

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

NIKOLA S. KOKANOV

**Epigenetičke promene kao
potencijalni biomarkeri u
bolestima jetre indukovanim
hroničnom infekcijom virusom
hepatitisa C genotipa 1b**

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

NIKOLA S. KOKANOV

**Epigenetic changes as potential
biomarkers in liver diseases
induced by chronic hepatitis C
virus genotype 1b infection**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Mentori:

dr Milena Krajnović, viši naučni saradnik Univerziteta u Beogradu - Institut za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Jovan Pešović, docent Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta

Članovi komisije:

dr Snežana Jovanović-Ćupić, viši naučni saradnik Univerziteta u Beogradu - Institut za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Goran Brajušković, redovni profesor Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta

dr Marina Šiljić, viši naučni saradnik Univerziteta u Beogradu - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Univerziteta u Beogradu - Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, u okviru teme „Molekularne determinante za dizajn tumor markera“, pod neposrednim rukovodstvom dr Milene Krajnović, višeg naučnog saradnika. Doktorska disertacija rezultat je saradnje Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku i Univerziteta u Beogradu - Medicinskog fakulteta - Instituta za mikrobiologiju i imunologiju.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru dr Mileni Krajnović, koja je bila uz mene još u prvim koracima mog eksperimentalnog i naučnog rada, kao i tokom celog procesa izrade i pisanja disertacije. Zahvaljujem joj se na nesebičnoj podršci, razumevanju i stručnim i prijateljskim savetima koje mi je pružila u svakom trenutku ovog procesa. Bez nje ova disertacija ne bi bila moguća.

Doc. dr Jovanu Pešoviću, mentoru sa fakulteta, zahvaljujem se na razumevanju i korektnom odnosu prilikom izrade teze.

Veliku zahvalnost dugujem članu komisije dr Snežani Jovanović-Čupić koja mi je pružila neizmernu podršku, razumevanje, podstrek i brojne savete tokom eksperimentalnog rada i pisanja ove disertacije. Zahvaljujem joj se što je bila uz mene tokom svakog koraka izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Goranu Brajuškoviću, članu komisije, na podršci, korektnom odnosu i korisnim savetima tokom mojih studija i izrade teze.

Zahvaljujem se članu komisije dr Dušanki Savić-Pavićević na razumevanju i brojnim korisnim savetima tokom studija i izrade ove teze.

Članu komisije, dr Marini Šiljić se zahvaljujem na korisnim sugestijama i saradnji prilikom sekvenciranja uzoraka.

Zahvaljujem se svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na podršci i prijateljskoj atmosferi. Pre svega se zahvaljujem koleginici dr Bojani Kožik koja me je uvela u eksperimentalni rad, pružala podršku i koja mi je pomogla oko statističke obrade rezultata, zatim kolegicama dr Vesni Mandušić i dr Ani Božović na svakodnevnoj podršci. Zahvaljujem se kolegicama Kristini Mitrović, Nataši Mačak Stefanović, dr Milici Janković, dr Harisi Ferizović, Tijani Tomić i Nejli Ademović, kao i kolegi dr Milanu Stefanoviću na svakodnevnoj podršci, nesebičnoj pomoći i prijateljskim savetima.

Pre svega zahvaljujem se mojoj porodici koja je nesebično i bez zadržke sve vreme bila uz mene i pružala mi bezgraničnu podršku i ljubav. Bez vas ova doktorska disertacija ne bi bila moguća.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem tati Stevanu, znam da bi bio ponosan.

Epigenetičke promene kao potencijalni biomarkeri u bolestima jetre indukovanim hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

Sažetak

Hronična infekcija virusom hepatitisa C dovodi do fibroze jetre, a potencijalno i do ciroze i hepatocelularnog karcinoma. Prevencija komplikacija bolesti se zasniva na antivirusnoj terapiji i ranoj dijagnozi. Stoga smo analizirali uticaj faktora domaćina i virusa na progresiju bolesti i odgovor na terapiju pegilovanim interferonom/ribavirinom (PEG-IFN/RBV) kod ispitanika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b. Primenom PCR metode specifične za metilaciju (MSP) je ispitivan metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, polimorfizam rs12979860 gena *IL28B* je određen esejom TaqMan, dok je automatskim sekvenciranjem analiziran mutacioni status virusnog gena *C* u uzorcima plazme ispitanika. Pojedinačno gledano, metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, kao i amino-kiselinske izmene proteina C nisu se pokazali kao značajan biomarker odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV i progresije bolesti. Međutim, njihova istovremena analiza sa genotipom gena *IL28B* je pokazala da je istovremena metilacija gena *RASSF1A*, odnosno gena *p16INK4a* i prisustvo genotipa CC gena *IL28B* povezana sa postizanjem stabilnog virusološkog odgovora (SVO). Takođe je utvrđeno da je istovremeno prisustvo amino-kiselinske izmene na poziciji 75 proteina C i genotipova CT/TT gