prevalenciju imaju središnja sub-Saharska Afrika (6%), Središnja Azija (5.8%) te Istočna Europa (3.1%), dok najnižu prevalenciju imaju Zapadna Europa (0.9%), južna sub-Saharska Afrika (0.9%), pacifični dio Azije (područje visokog prihoda) (1.1%) i Sjeverna Amerika (područje visokog prihoda) (1.2%) (Petruzziello i sur. 2016).

Stopa viremije virusa HCV u svijetu je 67% (118,9 milijuna ljudi). Najveća stopa viremije je u Australiji i Jugoistočnoj Aziji i iznosi 74.8%, dok je najmanja stopa u Aziji i iznosi 64.4%. Gledajući regije, stopa viremije najviša je u tropskoj Južnoj Americi (80.2%), Zapadnoj sub-Saharskoj Africi (79.6%), jugu Južne Amerike (79.5%), dok je najniža stopa

viremije u Istočnoj Aziji (63.6%), Jugoistočnoj Aziji (60.5%) te Središnjoj Aziji (48.7%) (Petruzziello i sur. 2016).

Ukupno 49.1% infekcija virusom HCV u svijetu (ne uključujući Oceaniju) uzrokovano je genotipom 1. Genotip 2 uzrokovao je 11%, genotip 3 17.9%, a genotip 4 16.8% zaraza, genotip 5 2%, dok je genotip 6 uzrokovao samo 1.4% zaraza. Ostatak zaraza, njih 1.8%, uzrokovane su miješanim genotipovima. Zbog svoje se raširenosti, genotip 1a, 1b, 2a i 3a još nazivaju i “epidemijski subtipovi”. Zanimljivo je primijetiti da, iako je genotip 1 najčešći uzročnik infekcije u svijetu, u Africi te Sjevernoj Africi/Bliskom istoku veći je postotak infekcija uzrokovan genotipom 4 (28.1% i 65.3%) (Petruzziello i sur. 2016).

Ukupna prevalencija protutijela na virus HCV u Europi je 1.8% u odnosu na svijet te zahvaća 13.4 milijuna ljudi s najvećim postotkom u Istočnoj Europi (3.1%), Središnjoj Europi (1.3%) te Zapadnoj Europi (0.9%). Stopa viremije je najveća u Središnjoj Europi (76.6%), zatim u Zapadnoj Europi (71.0%) te u Istočnoj Europi (69.6%). Predominantan genotip u Europi je genotip 1 sa stopom od 64.4%. Genotip 5 prisutan je svega 0.2% u Zapadnoj Europi, dok je genotip 6 prisutan samo u Zapadnoj i Središnjoj Europi s 0.1%. U Hrvatskoj je, uz genotip 1, najviše zastupljen genotip 3 s 35.6% (Petruzziello i sur. 2016). Prema podacima od Maaroufi i sur. (2017), u Hrvatskoj je prevalencija 0.9%, a za 2015. g. stopa viremije je bila 0.6% (20 500 - 34 200 osoba).

Ako se usporede podaci dobiveni od Petruzziello i sur. (2016) s analizom Mohd i sur. (2013) za period od 1990. do 2005. g., primjećeno je da je prevalencija protutijela virusa HCV u padu s 2.8% na 2.5% odnosno ukupni broj oboljelih s 185 milijuna na 177.5 milijuna ljudi. Maaroufi i sur. (2017) su pokazali kako je u Hrvatskoj od 1993. g. dijagnosticirano 300 osoba godišnje. Taj broj se smanjio na 200 nakon 2010. g. te na 150 novodijagnosticiranih osoba u 2015. g. (Maaroufi i sur. 2017).

1.1.4 Imunosni sustav i patogeneza virusa HCV

Imunosni sustav zaslužan je za obranu od stranih patogena. Razlikujemo dva oblika imunosne obrane organizma: nespecifičnu (urođenu) i specifičnu (stečenu) imunost. Nespecifična imunost postoji i prije doticaja sa stranim antigenom i sastoji se od niza mehanizama od kojih prvu fazu obrane čine anatomske zaprjeke poput kože i sluznica. Patogeni se zatim susreću s fiziološkim zaprjekama u obliku drugačije temperature, sadržaja kisika i pH u pojedinim organima i tkivima, te sa solubilnim čimbenicima poput defensina, lizozima, interferona (IFN) i sustava komplementa koji imaju direktni i/ili indirektni antivirusni

učinak. Stanične komponente imunskog sustava značajne za urođenu imunost su makrofagi, neutrofili i NK-stanice (engl. *natural killer cells*) koji sudjeluju u upalnim reakcijama tijekom invazije patogena u oštećena tkiva (Murphy i sur. 2012). Preduvjet aktivacije opisanih mehanizama urođenog imunskog sustava je prepoznavanje molekularnih uzoraka karakterističnih za patogene tj. PAMP (PAMP, engl. *pathogen-associated molecular patterns*) putem receptora koji prepoznaju specifične strukture (PRR, engl. *pattern recognition receptors*). Receptori nalik tollu (TLR, engl. *toll-like receptors*) najbolje su proučena porodica PRR koja se sastoji od 10 receptora (TLR1 - TLR10). TLR su različito eksprimirani na stanicama jetre: TLR1- TLR10 na hepatocitima, TLR1-TLR4 i TLR9 na Kupferovim stanicama i TLR1, TLR2, TLR4 i TLR9 na zvjezdastim stanicama jetre (HSC, engl. *hepatic stellate cells*). Vezanje liganda potiče signalnu kaskadu koja dovodi do poticanja pro-upalnih citokina, kemokina i interferona (Howell i sur. 2013).

Specifična imunost posredovana je humoralnim (protutijela) i staničnim (limfociti) efektorskim mehanizmima. Aktivacija specifične imunost rezultat je prepoznavanje antigenskih determinanti prezentiranih u sklopu molekula MHC (engl. *major histocompatibility complex*) klase I i II na antigen-prezentirajućim stanicama putem receptora TCR (engl. *T-cell receptors*). Molekule MHC klase I prezentiraju antigene sintetizirane u citosolu citotoksičnim CD8⁺ T-limfocitima (T_C), dok molekule MHC klase II prezentiraju peptide iz unutarstaničnih vezikula pomoćničkim CD4⁺ T-limfocitima (T_H). Vezanjem dolazi do stimulacije T-limfocita koji mogu direktno djelovati na stanicu (primjerice otpuštanjem granzima za apoptozu stanice) ili otpustiti medijatore poput citokina koji regrutiraju druge efektorske stanice. U imunoreakciji na patogene, značajnu ulogu imaju pojedine efektorske subpopulacije CD4⁺ T-limfocita koje iskazuju različite obrasce citokinske sinteze poput T_H1, T_H2, T_H17, T_H9, T_H22, T-reg i folikularnih T_H stanica. Limfociti T_H1 izlučuju IFN- γ , IL-2 i TNF- β te potiču staničnu imunost. T_H2 limfociti djeluju na humoralnu imunost otpuštajući IL-4, IL-5 i IL-10. T_H17 sudjeluju u poticanju upale (Murphy i sur. 2012). U jetri se mogu naći i $\gamma\delta$ T-limfociti te NKT stanice (Petrovic i sur. 2012). B-limfociti nosioci su humoralne imunost te mogu djelovati i kao antigen prezentirajuće stanice. U dodiru s antigenima, B-limfociti se aktiviraju i diferenciraju u memorijske stanice i plazma stanice. Memorijske stanice pri ponovnom susretu organizma s antigenom, potiču bržu i jaču imunsku reakciju, dok plazma stanice luče protutijela koja se vežu za različite antigene (Murphy i sur. 2012).

Interakcija navedenih medijatora, različitih receptora i njihovih signalnih puteva ima važnu ulogu u obrani od patogena te u nastanku akutne odnosno kronične infekcije.

1.1.4.1 Akutna faza infekcije

Tijekom akutne infekcije virusom HCV, 20-30% zaraženih spontano eliminira virus tijekom prvih 12 tjedana zaraze putem mehanizama specifične stanične imunosti. Akutna infekcija simptomatska je u samo oko 15% oboljelih. Tijekom perioda inkubacije koji traje 8 - 12 tjedana, dolazi do intenzivne replikacije virusa te vrlo visokog broja kopija virusne RNA u serumu (viremija) kao i postepenog porasta koncentracije aminotransferaze ALT (engl. *alanine aminotrasferase*) (Slika 4), jednog od markera bolesti jetre (Sung i sur. 2014).

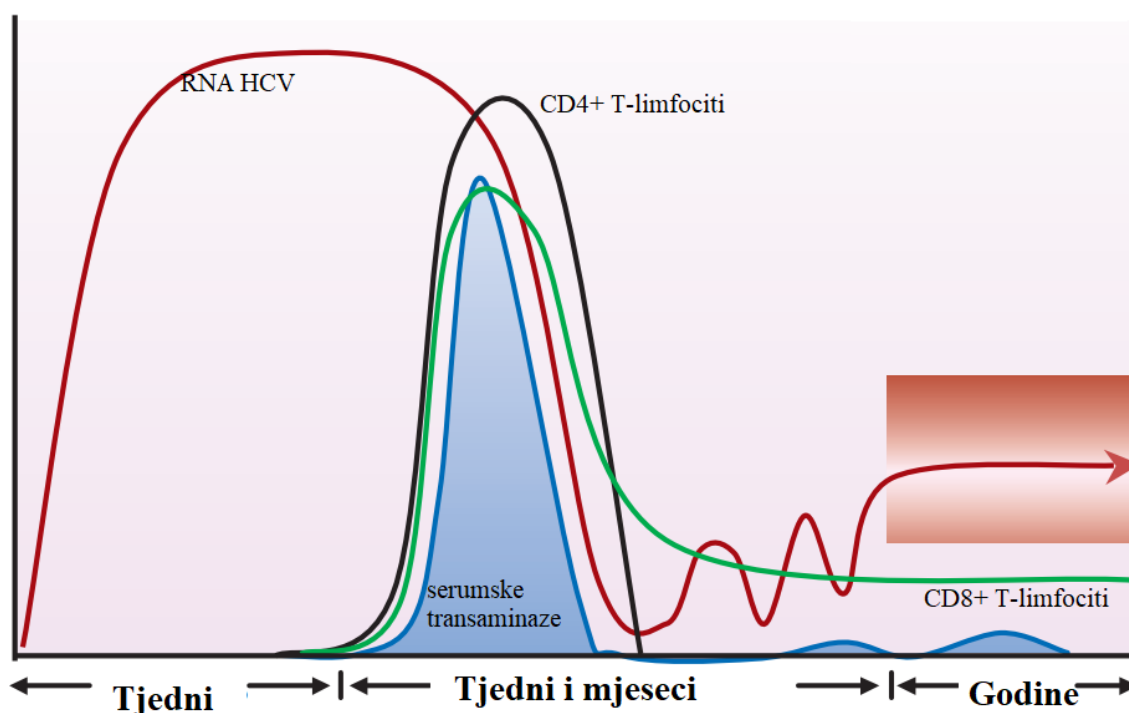
NK-stanice, koje se nalaze u većem postotku (30%) u jetri nego u krvi (5-30%), imaju važnu ulogu u eliminaciji hepatocita zaraženih virusom HCV. Pomoću receptora koje ispoljavaju, vežu se za receptore na ciljnim stanicama te luče citokine poput IFN- γ . Jedan od primjera receptora NK-stanica su receptori KIR (engl. *killer immunoglobulin-like receptors*) koji se vežu za HLA-C (engl. *human leukocyte antigen*). NK-stanice djeluju i otpuštanjem perforina te granzima kojima direktno ubijaju ciljne stanice (Ahlenstiel 2013). NK-stanice potiču ekspresiju kemokina CXCL9 i CXCL10 koji se vežu za kemokinske receptore T-limfocita i potiču ih na migraciju u jetru tijekom početne faze infekcije (Racanelli i Rehmann 2003).

T-limfociti specifični za virus HCV pojavljuju se od 8. do 12. tjedna infekcije, a tome prethodi lokalna sinteza kemokina koji su ligandi kemokinskih receptora CXCR3 i CCR5. Aktivirani T-limfociti migriraju u jetru i dolaze u konakt s antigenima prezentiranim na antigen prezentirajućim stanicama te započinju upalnu reakciju pri čemu jednu od najvažnijih uloga ima T_H1 citokin IFN- γ (Racanelli i Rehmann 2003).

U početnoj fazi imunoreakcije pojavljuju se CD8⁺ T-limfociti specifični za veći broj različitih epitopa virusa HCV što pogoduje eliminaciji virusa. Međutim, opseg repertoara TCR-a specifičnih za epitope virusa HCV smanjuje se tijekom trajanja infekcije, te virus putem mutacija stvara nove epitope te uspjeva izbjeći odgovor postojećih CD8⁺ T-limfocita i protutijela što u konačnici pogoduje razvoju kronične infekcije (Sung i sur. 2014). Također, primjećeno je da se nukleokapsidni protein virusa HCV veže za C1qR i sprječava proliferaciju T-limfocita te lučenje citokina IL-2 i IFN- γ (Racanelli i Rehmann 2003).

U osoba koje su spontano eliminirale virus, dokazana je povećanja ekspresija molekule CD127 koja je marker za memorijske prekursorske stanice. U slučaju ponovne zaraze virusom HCV, osobe s povećanom ekspresijom ove molekule pokazat će brži odgovor T-limfocita na virus (Sung i sur 2014).

Na CD8⁺ i CD4⁺ T-limfocitima osoba s infekcijom virusom HCV dokazana je povećana ekspresija receptora PD-1 (engl. *programmed cell death receptor*). Inhibitorna uloga receptora PD-1 nije dokazana u akutnoj već samo u kroničnoj fazi infekcije gdje dovodi do smanjenja učinkovite T-stanične imunosti (engl. *T-cell exhaustion*) (Petrovic i sur. 2012). Ukoliko je virusna RNA mjerljiva u serumu osoba i nakon 6 mjeseci od infekcije ili od prvog dokaza viremije, smatra se da je došlo do razvoja kronične faze infekcije tj. kroničnog hepatitisa C (Sung i sur 2014).



Slika 4. Akutna i kronična faza infekcije (preuzeto od: Bowen i sur. 2005)

1.1.4.2 Kronična faza infekcije

Kronična infekcija virusom HCV dovodi do progresivne bolesti jetre i promjena u staničnom imunosnom odgovoru zaražene osobe (Fahey i sur. 2014).

Aktivnost NK-stanica u kroničnoj fazi infekcije virusom HCV razlikuje se od one u akutnoj fazi. Iako su NK-stanice i dalje aktivirane, smanjuje se kinetika i opseg sinteze IFN- γ no povećava se citotoksična aktivnost stanica. Mehanizam ovih promjena povezan je s dugotrajnim izlaganjem visokim koncentracijama IFN- α koji potiče ekspresiju te fosforilaciju molekule STAT1 (engl. *signal transducer and activator of transcription*) umjesto STAT4. NK-stanice također pokazuju promjenu fenotipa te je povećana ekspresija NK-stanica koje imaju

NKp46 i Nkp30 receptore što dodatno pridonosi njihovoj citotoksičnoj aktivnosti (Heim i Thimme 2014, Yoon i sur. 2016).

Smanjenje opsega repertoara receptora TCR te posljedično smanjenje učinkovitosti T-stanične imunosti koje se pojavljuje tijekom kronične infekcije vjerojatno je povezano s vrlo visokom koncentracijom antigena kao posljedicom kontinuirane virusne replikacije. Na T-limfocitima je dokazana povećana ekspresija molekula PD-1, CTLA-4, Tim-3, SD160 i drugih inhibitornih receptora čijom aktivacijom stanice gube svoja proliferativna i efektorska svojstva. Uz to, mutacijama se mijenjaju epitopi virusa HCV što utječe na promjene u sposobnosti njihovog T-staničnog prepoznavanja, ali i promjene u transkripciji citokinskih gena te sinteze njihovih produkata (Sung i sur. 2014, Petrovic i sur. 2012). Dodatna supresija CD8⁺ T-limfocita u kroničnoj infekciji virusom HCV uzrokovana je povećanim brojem CD4⁺CD25⁺ T-limfocita kao i Treg-limfocita koji sintentiziraju imunosupresivni citokin IL-10 (Heim i Thimme 2014). Slabljenje odgovora T-limfocita u kroničnoj infekciji pogoduje umnožavanju virusa. Uz mutacije epitopa kojima izbjegava odgovor na CD8⁺ T-limfocite, virus HCV izbjegava neutralizirajuća protutijela vezanjem za kolesterol HDL i receptor SRB-1 te direktnim transferom između stanica (Heim i Thimme 2014).

Indirektan utjecaj virusa HCV na oštećenje jetre uzrokovan je aktivacijom imunskog sustava tijekom infekcije no strukturni i nestrukturni proteini virusa HCV mogu i direktno potaknuti aktivaciju stanica HSC u jetri i proupalni odgovor. Nukleokapsidni protein potiče proliferaciju stanica HSC i epitelno mezenhimalnu tranziciju hepatocita aktivirajući unutarstanične signalne puteve te, kao i protein NS3, dovodi do povećane koncentracije Ca²⁺ i količine ROS unutar stanice. Glikoprotein E2 vezanjem za receptor CD81 stanica HSC potiče aktivnost matriks metaloproteinaza 2 (MMP-2), dok proteini NS3 i NS5A potiču oksidativni stres u hepatocitima (Sebastiani i sur 2014).

Fibroza jetre karakterizirana je nakupljanjem fibroznog vezivnog tkiva u odgovoru na kroničnu ozlijedu jetre koje vodi do stvaranja ožiljkastog tkiva. Za to su odgovorni miofibroblasti čijom se aktivacijom nakupljaju komponente ekstracelularnog matriksa (ECM, engl. *extracellular matrix*). Ekstracelularni matriks u normalnim fiziološkim uvjetima okružuje stanicu i stvara povoljan okoliš za razvoj i život stanica, a čine ga kolagen, laminin, elastin, fibronektin i druge komponente (Wynn i Ramalingam 2012).

Zvezdaste stanice jetre imaju ključnu ulogu procesu fibroze. Pod utjecajem faktora rasta (poput PDGF, TGF- α , EGF i VEGF), pro-upalnih citokina, ROS, proapoptotskih molekula i drugih proliferativnih faktora, one se aktiviraju te proliferiraju u miofibroblaste. Faktor TGF- β 1 (engl. *transforming growth factor β 1*) najznačajniji je faktor koji pridonosi povišenoj sintezi

komponentata ECM. On potiče stvaranje kolagena aktivacijom SMAD signalnog puta. Zajedno sa stimulansima iz Kupferovih stanica, djeluje na leptin koji potiče aktivaciju stanica HSC supresijom peroksisomnog proliferativnog aktiviranog receptora γ (PPAR γ , engl. *peroxisome proliferator-activated receptor* γ). Okolne stanice jetre također pomažu u aktivaciji stanica HSC pa tako Kupferove stanice luče faktore TNF- α i MCP-1 kojima potiču stanice HSC na lučenje dodatnih proupalnih faktora poput IL-6, MCP-1 i CCL5 (poznat i kao RANTES) te na taj način promoviraju fibrogenezu. Stanice HSC također luče adhezijske molekule VCAM-1 i ICAM kojima dodatno potiču migraciju upalnih stanica na mjesto ozljede (Sebastiani i sur. 2014).

1.2 Faktori rasta

Faktori rasta su solubilni medijatori biološkog odgovora koji imaju važnu ulogu u regulaciji brojnih fizioloških procesa, ali i u patogenezi brojnih bolesti. Prvi faktor rasta otkrila je dr. Rita Levi-Montalcini 1952.g. u eksperimentima koji su pokazali da prijenos tumorskog tkiva miša uzrokuje intenzivan rast neurona u pilećim embrijima temeljem koji je, prema njezinoj hipotezi, uzrokovala solubilna molekula koju luče tumorske stanice. Nakon detaljne biokemijske i biološke karakterizacije, molekula je nazvana faktorom rasta neurona (NGF, engl. *nerve growth factor*) te danas je prepoznata kao najvažniji čimbenik regulacije rasta i diferencijacije neurona (Aloe 2004). Dr. R. Levi-Montalcini je 1986.g. za otkriće faktora rasta dobila Nobelovu nagradu za medicinu ili fiziologiju.

Od tada, otkriveni su mnogi drugi faktori faktori koji iskazuju stimulacijske ili inhibicijske učinke na razvoj i diferencijaciju stanica (Tablica 1). Faktori rasta značajni su i za replikaciju virusa HCV te patogenezu fibroze tijekom kronične infekcije ovim virusom (Fénéant i sur. 2014).

Tablica 1. Faktori rasta i njihove biološke funkcije (preuzeto i modificirano prema: Bennett i Schultz 1993)

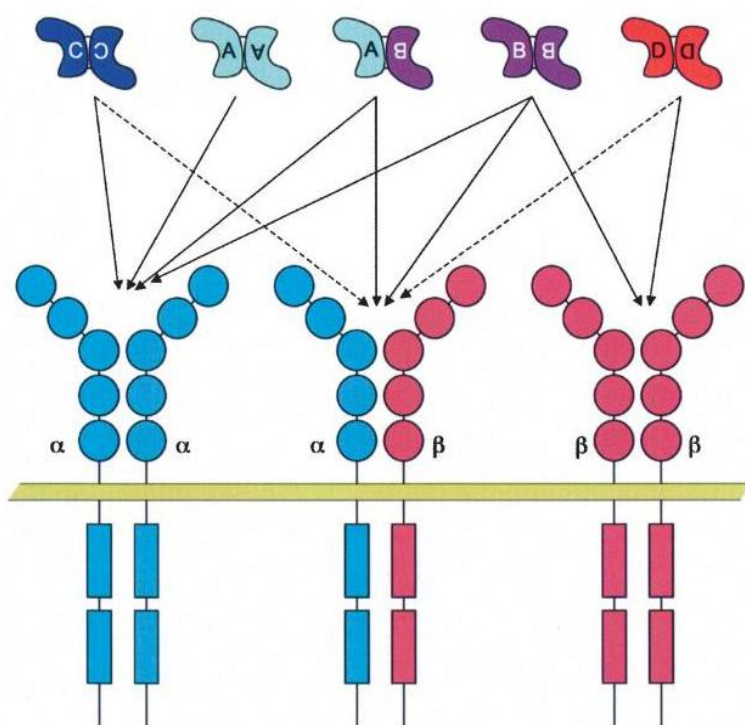
Faktor rasta (kratica)	Engleski naziv faktora rasta	Struktura faktora rasta	Lokalizacija faktora rasta	Biološke funkcije faktora rasta
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	monomer	tjelesne tekućine, trombociti	mitogeni za sva epitelna tkiva, fibroblaste, eritrocite
TGF- α	<i>transforming growth factor-α</i>	monomer	makrofagi, eozinofili, keratinociti	slično EGF, jači angiogeni faktor
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>	dimer	makrofagi, limfociti, fibroblasti, stanice kostiju, keratinociti, trombociti	inhibira proliferaciju većine stanica <i>in vitro</i> (keratinociti, endotelne stanice, limfociti i makrofagi), utjecaj na rast fibroblasta je dvojak (stimulacija ili inhibicija, ovisno u uvjetima kultivacije)
IGF-I	<i>insulin-like growth factor-I</i>	monomer	različita tkiva, fibroblasti, makrofagi	mitogen za fibroblaste, stanice kostiju, živčano tkivo, hematopoetske stanice, endotelne stanice
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>	dimer	endotelne stanice, trombociti, makrofagi, fibroblasti	mitogeni za vaskularno glatko mišićje, fibroblasti
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>	dimer	stanice hipofize	mitogeni za endotelne stanice, ali ne za keratinocite, stanice glatkog mišićja ili fibroblaste
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	monomer	fibroblasti, astrociti, endotelne stanice, stanice kostiju, glatkog mišićja	mitogen za tkivo mezenhimalnog porijekla te živčana tkiva
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>	monomer	fibroblasti	mitogen za epitelne stanice, ali ne fibroblaste i endotelne stanice
HBEGF	<i>heparin-binding growth factor</i>	monomer	makrofagi	mitogen za keratinocite, fibroblaste

1.2.1 Faktori rasta trombocita

Faktori rasta trombocita (PDGF, engl. *platelet derived growth factor*) otkriveni su u istraživanjima solubilnih medijatora proliferacije glatkih mišićnih stanica arterija. Sadrže specifičnu domenu PDGF/VEGF koja se nalazi na N' kraju sekvence aminokiselina i sadrži

osam cisteinskih ostataka koji su očuvani u životinjskom kraljevstvu te zajedno s faktorom rasta VEGF pripadaju superporodici molekula koje tvore cistinski čvor (Andrae i sur. 2008).

Faktor rasta PDGF je kationski dimer koji se sastoji od dvije podjedinice vezane disulfidnim vezama te postoji u obliku homodimera: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC i PDGF-DD ili heterodimera: PDGF-AB (Borkham-Kamphorst i Weiskirchen 2015). Faktori rasta PDGF su termostabilne molekule koje zadržavaju svoju biološku funkciju pri visokim temperaturama zbog disulfidnih veza koje imaju ključnu ulogu u biološkoj aktivnosti tih molekula (Kazlauskas 2017). Faktor rasta PDGF veže specifične receptore (PDGFR) na membrani ciljnih stanica pri čemu se formiraju dimeri kombinacijom α i β lanaca. Receptori PDGFR pripadaju skupini tirozinskih kinaza te kaskadom signalnih puteva određuju odgovor stanice na specifični ligand (Andrae i sur. 2008). Dimeri faktora rasta PDGF vežu se za različite kombinacije lanaca (Slika 5), ali neki s većim afinitetom od drugih. Do sada je *in vivo* dokazano samo vezanje faktor rasta PDGF-AA i PDGF-CC na receptor PDGFR- α te vezanje PDGF-BB i PDGF-DD na PDGFR- β te posljedična dimerizacija ovih molekula (Borkham-Kamphorst i Weiskirchen 2015).



Slika 5. Vezanje dimera faktora rasta PDGF na stanične receptore (preuzeto od: Andrae i sur, 2008)

Podjedinice faktora rasta PDGF se sintetiziraju u biološki inaktivnom obliku te je za njihovu funkcionalnu aktivaciju potrebna obrada putem različitih enzima poput urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA, engl. *urokinase plasminogen activator*), furina, matriptaze i plasmina. Izoforme faktora rasta PDGF-C i PDGF-D aktiviraju se vanstaničnom proteolitičkom obradom putem plasmina i plazminogenog tkivnog aktivatora (tPA, engl. *tissue plasminogen activator*), dok se faktori rasta PDGF-A, PDGF-B i PDGF-AB enzimski modificiraju unutar stanice (Andrae i sur. 2008, Kazlauskas 2017).

Najvažnije biološke aktivnosti faktora rasta PDGF uključuju regulaciju proliferacije stanica, migracije, preživljavanja, kemotaksije i angiogeneze. U tumorskim stanicama faktori rasta PDGF stvaraju autokrine kaskadne petlje koje dovode do stanične transformacije. Povećana ekspresija faktora rasta PDGF dovodi do ateroskleroze, fibroze i zloćudnih preobrazbi različitih tkiva (Li i sur. 2000). Faktori rasta PDGF također stimulira sintezu važnih komponenata matriksa vezivnog tkiva, poput kolagena, proteoglikana i glikozaminoglikana (Borkham-Kamphorst i Weiskirchen 2015).

Faktor rasta PDGF ima sposobnost vezanja za različite topive proteine. Primjer je PAP (engl. *PDGF-associated protein*) koji veže faktore rasta PDGF sa slabim afinitetom. Ovim mehanizmom povećava se aktivnost faktora rasta PDGF-AA te smanjuje aktivnost faktora rasta PDGF-BB (Heldin i Westermark 1999). Sposobnost vezanja faktora rasta PDGF-A i PDGF-B za komponente vanstaničnog matriksa posredovana je posebnom strukturom (engl. *retention motif*) koji se nalazi na kraju njihovih genomskih sekvenci i u faktora rasta PDGF-A se pojavljuje zbog alternativnog izrezivanja (engl. *splicing*), a u faktora rasta PDGF-B pri alternativnoj obradi proteina. Nasuprot tome, u faktorima rasta PDGF-C i PDGF-D ulogu vezanja za druge proteine ima domena CUB (Andrae i sur. 2008).

Istraživanja o biološkim mehanizmima faktora rasta PDGF i receptora PDGFR najčešće se temelje na eksperimentima pri kojima se, na različite načine, blokira prijenos signala ovog faktora rasta. Pri tome se najčešće koriste neutralizirajuća protutijela za faktore rasta PDGF, inaktivacija gena za faktore rasta PDGF i receptore PDGFR te inhibitori djelovanja receptora PDGFR. Inhibitor kinazne domene receptora PDGFR nazvan Imatinib koristi se i u liječenju kronične mijeloidne leukemije (s Philadelphia kromosomom) (Andrae i sur. 2008).

Povećana ekspresija i transdukcija signala za faktora rasta PDGF i receptora PDGFR značajan je čimbenik u patofiziologiji različitih bolesti, pogotovo onih povezanih uz proliferaciju stanica (Chen i sur. 2013). Faktori rasta PDGF su važni mitogeni za stanice HSC u jetri (Ying i sur. 2017). Oni se, tijekom oštećenja jetre, sintetiziraju zajedno s upalnim citokinima i drugim medijatorima reguliraju mehanizme popravka vezivnog tkiva. Stanice

HSC pokazuju povećanu ekspresiju receptora PDGFR- β nakon aktivacije, dok su faktori rasta PDGF-B i PDGF-D posebno značajni za stimulaciju portalnih fibroblasta (Borkham-Kamphorst i Weiskirchen 2015). Povećana ekspresija receptora PDGFR-a otkrivena je i u plućnoj fibrozi kao i u fibrozi bubrega, a blokiranje puta transdukcije signala receptora smanjuje opseg nakupljanja kolagena u ciljnim tkivima (Hayes i sur. 2014). Također, u stanicama cirotične jetre dokazana je povećana ekspresija mRNA faktora rasta PDGF-A i -B što ukazuje na moguću ulogu faktora rasta PDGF u nastanku ciroze (Bonner 2004).

1.2.1.1 PDGF-A

Gen za faktor rasta PDGF-A u ljudi nalazi se na 7p22 kromosomu i sastoji se od sedam egzona. Egzon jedan kodira signalnu sekvencu, egzon dva i tri prekursorske sekvence, egzoni četiri i pet kodiraju za domenu faktora rasta, egzon šest kodira za -COOH terminalnu sekvencu, a egzon sedam je većinom nekodirajući. Egzon šest nije uvijek eksprimiran te nastaju dvije izoforme molekule koje sadrže različiti broj aminokiselina. Kraća izoforma, koju čine 196 aminokiselina, češća je u odnosu na dulju varijantu koja se sastoji od 241 amino kiseline. (Siegfried i sur. 2005) Prekursorska molekula obrađuje se proteolitički unutar stanice prolazeći kroz Golgijevo tjelešće. Iako je proteolitička obrada još nedovoljno istražena, istraživanjem je pokazano kako je furin jedan od medijatora ovog procesa (Fredriksson i sur. 2004).

Faktor rasta PDGF-A sintetiziraju različite vrste stanica poput fibroblasta, Leydigovih stanica, keratinocita, skeletnih mioblasta, mezangijalnih stanica bubrega, mioblasti kostiju, vaskularnih endotelnih stanica, vaskularnih stanica glatkog mišićja, astrocita, neurona, epitelnih stanica dojke, makrofaga i trombocita, dok je najveća ekspresija u stanicama srca, krvnih žila i mišića (Heldin i Westermarck 1999, Ying i sur. 2017).

Eksperimenti na animalnim modelima pokazali su da je faktor rasta PDGF-A neophodan za preživljavanje. Istraživanje na miševima kojima nedostaje faktor rasta PDGF-A (*knock-out* miševi), pokazalo je kako 50% životinja iskaže letalni fenotip u prvih 10 dana razvitka embrija. Kod preživjelih miševa uočene su promjene u središnjem živčanom sustavu poput hipomijelinizacije i smanjene proliferacije oligodendrocita, poremećaji u razvoju pluća i folikula kose te kože (Li i sur. 2000). Li i sur. (2000) su također pokazali visoku koncentraciju transkripta faktor rasta PDGF-A u srcu i gušterači, dok u jetri, timusu i leukocitima periferne krvi nije dokazan transkripcija gena faktor rasta PDGF-A. Istražuje se i učinak različitih bioloških molekula na ekspresiju gena faktora rasta PDGF. U stanicama glatko mišićja glukokortikoidi smanjuju ekspresiju gena faktora rasta PDGF-A. (Kazlauskas 2017).

Povećana ekspresija dulje forme faktora rasta PDGF-AA otkrivena je u kapilarama i fibroblastima rana koje su nastale kao posljedica operativnih zahvata te u kroničnim čirevima. Nakon liječenja ozljeda tkiva, dulja forma faktora rasta PDGF-AA dokazana je samo u kapilarama dok je kratka forma otkrivena samo u fibroblastima. Pretpostavka je da u početku cijeljenja dominira dulja forma faktora rasta PDGF-AA, a kasnije kraća forma (Pierce i sur. 1995).

1.2.1.2 PDGF-B

Gen koji kodira za faktor rasta PDGF-B, nalazi se na kromosomu broj 22 i sastoji se od sedam egzona. Egzon jedan kodira za signalnu sekvencu, egzon dva i tri prekursorske sekvence, egzoni četiri i pet kodiraju za domen faktora rasta, a egzon sedam je većinom nekodirajući. Egzon šest kodira za -COOH terminalnu sekvencu koja se cijepa pri obradi prekursora (Heldin i Westermark 1999, Li i Eriksson 2003). Sekvence aminokiselina faktora rasta PDGF-B i *v-sis* onkogeni vrlo su slični (87.1%) što ukazuje na moguće sličnosti u mehanizmima djelovanja faktora rasta i onkogeni (Doolittle i sur. 1983). Faktor rasta PDGF-B ima molekularnu težinu 14kDa (Ying i sur. 2017).

Faktor rasta PDGF-B ekspimiraju fibroblasti, Leydigove stanice, keratinociti mezengijalnih stanica bubrega, mioblasti kostiju, vaskularne endotelne stanice, vaskularne stanice glatkog mišićja, neuroni, epitelne stanice dojke, makrofagi, trombociti i sl. (Heldin i Westermark 1999).

Istraživanje na miševima pokazalo je da delecija gena za faktor rasta PDGF-B uzrokuje gubitak mezengijalnih stanica glomerula bubrega, povećano srce, nedostatak pericita krvnih žila, dilataciju krvnih žila te krvarenje (Li i Eriksson 2003). U krvožilnom sustavu i tumorskim žilama, faktor rasta PDGF-B se otpušta iz endotela angiogenetskih izbojaka te služi kao atraktant za pericite koji ekspimiraju receptor PDGFR- β . Obzirom na to da je faktor rasta PDGF-B vezan za stanicu ili ECM, na taj se način periciti čvrsto vežu za žile. Faktor rasta PDGF-B također uzrokuje proliferaciju vaskularnih stanica glatkog mišićja (Gaengel i sur. 2009). Povećana ekspresija faktora rasta PDGF-B u miševa uzrokuje različite neoplazme, posebice tumore mozga. (Lindberg i Holland 2012).

Neke stanice imaju sposobnost izlučivanja i faktora rasta PDGF-A i PDGF-B koji zatim tvore heterodimer faktora rasta PDGF-AB (Kazlauskas 2017). Faktori rasta PDGF su termostabilni proteini te je i nakon zagrijavanja do 100°C, faktor rasta PDGF-AB zadržava svoju biološku funkciju (Kazlauskas 2017). Vezanje faktora rasta PDGF-AB na receptor

PDGFR- α potiče angiogenezu djelujući na interakciju između kardiomiocita i endotelne stanice (Li i Eriksson 2003).

1.2.1.3 PDGF-C

Gen koji kodira faktor rasta PDGF-C nalazi se na 4q32 kromosomu i sastoji se od šest egzona. Faktor rasta PDGF-C sastoji se od 345 amino kiselina i ima molekularnu težinu 36.7 kDa (Ying i sur. 2017). Ima specifičnu strukturu koja se sastoji od dvije domene: CUB domene i domene PDGF/VEGF, koje su odvojene slijedom od 80 - 90 aminokiselina. Drugi i treći egzon kodiraju domenu CUB, dok egzon pet i šest kodiraju domenu PDGF/VEGF (Li i Eriksson 2003). Domena PDGF/VEGF pokazuje sličnost s odgovarajućim regijama drugih faktora rasta iz porodica faktora rasta PDGF i VEGF od 27-35%. Članovi porodice faktora rasta PDGF/VEGF imaju osam cisteinskih ostataka, dok faktor rasta PDGF-C sadrži još četiri dodatna cisteinska ostatka. Oni se nalaze između trećeg i četvrtog, petog i šestog, šestog i sedmog te nakon osmog cisteina. Uz to, između trećeg i četvrtog cisteina nalazi se insercija od tri sekvence aminokiselina "NCA". Na temelju analize, zaključeno je da je sličnost faktora rasta PDGF-C veća s faktorom rasta VEGF nego s faktorom rasta PDGF (Li i sur. 2000).

Li i sur. (2000) također su dokazali da faktor rasta PDGF-C tvori homodimer koji se veže za receptor PDGFR- α sa sličnim afinitetom kao faktor rasta PDGF-AA i faktor rasta PDGF-BB. Gilbertson i sur. (2001) pokazali su kako se veže i za lanac PDGFR- β , ali stvarajući heterodimer PDGFR- $\alpha\beta$. Faktor rasta PDGF-C je latentni faktor te je preduvjet stvaranja biološki aktivne forme proteolitička obrada. Cijepanjem N-terminalnog kraja domene CUB, protein se aktivira i omogućuje se vezanje molekule za receptor. Za razliku od faktora rasta PDGF-A i faktora rasta PDGF-B, faktor rasta PDGF-C se proteolitički cijepa izvan stanice. U ljudi, najveća ekspresija mRNA za faktor rasta PDGF-C dokazana je u srcu, jetri, bubregu, gušterači i jajnicima a tijekom razvoja u mezenhimalnom dijelu buburega. Iako se veže na isti receptor kao i dimeri faktora rasta PDGF-A te faktori rasta PDGF-B, faktor rasta PDGF-C ima različite biološke funkcije (Li i sur. 2000).

1.2.1.4 PDGF-D

Gen koji kodira za faktor rasta PDGF-D nalazi se na 11q22 kromosomu i sastoji se od sedam egzona. Faktor rasta PDGF-D sastoji se od 370 amino kiselina i ima težinu 40.2 kDa

(Ying i sur. 2017). Kao i faktor rasta PDGF-C, sastoji se od dvije domene: domene CUB i domene PDGF/VEGF. Aminokiselinske sekvence faktora rasta PDGF-C i faktora rasta PDGF-D iskazuju sličnost u 43% sekvence (u domeni PDGF/VEGF i 50%), dok sličnost aminokiselinske sekvence faktora rasta PDGF-A i faktora rasta PDGF-B iznosi 20-23%. U odnosu na druge tromobocitne faktore rasta, faktor rasta PDGF-D sadrži sedam od ukupno osam očuvanih cisteinskih dijelova. Osmi je zamijenjen glicinom, a u cijeloj domeni PDGF/VEGF nalazi se ukupno deset cisteinskih dijelova. Faktor rasta PDGF-D također sadrži dodatnu inserciju aminokiselina "NCG" između cisteinskih ostataka tri i četiri. Na temelju podataka, domene PDGF/VEGF faktora rasta PDGF-D i PDGF-C tvore podtipove u skupini PDGF (Bergsten i sur. 2001). Egzoni dva i tri kodiraju za domenu CUB, dok egzoni šest i sedam kodiraju za domenu PDGF/VEGF (Li i Eriksson 2003).

Bergsten i sur (2001) pokazali su kako faktor rasta PDGF-D, kao i drugi faktori ove skupine, tvore homodimer pomoću disulfidnih mostova koji je ključan za vezanje za receptor. Za aktivaciju je također potrebno i izvanstanično cijepanje proteina proteolitičkim enzimima kako bi se oslobodili epitopi domene za vezanje. Receptor za faktor rasta PDGF-DD je receptor PDGFR- β na koji se također veže faktor rasta PDGF-BB. Afinitet vezanja aktiviranog faktora rasta PDGF-DD za receptor tri puta je manji u odnosu na faktor rasta PDGF-BB (Bergsten i sur. 2001).

Najveća ekspresija ovog faktora rasta dokazana je u srcu, gušterači i jajnicima, manja u tkivima poput jetre, bubrega i prostate, dok u mozgu, plućima i mišićima skeleta nije primjećena ekspresija ove molekule. U mišjim embrijima, najveća ekspresija faktora rasta PDGF-D otkrivena je u srcu, plućima, bubregu i nekim mišićima. Iako je ekspresija faktora rasta PDGF-B i PDGF-D, koji se vežu za isti receptor, zabilježena u bubrezima miševa tijekom embrionalnog razvoja, zanimljivo je kako su ovi faktori rasta eksprimirani u različitim vrstama stanica što ukazuje da imaju različite uloge u embrionalnom razvoju. Suprotno tome, ekspresija faktora rasta PDGF-D i PDGF-C dokazana je u istim vrstama stanica, no oni se vežu za različite receptore te iskazuju drugačije biološke učinke na barem dvije različite vrste stanica (Bergsten i sur. 2001).

1.2.1.5 PDGFR- α i - β

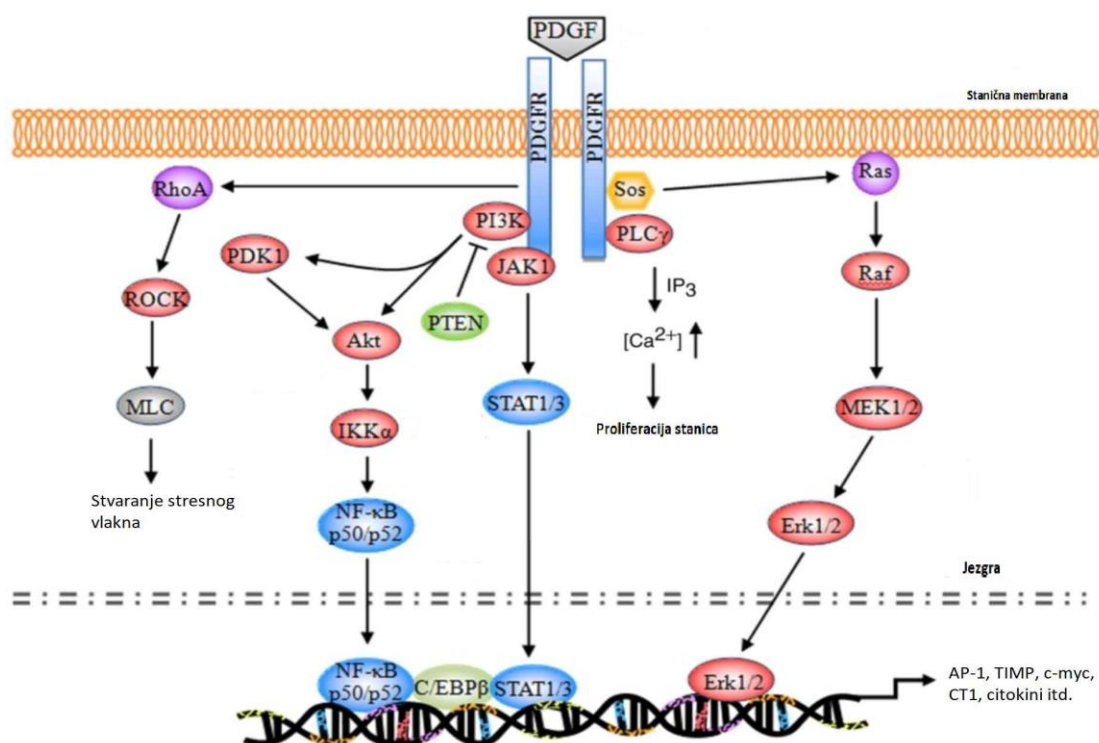
Receptori PDGFR pripadaju skupini tirozin kinaznih receptora (RTK, engl. *receptor tyrosine kinases*). Aktivni receptor sastoji se od dva tipa lanca α i β koji mogu tvoriti

homodimere PDGFR- $\alpha\alpha$ i PDGFR- $\beta\beta$ ili heterodimer PDGFR- $\alpha\beta$. Gen za lanac PDGFR- α nalazi se na kromosomu 4q12 i kodira za lanac veličine 170 kDa, dok se gen za lanac PDGFR- β nalazi na kromosomu 5q33 i kodira za lanac veličine 180 kDa (Ying i sur 2017).

Oba lanca sastoje se od pet domena (Slika 5): izvanstanične domene slične imunoglobulinima, transmembranske te tri unutarstanične, koju čine ATP vezno mjesto, hidrofilna kinazna domena i citoplazmatski rep (Ying i sur. 2017). Struktura ovih molekula slična je strukturi receptora za faktor stimulacije kolonija-1 (CSF-1, engl. *colony stimulating factor-1*) i receptora faktora rasta matičnih stanica (SCF, engl. *stem cell factor*). Tri posljednje domene izvanstanične regije služe u vezanju faktora rasta PDGF, a najbitniju ulogu ima druga domena. Četvrta domena služi za stabiliziranje receptorskog dimera koji nastaje vezanjem liganda (Heldin i Westermark 1999).

Receptori PDGFR su eksprimirani na različitim tipovima stanica. Receptor PDGFR- α nalazi se na fibroblastima, mezengijalnim stanicama bubrega, Leydigovim stanicama, sinusoidalnim endotelnim stanicama jetre, vaskularnim stanicama glatkog mišićja, astrocitima, neuronima, Schwannovim stanicama i trombocitima. Receptor PDGFR- β je eksprimiran na istim stanicama kao i receptor PDGFR- α osim na sinusoidalnim endotelnim stanicama jetre, astrocitima i trombocitima, te je dodatno eksprimiran na pericitima, kapilarnim endotelnim stanicama i stanicama jetre. Također je pokazano kako stanice eksprimiraju različitu količinu receptora PDGFR ovisno vanjskim čimbenicima te je primjerice ekspresija receptora PDGFR- β u stanicama vezivnog tkiva povećana tijekom upalnih procesa, dok lipopolisaharidi utječu na povećanje ekspresije receptora PDGFR- α u miofibroblastima pluća štakora (Heldin i Westermark 1999).

Receptor PDGFR lanci na membranama organizirani su kao monomeri (Kazlauskas 2017). Aktiviraju se vezanjem faktora rasta PDGF za imunoglobulinsku domenu što dovodi do dimerizacije lanca koja potiče autofosforilaciju tirozin kinaznog dijela receptora (Andrae i sur. 2008). Na autofosforilirana mjesta se vežu specifični substrati preko svoje domene -SH₂, te se zatim aktiviraju i potiču kaskadu signalnih puteva (Slika 6). To su primarno fosfolipaze C γ (PLC γ), Ras, fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K), Ras i STAT (Ying i sur. 2017). Iako su signalni putevi koje aktiviraju oba lanca slični, postoje određene razlike u odgovoru na aktivaciju nizvodnih gena (Andrae i sur. 2008).



Slika 6. Signalni putevi receptora faktora rasta PDGFR (Preuzeto i modificirano od Ying i sur. 2017)

Ras signalni put aktiviran je konverzijom Ras-GDP u Ras-GTP pomoću kompleksa Grb2-SOS. Protein Grb2 aktivira se vezanjem za fosforilirane komponente receptora PDGFR, nakon čega se veže sa SOS. Aktivirani Ras potiče kaskadu signalnog puta Raf-1/MEK/ERK čime dovodi do fosforilacije citoplazmatskih proteina, kontrole aktivnosti proteaza i transkripcijskih faktora poput aktivatorskog proteina 1 (AP1, engl. *activator protein 1*) i jezgrinog faktora-κB (NF-κB, engl. *nuclear factor-κB*) na promotorske regije gena čime potiče rast stanica, diferencijaciju, migraciju, angiogenezu i sl. Sustav Ras je primarno aktiviran prilikom razvoja fibroze jetre na taj način da povećava transkripciju kolagena tipa 1, proteina TIMP, MMP, Bcl-2 i XIAP, dijeljenje stanica, proliferaciju i apoptozu (Ying i sur. 2017).

Protein PI3K je dimer koji djeluje preko Akt/PKB puta, molekula iz porodice Protein kinaza C (PKC) i GTPaza iz porodice Rho (Andrae i sur. 2008). Ova molekula potiče rekombinaciju aktina, rast stanica, migraciju stanica, medijator je u regulaciji metabolizma i inhibira staničnu apoptozu (Ying i sur. 2017).

Fosfolipaza C γ je enzim koji djeluje na otpuštanje Ca²⁺ iz endoplazmatskog retikuluma te aktivira PKC. Aktivira se preko tirozin kinazne domene u receptoru PDGFR nakon čega hidrolizira fosfatidilinozitol difosfat (PIP) čime nastaju inozitol trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). U fibrozi jetre povećanje Ca²⁺ dovodi do poticanja mitoze u stanicama HSC (Ying i

sur. 2017). Efikasnije otpuštanje kalcija primjećeno je aktivacijom receptora PDGFR- β , u odnosu na receptor PDGFR- α (Andrae i sur. 2008).

Signalni put JAK/STAT sudjeluje u transkripciji gena vezanih uz rast i diobu stanica. Fosforilirani receptor PDGFR aktivira tirozinske protein kinaze porodice JAK što dovodi do fosforilacije STAT proteina pri čemu nastaju dipolimeri. Oni ulaze u stanicu i vežu se za DNA čime potiču transkripciju (Ying i sur. 2017).

Receptor PDGFR se vežu na integrine i pojačavaju proliferaciju stanica, migraciju i preživljavanje stanica (Andrae i sur. 2008). Uz direktno vezanje faktora rasta PDGF i dimerizaciju, faktori rasta PDGF se mogu aktivirati i indirektno, najčešće putem receptora PDGFR- α . Indirektni učinak faktora rasta PDGF posredovan je kaskadom signala nastalih vezanjem drugih faktora rasta za receptora PDGF. Na taj način dolazi do aktivacije monomera PDGFR- α pri čemu se ne javlja degradacija receptora (Kazlauskas 2017).

Nakon vezanja liganda PDGF za receptore te prijenosa signala, dolazi do internalizacije receptora endocitozom, zaustavljanja prijenosa signala i degradacije lizosomima (Andrae i sur. 2008, Kazlauskas, 2017).

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

(1) Usporediti koncentraciju faktora rasta PDGF-AA u serumu osoba s različitim stupnjem fibroze uzrokovane kroničnom infekcijom virusom HCV i u zdravih osoba.

(2) Analizirati moguću povezanost između koncentracije faktora rasta PDGF-AA na proteinskoj razini i stupnja oštećenja jetre.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Biološki uzorci

U istraživanje je uključeno 64 odraslih osoba s kroničnom infekcijom virusom HCV i različitim stupnjevima fibroze jetre te 15 zdravih osoba (kontrolna skupina). Uzorci periferne krvi uzeti su venepunkcijom u epruvete bez antikoagulansa. Nakon inkubacije od 15 do 30 minuta na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 2000g. Dobiveni supernatant je dodan pipetom u sterilne epruvete koje su pohranjene na -20°C. Parametri ispitanika (Tablica 2 i 3) prikupljeni su iz baze podataka Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu. Istraživanje je provedeno u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu.

Tablica 2. Parametri ispitanika

Parametar	Broj ispitanika (%)	medijan (minimum - maksimum)
Spol: žene	34 (43,04)	-
muškarci	45 (56,96)	-
Dob (godine)	-	48 (26 - 74)
Infekcija virusom HCV: da	64 (81,01)	-
ne	15 (18,99)	-
Genotip HCV-a:		
Genotip 1	36 (56,25)	-
Genotip 2	1 (1,56)	-
Genotip 3	22 (34,38)	-
Genotip 4	1 (1,56)	-
trajanje infekcije (godine)	38 (59,38%)	20 (1 - 60)
LMS (kPa)	56 (70,89)	8,5 (3,3 - 75)

LMS = tvrdoća jetre

Tablica 3. Dodatni klinički parametri ispitanika

Parametar (mjerna jedinica)	Medijan (minimum - maksimum)
Težina (kg)	77 (45 - 100)
AST (U/L)	43 (13 - 210)
ALT (U/L)	49 (2 - 328)
AST/ALT omjer	0,89 (0,33 - 18,95)
GGT (U/ml)	49 (9 - 532)
Bilirubin (μmol/L)	13 (6 - 95)
Kolesterol (mmol/L)	4,7 (2,5 - 8,3)
Trigliceridi (mmol/L)	1 (0,3 - 23)
HDL (mmol/L)	1,4 (0,8 - 2,8)
LDL (mmol/L)	2,9 (1,3 - 5,2)
Albumin (g/L)	43,85 (37,4 - 49,2)

ALT - alanin aminotransferaza, AST - aspartat aminotransferaza, GGT - gamaglutamil transferaza, HDL - lipoprotein velike gustoće, LDL - lipoprotein male gustoće

3.1.2 Komplet reagensa

Za određivanje kvantifikacije virusne RNA korišten je komplet reagensa COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HCV Quantitative Test (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, SAD).

Za određivanje koncentracije faktora rasta PDGF-AA korišten je komplet reagensa PDGF-AA Human ELISA Kit (Abcam, Cambridge, UK)

3.1.3 Uređaji i dodatni materijali

Uređaji i dodatni materijali koji su korišteni u izradi ovog rada navedeni su u tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Korišteni uređaji i njihovi proizvođači

INSTRUMENT	PROIZVOĐAČ
Centrifuga Hettich EBA 20	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Hettich), TuttlingenNjemačka
Tresilica Top Mix 11118 Bioblock Scientific	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
Čitač mikrotitarskih pločica Captia Reader	Trinity Biotech, Bray, Irska
Tresilica mikrotitarskih pločica Hybrid Capture System Digene rotary shaker	Qiagen, Hilden, Njemačka
Zamrzivač LA 60 390.BV	Končar, Zagreb, Hrvatska
COBAS AmpliPrep Instrument/COBAS TaqMan 48 Analyzer	Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, SAD

Tablica 5. Dodatni materijali i pomagala te njihovi proizvođači

DODATNA POMAGALA I MATERIJALI	PROIZVOĐAČ
destilirana voda	Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb
papirnati ručnici	
epruvete za pripremu razrjeđenja standarda	Sarstedt, Numbrecht, Njemačka
epruvete za pripremu razrjeđenja uzoraka	Sarstedt, Numbrecht, Njemačka
pipete Finnpiette F2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
višekanalna pipeta Finnpiette F2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
nastavci za pipete za 100, 500 i 1 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD

3.2 Metode

3.2.1 Kvantifikacija RNA virusa HCV

Za određivanje broja kopija RNA virusa HCV (viremija) u serumima ispitanika koristila sam COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test amplifikacije nukleinskih kiselina lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR, engl. *real-time polymerase chain reaction*). Test se koristi za kvantifikaciju RNA virusa HCV genotipa 1 – 6 u uzorcima ljudske plazme s EDTA ili seruma. Izvodi se na automatiziranim povezanim uređajima (Slika 7) (Roche Diagnostics, USA): COBAS AmpliPrep Instrument koji služi za izolaciju RNA virusa te COBAS TaqMan 48 Analyzer za amplifikaciju i detekciju virusne RNA. Princip kvantifikacije se sastoji od tri faze: 1) priprema uzoraka za izolaciju RNA HCV, 2) reverzna transkripcija (RT, engl. *reverse transcription*) RNA kako bi se dobila cDNA i 3) umnažanje specifične regije unutar cDNA metodom PCR i detekcija oligonukleotidne probe za detekciju umnoženih produkata. Kvantifikacija umnožene RNA virusa HCV se određuje usporedbom s pripravkom neinfektivne RNA poznatog broja kopija koja sadrži sekvence s identičnim mjestom vezanja početnica kao i RNA virusa HCV te specifično mjesto za vezanja probe kako bi se dobiveni umnoženi produkt razlikovao od umnoženog RNA virusa HCV iz uzorka (HCV Quantitation Standard tj. QS RNA).



Slika 7. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan uređaj (preuzeto od: www.cobas.be)

Prema uputama proizvođača, u uređaj COBAS AmpliPrep Instrument sam stavila kazete s reagensima te upisala numeričke kodove analiziranih uzoraka i kontrola dobivenih u kompletu reagensa. Uzorke seruma otopila sam na sobnoj temperaturi te izmješala na vrtložnoj

mješalici. Pipetom sam dodala 850 µl seruma u epruvete koje sam stavila na držač za uzorke uređaja, dodala kontrole (HCV visoka pozitivna kontrola, HCV niska pozitivna kontrola i COBAS Taqman negativna kontrola) kompleta reagensa te pokrenula program. Tijekom postupka izolacije RNA virusa HCV, virusne čestice se liziraju tijekom inkubacije s proteazom i puferom na visokoj temperaturi. U dobivenu smjesu još se dodaju i magnetske čestice, reagens za liziranje te poznata količina HCV QC RNA. Tijekom inkubacije dolazi do vezanja RNA virusa HCV i HCV QS RNA za magnetske čestice te se zatim nevezane komponente ispiru. Nakon ispiranja, adsorbirana RNA se eluira u vodenoj otopini pri povišenoj temperaturi. U smjesu se dodaju reagensi za amplifikaciju nukleinskih kiselina te se dobivene smjese automatiziranim sustavom prenose u COBAS TaqMan 48 Analyzer uređaj. Za reverznu transkripciju i umnažanje fragmenta metodom PCR koristi se termostabilni rekombinantni enzimi Z05 i Z05D koji iskazuju aktivnost reverzne transkriptaze i DNA polimeraze. Zagrijavanjem smjese dolazi do denaturacije cDNA i oslobađanja mjesta za vezanje početnica na 5' UTR regiji. Spuštanjem temperature, početnice se vežu na specifična mjesta te na temelju kalupa dolazi do produljenja lanca i nastanka umnoženog produkta. Taj proces se ponavlja određeni broj ciklusa koji je predprogramiran u uređaj. Za detektiranje dobivenog produkta koriste se dvostruko obilježene probe koje se vežu na specifična mjesta na RNA. Probe se sastoje od kratkog oligonukleotidnog slijeda s fluorescentnom bojom (engl. *reporter*) na 5' kraju i prigušivačem (engl. *quencher*) na 3' kraju. Prilikom umnažanja produkta, enzimskom reakcijom dolazi do cijepanja probe pri čemu se reporter odvoji od prigušivača te dolazi do emitiranja fluorescentne boje koja se zatim detektira. Ukoliko nema ciljne sekvence, nema detekcije emitirane boje. Za obradu rezultata metode PCR koristila sam program instrumenta Amplilink. Na temelju usporedbe detektiranih emisija uzoraka s nepoznatim brojem kopija RNA HCV i uzoraka poznate koncentracije HCV QS RNA, dobiven je broj kopija RNA virusa HCV u uzorcima seruma. Linearni raspon za detekciju je između 15 IU/ml i 100 000 000 IU/ml virusne RNA.

3.2.2 Određivanje koncentracije faktora rasta PDGF-AA

Za određivanje koncentracije faktora rasta PDGF-AA u serumu ispitanika koristila sam standardizirani ELISA (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) test (PDGF-AA Human ELISA Kit, Abcam, Cambridge, UK). ELISA je enzimski imunotest na čvrstoj fazi. Temelj imunotesta je specifična interakcija između protutijela i antigena. Bazenčići mikrotitarskih pločica obloženi su protutijelima specifičnima za određeni antigen. Pipetiranjem standarda i

uzoraka u zasebne bazenčiće, dolazi do prepoznavanja te vezanja antigena za imobilizirano protutijelo. Ispiranjem se uklanja suvišak analita te se dodaje sekundarno protutijelo obilježeno biotinom koje se veže na epitope vezanog antigena. Nakon inkubacije i ispiranja nevezanog sekundarnog protutijela, u bazenčiće se dodaje streptavidin konjugiran s peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *Horseradish peroxidase*). Nakon daljnje inkubacije i ispiranja dodaje se bezbojni supstrat koji zbog enzimske reakcije u doticaju s preoksidazom HRP mijenja boju. Intenzitet dobivenog obojenja je proporcionalan količini vezanog faktora rasta PDGF-AA. Dodavanjem Stop otopine boja se mijenja iz plave u žutu te se intenzitet obojenja mjeri čitačem mikrotitarskih pločica (spektrofotometrijski).

Uzorke i materijale sam izvadila iz -20°C i ostavila na sobnoj temperaturi na 30 minuta. Pripremila sam 1x koncentrirano razrjeđenje radne otopine od 15 ml 5x koncentrirane radne otopine te 1x razrjeđenje otopine za ispiranje od 20 ml stock otopine prema uputama proizvođača. Zatim sam razrijedila uzorke 500 puta. U obilježene epruvete sam pipetom dodala 499 μl radne otopine. Uzorke sam kratko promiješala na vrtložnoj mješalici te sam u svaku dodala 1 μl uzorka. Pripremila sam serijska razrjeđenja standarda prema uputama proizvođača (30 000, 10 000, 3 333, 1 111, 370,4, 123,5, 41 i 0 $\text{pg}/\mu\text{l}$).

U bazenčiće mikrotitarske pločice sam dodala po 100 μl ranije dobivenih razrjeđenja standarda (1 – 8) u duplikatima te 79 razrjeđenja uzoraka (64 osobe s infekcijom virusom HCV i 15 kontrola) u duplikatima. Pločicu sam poklopila i inkubirala 2,5 sati pri sobnoj temperaturi na tresilici mikrotitarskih pločica. Pripremila sam 1x razrjeđenje biotiniziranog PDGF-AA detekcijskog protutijela prije kraja inkubacije. Nakon inkubacije, sadržaj bazenčića sam istresla. Višekanalnom pipetom sam ispunila svaki bazenčić s 300 μl 1x otopine za ispiranje te istresla sadržaj (za dobre rezultate testa bitno je da se potpuno izbací tekućina). Taj postupak ispiranja sam ponovila još 3 puta, a nakon posljednjeg ispiranja pločicu sam okrenula i protresla na papirnatim ručnicama dok se nije istresla sva tekućina. Višekanalnom pipetom sam dodala 100 μl pripremljenog 1x razrjeđenja biotiniziranog PDGF-AA protutijela u svaki bazenčić, pokopila, te ostavila da se inkubira 1 sat pri sobnoj temperaturi na tresilici mikrotitarskih pločica. Pred kraj inkubacije sam napravila 1x razrjeđenje otopine HRP-Streptavidin te promiješala na vrtložnoj mješalici 10 sekundi. Pri završetku inkubacije, sadržaj pločice sam istresla i ponovila postupak ispiranja 4 puta. Zatim sam u svaki bazenčić višekanalnom pipetom dodala 100 μl 1x otopine HRP-Streptavidin, poklopila, te ostavila da se inkubira 1 sat pri sobnoj temperaturi na tresilici mikrotitarskih pločica. Nakon inkubacije, sadržaj pločice sam istresla i ponovila postupak ispiranja 4 puta. Višekanalnom pipetom sam dodala 100 μl TMB One – Step

Substart reagensa u svaki bazenčić, protresla pločicu, te inkubirala 30 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Zatim sam višekanalnom pipetom dodala 50 µl Stop otopine u svaki bazenčić, protresla pločicu i odredila intenzitet obojenja pomoću čitača mikrotitarskih pločica pri 450nm. Minimalna doza koja se može detektirati je manja od 40 pg/mL.

3.2.3 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog računalnog softverskog paketa „Statistica” (TIBCO, Kalifornija, SAD). Dobiveni rezultati opisano su medijanom, minimalnom i maksimalnom vrijednošću te interkvartalnim rasponom. Analiza je obavljena pomoću Spearmanove korelacije (Spearman, 1904) i Kruskal-Wallis (Kruskal i Wallis, 1951) testa. Za utvrđivanje statistički značajnih razlika u svim provedenim analizama koristila sam p-vrijednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 Kvantifikacija RNA virusa HCV

Broj kopija RNA virusa HCV određen je u 62 ispitanika. Broj kopija RNA virusa HCV u serumu 24 (37,5%) ispitanika bila je < 600 000 IU/ml RNA HCV (niža viremija) dok je u 38 (59,38%) ispitanika bila > 600 000 IU/ml RNA HCV-a (viša viremija) (Tablica 6). Medijan viremije iznosio je 1 104 360,5 IU/ml RNA HCV (raspon 19 746-31 074 605 IU/ml RNA HCV).

Tablica 6. Rezultati kvantifikacije RNA virusne HCV

Viremija (IU/ml RNA HCV)	Broj ispitanika (%)	medijan (minimum - maksimum) (IU/ml RNA HCV)
<600 000	24 (37,5)	229 728 (19 746 - 545 706)
>600 000	38 (59,38)	1 959 302 (964 742 - 31 074 605)

4.2 Koncentracija faktora rasta PDGF-AA

Koncentracija faktora rasta PDGF-AA određena je u svih 79 ispitanika. Medijan je iznosio 1681, 56 ng/ml (Tablica 7).

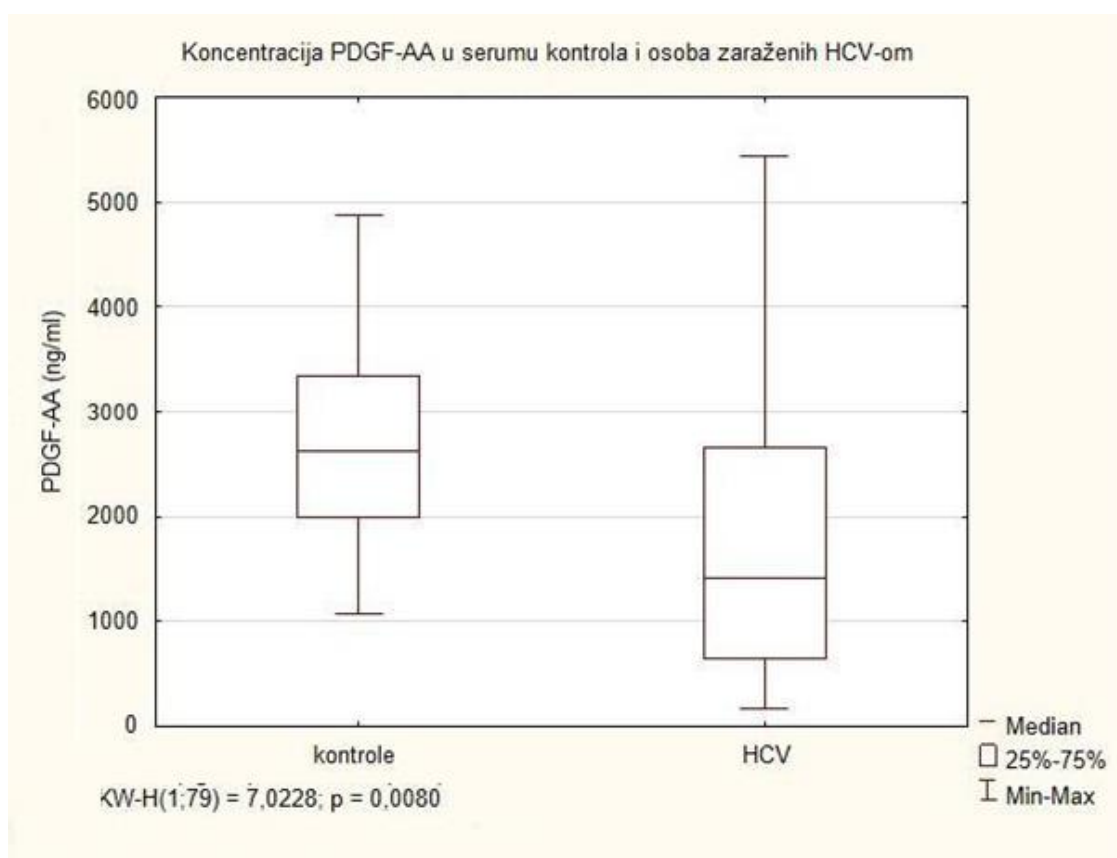
Tablica 7. Koncentracija faktora rasta PDGF-AA

	broj ispitanika (%)	medijan (minimum - maksimum) / (ng/ml)
PDGF-AA	79 (100%)	1681,56 (177,31 - 5443,89)

4.3 Statistička analiza

4.3.1 Analiza koncentracije faktora rasta PDGF-AA

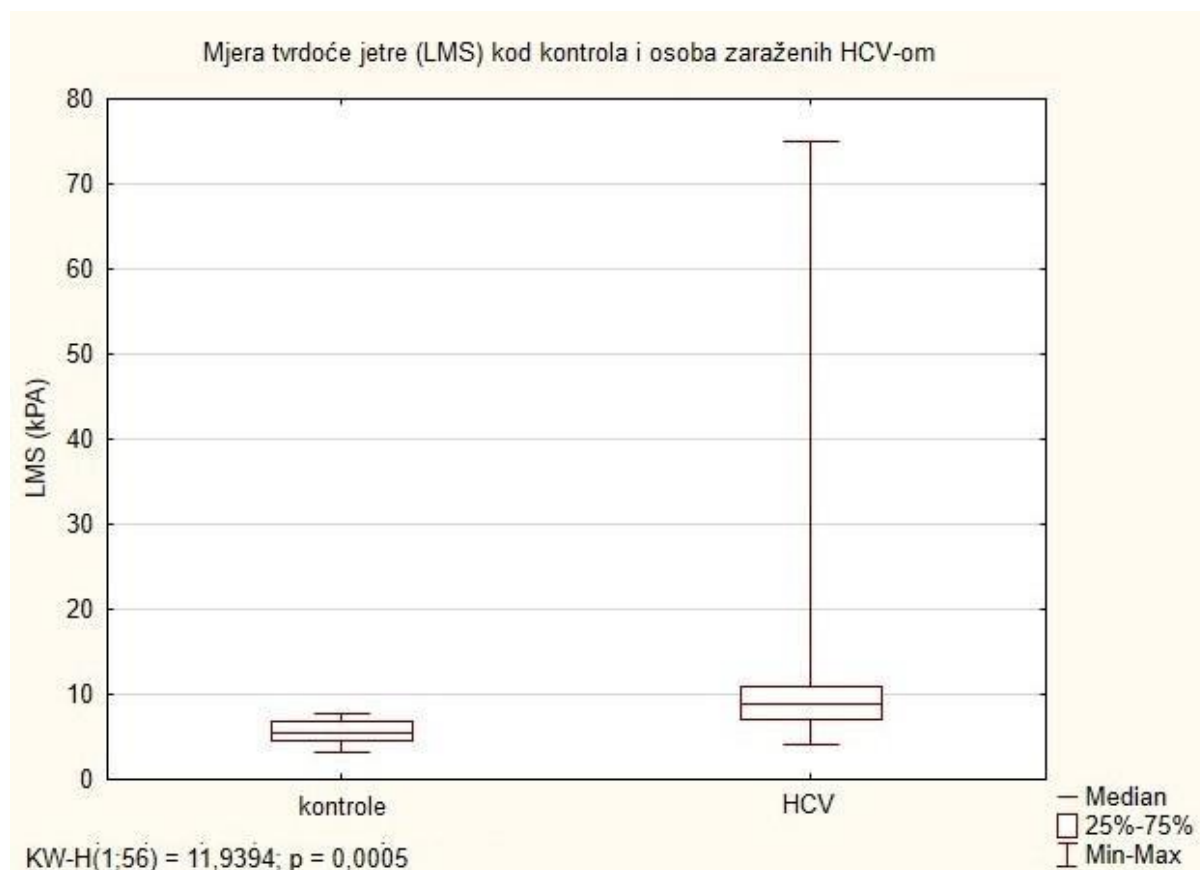
Koncentracija faktora rasta PDGF-AA u uzorcima seruma zdravih kontrola i ispitanika zaraženih virusom HCV određena je metodom enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi, a rezultati su prikazani medijanom s interkvartalnim rasponima. Rezultati statističke analize pokazali su značajnu razliku u koncentracijama faktora rasta PDGF-AA između zdravih osoba (medijan 2633,72 ng/ml; IQR 2002,65 - 3336,97 ng/ml) i ispitanika zaraženih virusom HCV (medijan 1424,42 ng/ml; IQR 657,38 - 2668,33 ng/ml) ($p = 0,0080$) (Slika 8).



Slika 8. Koncentracija faktora rasta PDGF-AA u serumu zdravih ispitanika te ispitanika zaraženih virusom HCV (KW – Kruskal Wallis test)

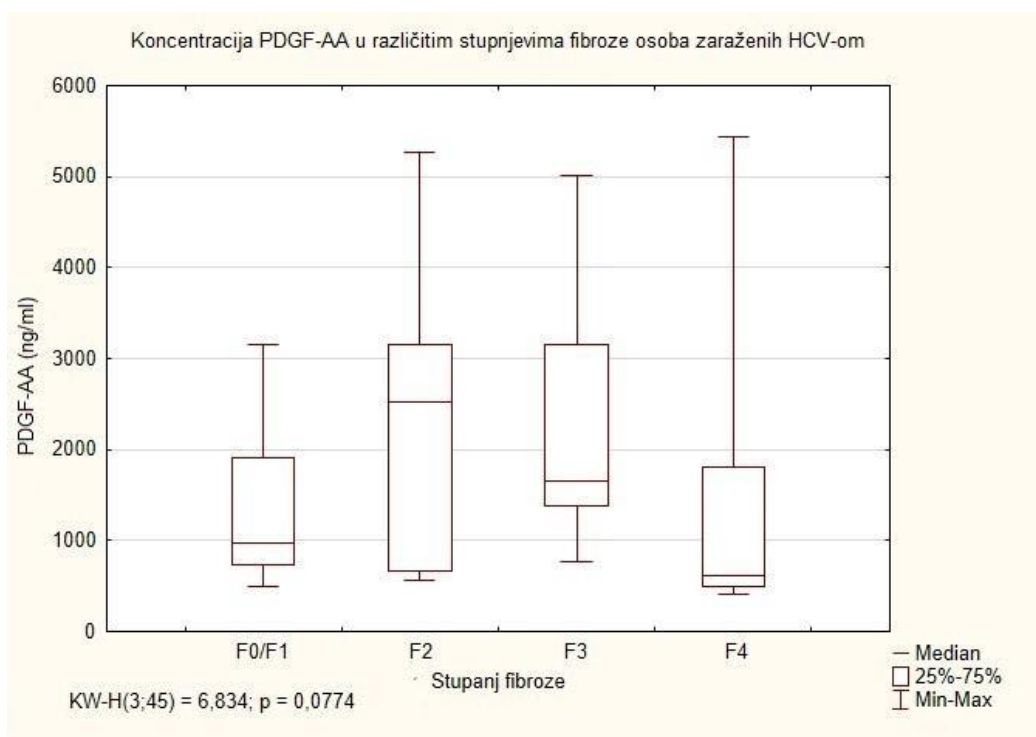
4.3.2 Analiza koncentracije faktora rasta PDGF-AA i stupnja fibroze

Analiziran je stupanj fibroze procijenjen fibroelastografijom (LMS) u zdravih osoba i ispitanika zaraženih virusom HCV. Utvrđena je statistički značajna razlika LMS između zdravih osoba (medijan 5,5 kPa; IQR 4,5 - 6,8 kPa) i ispitanika zaraženih virusom HCV (medijan 8,9 kPa; IQR = 7 - 11 kPa) ($p = 0.0005$) (Slika 9)

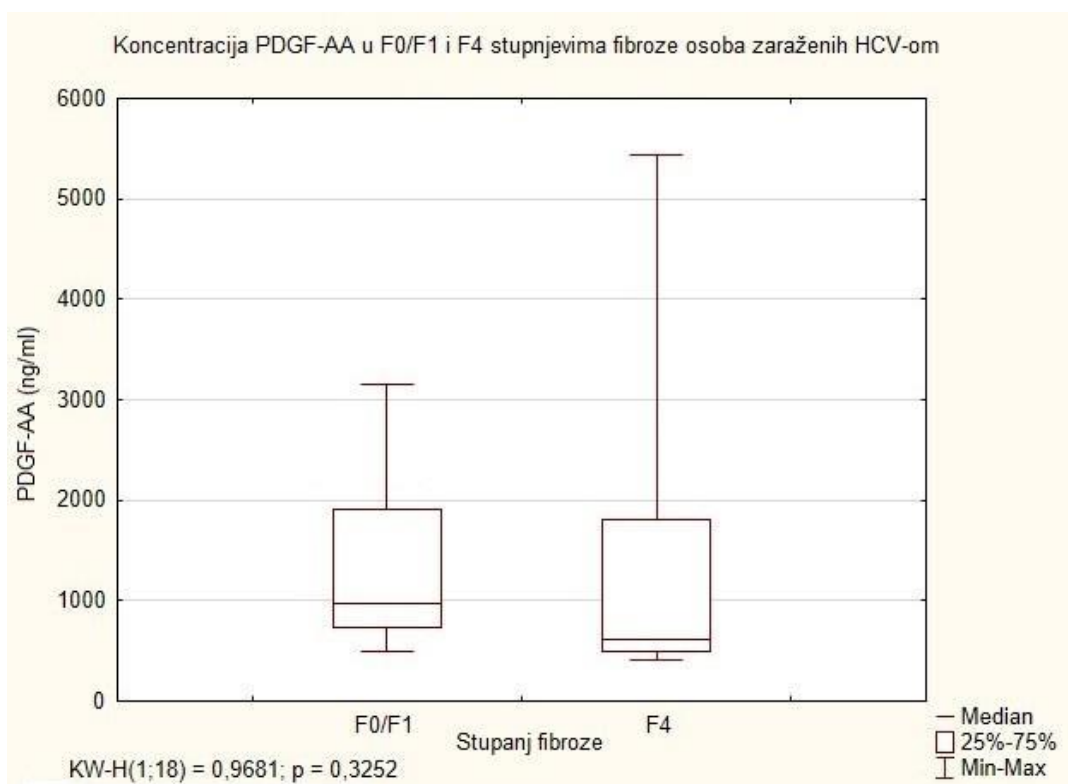


Slika 9. LMS (kPa) u zdravih kontrola i ispitanika zaraženih virusom HCV (KW – Kruskal Wallis test)

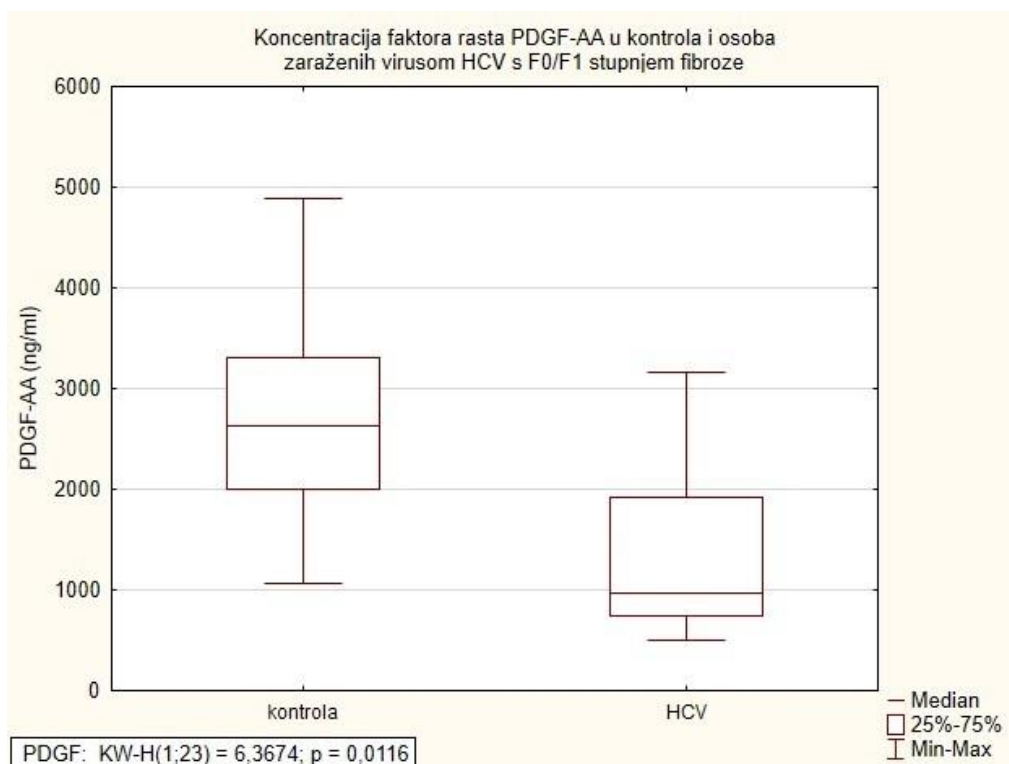
Za potrebe statističke analize, dobivene rezultate FibroScan[®] testa podijelila sam prema METAVIR indeksu stadija fibroze (F0 - F4) pri čemu je F0/F1 = 2 - 7 kPa, F2 = 7 - 9 kPa, F3 = 9 - 14 kPa i F4 > 14 kPa. Usporedbom koncentracije faktora rasta PDGF-AA i stadija fibroze nije dobivena statistički značajna razlika ($p = 0,0774$), kao ni u usporedbi koncentracije faktora rasta PDGF-AA u serumu ispitanika zaraženih virusom HCV sa F0/F1 stupnjem fibroze i F4 stupnjem fibroze ($p = 0,3252$) (Slika 10 i Slika 11). Međutim, utvrđena je statistički značajna razlika ($p = 0,0116$) u usporedbi koncentracije faktora rasta PDGF-AA u serumu kontrola i ispitanika zaraženih virusom HCV sa F0/F1 stupnjem fibroze (Slika 12).



Slika 10. Koncentracija faktora rasta PDGF-AA u četiri stupnja fibroze ispitanika zaraženih virusom HCV (KW – Kruskal Wallis test)



Slika 11. Koncentracija faktora rasta PDGF-AA u F1 i F4 stupnju fibroze ispitanika zaraženih virusom HCV (KW – Kruskal Wallis test)



Slika 12. Koncentracija faktora rasta PDGF-AA u kontrola i osoba zaraženih virusom HCV s F0/F1 stupnjem fibroze (KW – Kruskal Wallis test)

4.3.3 Analiza korelacija faktora rasta PDGF-AA, viroloških i kliničkih parametara

Za utvrđivanje korelacije između dobivenih koncentracija faktora rasta PDGF-AA i drugih odabranih viroloških i kliničkih parametara korištena je Spearmanova korelacija.

Analiza faktora rasta PDGF-AA i LMS u korelaciji s dobi ispitanika, težinom, viremijom i trajanjem infekcije pokazala je statistički značajnu korelaciju između faktora rasta PDGF-AA i trajanja infekcije (koeficijent korelacije = - 0,330590, $p=0,043$) i LMS s dobi ispitanika (koeficijent korelacije = 0,406213; $p = 0,002$). (Tablica 8)

Tablica 8. Spearmanova korelacija faktora rasta PDGF-AA i LMS s odabranim faktorima

	PDGF-AA	LMS	Dob	Težina	Viremija	Trajanje infekcije
PDGF-AA	1,000000	-0,041999	-0,020853	0,040187	0,203679	-0,330590
LMS	-0,041999	1,000000	0,406213	0,276764	-0,018913	0,187836

crveno su označene statistički značajne povezanosti između parametara ($p<0,05$)

PDGF-AA - faktor rasta trombocita – AA; LMS – tvrdoća jetre

Analiza faktora rasta PDGF-AA s parametrima vezanima uz funkcije jetre pokazala je pozitivnu Spearmanovu korelaciju i statistički značajnu povezanost faktora rasta PDGF-AA s trigliceridima ($p = 0,002$), albuminom ($p = 0,002$) i kolesterolom LDL ($p = 0,034$). Analiza LMS s istim parametrima ukazala je na pozitivnu Spearmanovu korelaciju i statistički značajnu povezanost LMS-a i AST ($p = 0,000002$), ALT ($p = 0,027$), AST/ALT omjera ($p = 0,014$), GGT ($p = 0,046$), bilirubina ($p = 0,004$), dok je pokazana negativna Spearmanova korelacija i statistički značajna povezanost LMS i kolesterola ($p = 0,0002$), albumina ($p = 0,045$) i kolesterola LDL ($p = 0,0003$) (Tablica 9)

Tablica 9. Spearmanova korelacija faktora rasta PDGF-AA i LMS s odabranim kliničkim faktorima

	PDGF-AA	LMS
AST	-0,168636	0,583895
ALT	-0,086637	0,295196
AST/ALT omjer	-0,099450	0,326938
GGT	0,096229	0,267222
bilirubin	-0,213851	0,378470
kolesterol	0,236134	-0,481602
trigliceridi	0,374760	-0,143223
HDL	-0,079255	-0,089584
albumin	0,379271	-0,269008
LDL	0,259978	-0,467796

crveno su označene statistički značajne povezanosti između parametara ($p < 0,05$)
 PDGF-AA - faktor rasta trombocita – AA; LMS – tvrdoća jetre, ALT - alanin aminotransferaza, AST - aspartat aminotransferaza, GGT - gamaglutamil transferaza, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein male gustoće

5 RASPRAVA

Povećana ekspresija faktora rasta PDGF i aktivacija signalnih puteva ovog proteina značajan je čimbenik u patofiziologiji brojnih bolesti, uključujući i fibrozu jetre. Povećana aktivacija stanica HSC putem faktora rasta PDGF potiče kemoskiju i stvaranje ekstracelularnog matriksa u početnom stadiju kronične bolesti jetre (Ying i sur. 2017). Dvije izoforme ove molekule, faktori rasta PDGF-B i PDGF-C, također imaju važnu ulogu u nastanku fibroze. Campbell i sur. (2005) pokazali su kako u transgeničnim miševima koji ekspresiraju ljudski faktor rasta PDGF-C dolazi do aktivacije i proliferacije stanica HSC te nastanka fibroze. Faktori rasta PDGF-A i PDGF-B većinom reguliraju biološke procese u stanicama mezenhimalnog podrijetla (Borkham-Kamphorst 2008).

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti koncentraciju faktora rasta PDGF-AA u serumu osoba s različitim stupnjem fibroze uzrokovane kroničnom infekcijom virusom HCV s onom u zdravih osoba. Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajnu razliku između koncentracije faktora rasta PDGF-AA u serumu kontrola i serumu ispitanika zaraženih virusom HCV, no razlika u koncentraciji faktora rasta PDGF-AA u ispitanika s kroničnom infekcijom virusom HCV obzirom na četiri stadija fibroze nije bila značajna.

Tanikawa i sur. (2017) objavili su rezultate istraživanja ekspresije mRNA faktora rasta PDGF-AA u trombocitima u osoba zaraženih virusom HCV s različitim stupnjevima fibroze. U istraživanje su bile uključene 43 osobe zaražene genotipom 1 virusa HCV starije od 18 godina koje prije biopsije jetre nisu bile liječene antivirusnim lijekovima. Na temelju METAVIR indeksa stupnja fibroze ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine: G1 s nižim stupnjem (F1 i F2) i G2 s višim stupnjem fibroze (F3 i F4). Relativna kvantifikacija RNA određena je prema ekspresiji u uzorcima osoba s F1 stupnjem fibroze i genotipom 1 te je primjećena značajna povezanost između stupnja fibroze i ekspresije mRNA faktora rasta PDGF-A u trombocitima. Povećana ekspresija mRNA u trombocitima je dokazana u G1 skupini, dok je u G2 skupini ekspresija bila snižena. Ekspresija mRNA faktora rasta PDGF-A u tkivu jetre u G1 i G2 skupinama bolesnika nije bila značajno različita. Uspoređujući ekspresiju mRNA faktora rasta PDGF-A u trombocitima s onom u tkivu jetre u svakom ispitaniku, dokazana je povećana ekspresija u trombocitima u skupini ispitanika s nižim stupnjem fibroze, dok je ekspresija mRNA faktora rasta PDGF bila snižena u skupini ispitanika s višim stupnjem fibroze. Na temelju rezultata ovog istraživanja može se pretpostaviti da povećana ekspresija mRNA faktora rasta PDGF-AA u trombocitima ukazuje na ulogu faktora

rasta PDGF-AA u početku fibroze i na alternativni put aktivacije stanica HSC putem faktora rasta TGF- β 1 (Tanikawa i sur. 2017).

Istraživanjem na transgeničnim miševima koji eksprimiraju faktor rasta PDGF-AA u hepatocitima, Thieringer i sur. (2008) su pokazali utjecaj ekspresije faktora rasta PDGF-AA na spontani nastanak fibroze jetre primjenjujući Northern blot analizu, ELISA test, histološke metode i imunohistokemiju. Bojanjem tkiva jetre transgeničnih i miševa divljeg tipa hematoksilin-eozinom te pikro sirius crvenom bojom dokazano je povećano taloženje kolagena kao i aktivacija mezenhimalnih stanica, te povećani udio područja zahvaćenog fibrozom. Bojanjem za α -SMA dokazana je prisutnost aktiviranih stanica HSC u sinusoidima jetre transgeničnih miševa. U transgeničnim je miševima pokazana i povećana ekspresija mRNA prokolagena III i povećana koncentracija citokina TGF- β 1 (Thieringer i sur. 2008). Uz to, Thieringer i sur. (2008) su zaključili da faktor rasta PDGF-AA svojim djelovanjem utječe na povećanje ekspresije citokina TGF- β 1 i aktivacije signalnog puta tog faktora rasta što dovodi do aktivacije stanica HSC i nastanka fibroze. U ovom istraživanju dokazana je značajna korelacija između procijenjenog vremena trajanja zaraze virusom HCV te koncentracije faktora rasta PDGF-AA u serumu.

Kim i sur. (2009) istražili su učinak lipopolisaharida na ekspresiju receptora i izoformi faktora rasta PDGF u uzgojenim fibroblastima (CBDF) i normalnim holangiocitima (NRC) žučovoda štakora u svrhu analize moguće povezanosti fibroze žučovoda s aktivacijom receptora PDGFR. Western blot analizom odredili su proteinsku ekspresiju receptora PDGFR- α i PDGFR- β , ELISA testom su odredili proteinsku ekspresiju faktora rasta PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, dok su koncentracije mRNA za izoforme faktora rasta PDGF odredili lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Nakon stimulacije lipopolisaharidom statistički značajno se povećala ekspresija mRNA faktora rasta PDGF-A u stanicama CBDF, dok se u stanicama NRC ekspresija mRNA faktora rasta PDGF-A povećala s povećanjem doze primijenjenog lipopolisaharida. Međutim, nije dokazano povećano lučenje faktora rasta PDGF-AA pod utjecajem stimulacije lipopolisaharidom (Kim i sur. 2009).

Borkham-Kamphorst i sur. (2008) istraživali su ekspresiju izoformi faktora rasta i njihovih receptora u kroničnoj ozljedi jetre uzrokovanoj dugotrajnim ponavljajućim dozama ugljikovog tetraklorida (CCl₄). Tijekom primjene ovog spoja otkrivena je povećana ekspresija svih izoformi faktora rasta PDGF i receptora PDGFR, posebice u četvrtom tjednu stimulacije te postepeno smanjenje ekspresije do bazalne razine. Imunoblot analizom dokazana je povećana ekspresija faktora rasta PDGF-A u izoliranim hepatocitima štakora tretiranih s CCl₄. Ekspresija mRNA značajno je bila povećana tijekom prva četiri tjedna stimulacije.

Imunohistokemijskim metodama faktor rasta PDGF-A je dokazan u regenerativnim hepatocitima, perifernom području nekrosteatoze i u epitelu žučovoda. Povećana ekspresija faktora rasta PDGF-A bila je značajno povezana s statusom nekrosteatozene ozlijede jetre, ali ne i sa stupnjem fibroze. Hepatociti uzgojeni u staničnoj kulturi stvarali su faktor rasta PDGF-A te intenzivno proliferirali pod utjecajem ovog faktora rasta. Autori su pretpostavili da je koncentracija faktora rasta PDGF-A i ekspresija receptora PDGFR u hepatocitima povezana s incijacijskom fazom regeneracije hepatocita i sprječavanja njihove apoptoze (Borkham-Kaphorst i sur. 2008).

Breitkopf i sur. (2005) analizirali su ekspresiju faktora rasta PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D i receptora PDGFR- α i PDGFR- β u jetri. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se ekspresija mRNA faktora rasta PDGF-A prilikom transdiferencije stanica HSC u stanice nalik miofibroblastima značajnije ne mijenja, uz iznimku 50% smanjena između prvog i drugog dana kultivacije. Stimulacija stanica HSC s faktorom rasta PDGF-BB pokazala je povećanje transkripcije gena za faktor rasta PDGF-A za čak 90% tijekom osmog dana kultivacije. Osim toga, ekspresija mRNA za faktor rasta PDGF-AA i citokin TGF- β 1 značajno se povećala trećeg dana kultivacije. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajne promjene u obrascu ekspresije gena za izoforme faktora rasta PDGF tijekom kultivacije stanica HSC *in vitro*. (Breitkopf i sur. 2005).

Biopsija jetre je dugi niz godina bila rutinska metoda u dijagnostici i određivanju stupnja fibroze jetre. Međutim, zbog invazivnosti ove pretrage i potencijalnih komplikacija, razvijene su ne-invazivne metode poput fibroelastografije i drugi biljezi oštećenja jetre (Chin 2016). U ovom je istraživanju analizirana korelacija između koncentracije faktora rasta PDGF-AA te drugih parametara značajnih za fiziologiju jetre poput AST, ALT, GGT, bilirubina, kolesterola, triglicerida, kolesterola HDL, kolesterola LDL, albumina te omjera AST/ALT. Dokazana je statistički značajna povezanost između LMS i jetrenih enzima (ALT, GGT, omjer AST/ALT i bilirubin) te negativna korelacija između LMS te kolesterola, albumina i kolesterola LDL.

Stiko-Rahm i sur. (1992) istražili su utjecaj nativnog i oksidiziranog kolesterola LDL na sintezu faktora rasta PDGF-AA i receptora PDGFR- α u stanicama glatkog mišićja arterija (SMC, engl. *smooth muscle cells*). Aktivacija stanica SMC potiče njihovu migraciju iz medije u intimu arterije, stanične proliferacije, stvaranja fibroznih lezija i izvanstaničnog matriksa. Rezultati tog istraživanja također su pokazali kako nativni i oksidizirani kolesterol LDL potiču ekspresiju faktora rasta PDGF-AA u uzgojenim stanicama SMC te ekspresiju receptora PDGFR- α i PDGFR- β što uzrokuje povećanu osjetljivosti na faktore rasta PDGF-AA i PDGF-

BB. Istraživanje je pokazalo da je faktor rasta PDGF-AA slabiji mitogen za stanice SMC u odnosu na faktor rasta PDGF-BB, a pretpostavlja se da kolesterol LDL djeluje pomoću autokrine ili parakrine aktivacije PDGF petlje (Stiko-Rahm 1992). U našem istraživanju primjećena je statistički značajna povezanost između koncentracije kolesterola LDL i faktora rasta PDGF-AA što bi moglo biti povezano s utjecajem kolesterola LDL na ekspresiju faktora rasta PDGF-AA.

Lundbo i sur. (2014) u svojem su istraživanju analizirali 369 osoba ispitanika s kroničnim hepatitisom C. Stupanj tvrdoće jetre određen je tranzijetnom elastografijom a određeni su genotip virusa HCV, viremija te polimorfizam promotorske regije gena za IL-28B. Dob ispitanika, ALT i infekcija genotipom 3 virusa HCV bili su povezani sa stadijem fibroze te povećanim LMS, dok spol, rasa, način zaraze, viremija i polimorfizam promotora gena za IL-28B nisu bili povezani s fibrozom (Lundbo i sur. 2014). U našem istraživanju primjećena je statistički značajna povezanost LMS s ALT i dobi ispitanika, dok povezanost s viremijom i trajanjem infekcije nisu bile statistički značajne.

Ghadir i sur. (2010) istražili su povezanost lipidnih profila (ukupnih lipida, kolesterola LDL, kolesterola HDL, kolesterola i triglicerida) s opsegom oštećenja jetre. Koristili su skupinu od 50 osoba s cirozom i 50 kontrolnih zdravih osoba jednake dobi i spola. Koncentracije serumskog kolesterola HDL, kolesterola LDL, triglicerida i kolesterola su bile značajno snižene u osoba s cirozom, a dokazana je i pozitivna korelacija između opsega oštećenja jetre i smanjenja koncentracije kolesterola HDL, kolesterola LDL i ukupnog kolesterola (ali ne i triglicerida) u serumu (Ghadir i sur. 2010).

Miyazaki i sur (2011) također su potvrdili povezanost zaraze virusom HCV sa smanjenom koncentracijom lipida u serumu u vrlo opsežnom istraživanju u koje su uključili čak 1317 osoba zaraženih virusom HCV. Koncentraciju lipida svrstali su u tri kategorije: hipolipidemija, normalna koncentracija lipida i hiperlipidemija, ovisno o referentnim vrijednostima. U osoba zaraženim virusom HCV koncentracija lipida (ukupnog kolesterola, kolesterola HDL, kolesterola LDL i triglicerida) u serumu bila je značajno snižena u odnosu na referentne vrijednosti (Miyazaki i sur. 2011).

Corey i sur. (2015) su objavili rezultate istraživanja u kojem su analizirali koncentraciju lipida u osoba zaraženih virusom HCV u odnosu na referentne vrijednosti te istražili učinak eliminacije virusa HCV na koncentraciju lipida. U prvom dijelu istraživanja analizirali su koncentraciju lipida u 2212 ispitanika s kroničnim hepatitisom C bez znakova ciroze te, kao kontrolnu skupinu, 180 ispitanika koji nisu bili zaraženi virusom HCV (s identičnom raspodjelom po dobi). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je koncentracija kolesterola i kolesterola LDL u osoba zaraženih virusom HCV bila statistički značajno snižena u usporedbi

s kontrolnom skupinom. Također, primjetili su da koncentracije kolesterola HDL i triglicerida u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu osoba zaraženih virusom HCV nisu bile statistički značajno promijenjene (Corey i sur. 2015).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na ekspresiju PDGF-AA u kroničnoj infekciji virusom HCV te moguću ulogu ovog faktora rasta u imunopatogenezi fibroze tijekom kroničnih virusnih infekcija. Buduća istraživanja trebala bi obuhvatiti i analizu ekspresije mRNA faktora rasta PDGF-AA te uključiti ispitanike s blagim stupnjem fibroze jetre (F1) kako bi se utvrdila njegova uloga u vrlo ranoj fazi fibroze. Uz to, istraživanje bi trebalo obuhvatiti analizu drugih izoformi faktora rasta PDGF, poput faktore rasta PDGF-BB i PDGF-AB.

6 ZAKLJUČAK

- 1) Faktor rasta PDGF-AA je eksprimiran u serumu zdravih kontrola i osoba zaraženih virusom HCV.
- 2) Koncentracije faktora rasta PDGF-AA u serumu osoba zaraženih virusom HCV značajno su snižene usporedbi sa zdravim kontrolama.
- 3) Koncentracija faktora rasta PDGF-AA značajno je snižena u osoba zaraženih virusom HCV s nižim stupnjem fibroze (F0/F1) u usporedbi sa zdravim kontrolama.
- 4) Nije dokazana povezanost ekspresije PDGF-AA i stupnja tvrdoće jetre.
- 5) Koncentracija faktora rasta PDGF-AA značajno korelira s koncentracijom triglicerida, albumina i kolesterola LDL.
- 6) Otkrivena je pozitivna korelacija između tvrdoće jetre i koncentracije AST, ALT, GGT i bilirubina.
- 7) Utvrđena je negativna korelacija između tvrdoće jetre i koncentracije kolesterola, albumina te kolesterola LDL.

7 LITERATURA

Adams R. L., Pirakitikulr N., Pyle A.M. (2017): Functional RNA structures throughout the Hepatitis C Virus genome. *Curr Opin Virol.* **24**: 79-86.

Ahlenstiel G. (2013): The Natural Killer Cell Response to HCV Infection. *Immune Network* **13(5)**: 168–176.

Aloe L. (2004): Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biol.* **14(7)**: 395-399.

Andrae J., Gallini R., Betsholtz C. (2008): Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* **22(10)**: 1276–1312.

Atoom A. M., Taylor N. G., Russell R. S. (2014): The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. *Virology* **462**: 377-387.

Baharuddin A., Amir Hassan A., Chye Sheng G., Bakhtiar Nasir S., Othman S., Yusof R., Othman R., Abdul Rahman N. (2014): Current approaches in antiviral drug discovery against the Flaviviridae family. *Current pharmaceutical design* **20(21)**: 3428-3444.

Bai Y., Zhou K., Doudna J. A. (2013): Hepatitis C virus 3'UTR regulates viral translation through direct interactions with the host translation machinery. *Nucleic Acids Research* **41(16)**: 7861–7874.

Battaller R., Paik Y. H., Lindquist J. N., Lemasters J. J., Brenner D. A. (2004): Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **126**: 529–540.

Bennett N. T., Schultz G. S., (1993): Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *The American Journal of Surgery* **165(6)**: 728–737.

Bergsten E., Uutela M., Li X., Pietras K., Östman A., Heldin C.H., Alitalo K., Eriksson U. (2001): PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF β -receptor. *Nature cell biology* **3(5)**: 512.

Blackard J. T., Shata M. T., Shire N. J., Sherman K. E. (2008): Acute Hepatitis C Virus Infection: A Chronic Problem. *Hepatology* **47(1)**: 321–331.

Blanchard E., Belouzard S., Goueslain L., Wakita T., Dubuisson J., Wychowski C., Rouillé Y. (2006): Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology* **80(14)**: 6964–6972.

Bonner J. C. (2004): Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15(4)**: 255–273.

Borkham-Kamphorst E., Kovalenko E., Van Roeyen C. R., Gassler N., Bomble M., Ostendorf T., Floege J., Gressner A. M., Weiskirchen, R. (2008): Platelet-derived growth factor isoform

expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. Laboratory investigation **88(10)**: 1090.

Borkham-Kamphorst E., Weiskirchen R. (2015): The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. Cytokine & Growth Factor Reviews **28**: 53-61

Bowen D. G., Walker C. M. (2005): Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. Nature **436(7053)**: 946.

Breitkopf K., Roeyen C. V., Sawitza I., Wickert L., Floege J., Gressner A. M. (2005): Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). Cytokine **31**: 349–357.

Campbell J. S., Hughes S. D., Gilbertson D. G., Palmer T. E., Holdren M. S., Haran A. C., Odell M. M., Bauer R. L., Ren H. P., Haugen H. S., Yeh M. M. (2005): Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102(9)**: 3389-3394.

Chen P. H., Chen X., He X. (2013): Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives. Biochimica et Biophysica Acta **1834(10)**: 2176–2186.

Chin J. L., Pavlides M., Moolla A. Ryan J. D. (2016): Non-invasive Markers of Liver Fibrosis: Adjuncts or Alternatives to Liver Biopsy? Frontiers in Pharmacology. **7**: 159.

Choi M., Lee S., Choi T., Lee C. (2013): A hepatitis C virus NS4B inhibitor suppresses viral genome replication by disrupting NS4B's dimerization/multimerization as well as its interaction with NS5A. Virus genes **47(3)**: 395-407.

Choo Q. L., Kuo G., Weiner A. J., Overby L. R., Bradley D. W., Houghton M. (1989): Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science **244**: 359–362

Cobas Ampliprep/COBAS TaqMan System
https://www.cobas.be/home/product/molecular-diagnostics/COBAS_AmpliPrep_COBAS_TaqMan_System.html

Corey K. E., Kane E., Munroe C., Barlow L. L., Zheng H., Chung R. T. (2009): Hepatitis C Virus Infection and Its Clearance Alter Circulating Lipids: Implications for Long Term Follow-up. Hepatology **50(4)**: 1030–1037.

Dabral P., Khera L., Kaul R. (2014): Host proteins associated with Hepatitis C virus encoded NS4A. Virusdisease **25(4)**: 493–496.

De Beeck A. O., Voisset C., Bartosch B., Ciczora Y., Cocquerel L., Keck Z., Fountg S., Cosset F. L., Dubuisson J. (2004): Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. Journal of virology **78(6)**: 2994-3002.

Doolittle R. F., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Devare S. G., Robbins K. C., Aaronson S. A., Antoniades H. N. (1983): Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science **221**: 275–277.

Egger D., Wölk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H. E., Moradpour D., Bienz K. (2002): Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology* **76(12)**: 5974–5984.

Fahey S., Dempsey E., Long A. (2014): The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cellular and Molecular Immunology* **11(1)**: 25–40.

Farquhar M. J., Hu K., Harris H. J., Davis C., Brimacombe C. L., Fletcher S. J., Baumert T. F., Rappoport J. Z., Balfe P., McKeating J. A. (2012): Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *Journal of virology* **86(8)**: 4305–4316.

Fénéant L., Levy S., Cocquerel L. (2014): CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses* **6(2)**: 535–572.

Fredriksson L., Li H., Eriksson U. (2004) The PDGF family: Four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**: 197–204.

Friebe P., Bartenschlager R. (2002): Genetic Analysis of Sequences in the 3' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus That Are Important for RNA Replication. *Journal of Virology* **76(11)**: 5326–5338.

Gaengel K., Genove G., Armulik A., Betsholtz C. (2009): Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**: 630–638.

Gastaminza P., Dryden K. A., Boyd B., Wood M. R., Law M., Yeager M., Chisari F. V. (2010): Ultrastructural and Biophysical Characterization of Hepatitis C Virus Particles Produced in Cell Culture. *Journal of Virology* **84(21)**: 10999–11009.

Gawlik K., Gallay P. A. (2014): HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. *Immunologic research* **60(1)**: 1–10.

Ghadir M. R., Riahin A. A., Havaspour A., Nooranipour M., Habibinejad A. A. (2010): The relationship between lipid profile and severity of liver damage in cirrhotic patients. *Hepatitis Monthly* **10(4)**: 285–288.

Gilbertson D. G., Duff M. E., West J. W., Kelly J. D., Sheppard P. O., Hofstrand P. D., Gao Z., Shoemaker K., Bukowski T. R., Moore M., Feldhaus A. L. (2001): Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF α and β receptor. *Journal of Biological Chemistry* **276(29)**: 27406–27414.

Hayes B. J., Riehle K. J., Shimizu-Albergine M., Bauer R. L., Hudkins K. L., Johansson F., Yeh M. M., Mahoney Jr W. M., Yeung R. S., Campbell J. S. (2014): Activation of platelet-derived growth factor receptor alpha contributes to liver fibrosis. *PloS one* **9(3)**: e92925.

Heldin C. H., Westermark B. (1999): Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews* **79(4)**: 1283–1316.

Helle F., Vieyres G., Elkrif L., Popescu C. I., Wychowski C., Descamps V., Castelain S., Roingeard P., Duverlie G., Dubuisson J. (2010): Role of N-linked glycans in the functions of

hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *Journal of virology* **84(22)**: 11905-11915.

Hoffman B., Liu Q. (2011): Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver International* **31**: 1449–1467.

International Committee for Taxonomy of Viruses

https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification

(pristupljeno 15.02.2018.)

Kazlauskas A. (2017): PDGFs and their receptors. *Gene* **614**: 1-7.

Kim T. H., Moon J. H., Savard C. E., Kuver R., Lee S. P. (2009): Effects of lipopolysaccharide on platelet-derived growth factor isoform and receptor expression in cultured rat common bile duct fibroblasts and cholangiocytes. *J Gastroenterol Hepatol* **24(7)**: 1218–1225.

Li Q., Zhang Y. Y., Chiu S., Hu Z., Lan K. H., Cha H., Sodroski C., Zhang F., Hsu C. S., Thomas E., Liang T. J. (2014): Integrative functional genomics of hepatitis C virus infection identifies host dependencies in complete viral replication cycle. *PLoS pathogens*, **10(5)**: e1004163.

Li X., Pontén A., Aase K., Karlsson L., Abramsson A., Uutela M., Backstrom G., Hellstrom M., Bostrom H., Li H., Soriano P., Betsholtz C., Heldin C. H., Alitalo K., Ostman A., Eriksson U. (2000): PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* **2**: 302–309.

Li X., Eriksson U. (2003): Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**: 91–98

Lindberg N., Holland E. C. (2012): PDGF in gliomas: more than just a growth factor? *Upsala Journal of Medical Sciences* **117(2)**: 92–98.

Lindenbach B. D., Rice C. M. (2013): The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews. Microbiology* **11(10)**: 688–700.

Lorenz I. C. (2010): The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2 (NS2): An Up-and-Coming Antiviral Drug Target. *Viruses* **2(8)**: 1635–1646.

Luna J. M., Scheel T. K., Danino T., Shaw K. S., Mele A., Fak J. J., Nishiuchi E., Takacs C. N., Catanese M. T., de Jong Y. P., Jacobson I. M. (2015): Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell* **160(6)**: 1099-1110.

Lundbo L. F., Clausen L. N., Weis N., Schønning K., Rosenørn L., Benfield T., Christensen P. B. (2014): Influence of Hepatitis C Virus and IL28B Genotypes on Liver Stiffness. *PLoS ONE* **9(12)**: e115882

Maaroufi A., Vince A., Himatt S. M., Mohamed R., Fung J., Opare-Sem O., Workneh, A., Njouom, R., Abdulla M., Kaliaskarova K. S., Owusu-Ofori S., (2017): Historical epidemiology of hepatitis C virus in select countries—volume 4. *Journal of viral hepatitis* **24(S2)**: 8-24.

Marascio N., Torti C., Liberto M. C., Focà A. (2014): Update on different aspects of HCV variability: focus on NS5B polymerase. *BMC Infectious Diseases*, **14**(5): S1.

McGivern D. R., Masaki T., Lovell W., Hamlett C., Saalau-Bethell S., Graham B. (2015): Protease Inhibitors Block Multiple Functions of the NS3/4A Protease-Helicase during the Hepatitis C Virus Life Cycle. *Journal of Virology* **89**(10): 5362–5370.

Miyazaki T., Honda A., Ikegami T., Saitoh Y., Hirayama T., Hara T. (2004): Hepatitis C virus infection causes hypolipidemia regardless of hepatic damage or nutritional state: An epidemiological survey of a large Japanese cohort. *Hepatol Res.* **41**: 530–541.

Mohd Hanafiah K., Groeger J., Flaxman A. D., Wiersma S. T. (2013): Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* **57**: 1333–1342.

Murphy K., Travers P., Walport M. (2012): *Janeway's immunobiology*, Garland Science, New York

Neufeldt C. J., Joyce M. A., Van Buuren N., Levin A., Kirkegaard K., Gale Jr M., Tyrrell D. L. J., Wozniak R. W. (2016): The hepatitis C virus-induced membranous web and associated nuclear transport machinery limit access of pattern recognition receptors to viral replication sites. *PLoS pathogens* **12**(2): e1005428.

Nouroz F., Shaheen S., Mujtaba G., Noreen S. (2015): An overview on hepatitis C virus genotypes and its control. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* **16**(4): 291-298.

Nunez O., Fernandez-Martinez A., Majano P. L., Apolinario A., Gomez-Gonzalo M., Benedicto I., Lopez-Cabrera M., Bosca L., Clemente G., Garcia-Monzon C., Martin-Sanz P. (2004): Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* **53**(11): 1665-1672.

Pawlotsky J. M., (2004): Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in microbiology* **12**(2): 96-102.

Pennock S., Haddock L. J., Mukai S., Kazlauskas A. (2014): Vascular Endothelial Growth Factor Acts Primarily via Platelet-Derived Growth Factor Receptor α to Promote Proliferative Vitreoretinopathy. *The American Journal of Pathology*, **184**(11): 3052–3068.

Petrovic D., Dempsey E., Doherty D. G., Kelleher D., Long A. (2012): Hepatitis C virus – T-cell responses and viral escape mutations. *Eur. J. Immunol.* **42**: 17–26.

Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. (2016): Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology*, **22**(34): 7824–7840.

Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cacciapuoti C. (2016): Hepatitis C virus (HCV) genotypes distribution: an epidemiological up-date in Europe. *Infectious Agents and Cancer* **11**(1): 53.

Pierce G. F., Tarpley J. E., Tseng J., Bready J., Chang D., Kenney W. C., Rudolph R., Robson M. C., Berg J. V., Reid P. (1995): Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *The Journal of clinical investigation* **96**(3): 1336-1350.

Popescu C. I., Callens N., Trinel D., Roingeard P., Moradpour D., Descamps V., Duverlie G., Penin F., Héliot L., Rouillé Y., Dubuisson J. (2011): NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS pathogens* **7**(2): e1001278.

Racanelli V., Rehmann B. (2003): Hepatitis C virus infection: When silence is deception. *Trends in Immunology* **24**(8): 456–464.

Raney K. D., Sharma S. D., Moustafa I. M., Cameron C. E. (2010): Hepatitis C Virus Non-structural Protein 3 (HCV NS3): A Multifunctional Antiviral Target. *The Journal of Biological Chemistry* **285**(30): 22725–22731.

Sebastiani G., Gkouvatsos K., Pantopoulos K. (2014): Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* **20**(32): 11033-11053.

Siegfried G., Basak A., Prichett-Pejic W., Scamuffa N., Ma L., Benjannet S., Veinot J. P., Calvo F., Seidah N., Khatib A. M. (2005): Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* **24**: 6925–6935.

Smith D. B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A. S., Rice C. M., Stapleton J. T., Simmonds P. (2014): Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. *Hepatology* **59**(1): 318–327.

Steinmann E., Doerrbecker J., Friesland M., Riebesehl N., Ginkel C., Hillung J., Gentzsch J., Lauber C., Brown R., Frentzen A., Pietschmann T. (2013) Characterization of hepatitis C virus intra-and intergenotypic chimeras reveals a role of the glycoproteins in virus envelopment. *Journal of virology* **87**(24): 13297-13306.

Stiko-Rahm A., Hultgardh-Nilsson A., Regnstrom J., Hamsten A., Nilsson J. (1992): Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and Thrombosis* **12**(9): 1099–1109.

Sung P. S., Racanelli V., Shin, E. C. (2014): CD8+ T-Cell Responses in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Frontiers in Immunology* **5**: 266.

Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Tanaka K., Shimoike T., Moriishi K., Iwasaki T., Mizumoto K., Matsuura Y., Miyamura T. (2005): Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *Journal of virology* **79**(2): 1271-1281.

Svjetska zdravstvena organizacija, Global hepatitis report
<http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>
(pristupljeno 15.02.2018.)

- Tanikawa A. A., Grotto R. M. T., Silva G. F., Ferrasi A. C., Sarnighausen V. C. R., Pardini M. I. D. M. C. (2017): Platelet-derived growth factor A mRNA in platelets is associated with the degree of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **50(1)**: 113-116.
- Tellinghuisen T. L., Foss K. L., Treadaway J. (2008): Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathogens* **4(3)**: e1000032.
- Tews B. A., Popescu C. I., Dubuisson J. (2010): Last Stop Before Exit – Hepatitis C Assembly and Release as Antiviral Drug Targets. *Viruses* **2(8)**: 1782–1803.
- Thieringer F., Maass T., Czochra P., Klopčič B., Conrad I., Friebe D., Schirmacher P., Lohse A. W., Blessing M., Galle P. R., Teufel A. (2008): Spontaneous hepatic fibrosis in transgenic mice overexpressing PDGF-A. *Gene* **423(1)**: 23-28.
- Thomas H. C., Lok A.S. F., Locarnini S. A., Zuckerman A. J. (2013): *Viral Hepatitis*. John Wiley & Sons, Hoboken
- Vieyres G., Thomas X., Descamps V., Duverlie G., Patel A. H., Dubuisson, J. (2010): Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **84(19)**: 10159–10168.
- Wozniak A. L., Griffin S., Rowlands D., Harris M., Yi M., Lemon S. M., Weinman S. A. (2010): Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. *PLoS Pathogens* **6(9)**: e1001087.
- Wynn T. A., Ramalingam T. R. (2012): Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine* **18(7)**: 1028–1040.
- Ying H. Z., Chen Q., Zhang W. Y., Zhang H. H., Ma Y., Zhang S. Z., Fang J., Yu C. H. (2017) PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics. *Molecular medicine reports* **16(6)**: 7879-7889.
- Yoon J. C., Yang C. M., Song Y., Lee J. M. (2016): Natural killer cells in hepatitis C: Current progress. *World Journal of Gastroenterology* **22(4)**: 1449–1460.

8 ŽIVOTOPIS

Datum rođenja 23.10.1992.

OBRAZOVANJE

2015. – 2018. **Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb**
diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul: Fiziologija i imunobiologija
2011. - 2015. **Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb**
- preddiplomski studij Biologije - sveučilišna prvostupnica biologije (univ.bacc.biol.)
- Završni seminar: “*Konvencionalni i biljni pročištači otpadnih voda – prednosti i nedostaci*”, mentor: izv.prof.dr.sc. Maria Špoljar
2009. - 2010. **Camden Hills Regional High School, Rockport, Maine, SAD**
2010. - 2011.
2007. - 2009. **V. gimnazija, Zagreb**

LABORATORIJSKA STRUČNA PRAKSA

- 04/2015. – 06/2015. Istraživačka grupa dr. sc. Krunoslava Brčić-Kostića, Laboratorij za evolucijsku genetiku, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
- voditelj: prof.dr.sc. Krunoslav Brčić-Kostić
- 03/2015. – 04/2015. Zoologijski zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
- voditelj: prof. dr. sc. Milorad Mrakovčić

STRANI JEZICI

Engleski jezik C1

Francuski jezik A1

NAGRADE, PRIZNANJA

posebna Rektorova nagrada za sudjelovanje u manifestaciji „Noć Biologije“

DODATNE INFORMACIJE

sudjelovanje u manifestaciji “Noć biologije” i Smotra sveučilišta

Studentski predstavnik u Vijeću prirodoslovnog područja Sveučilišta u Zagrebu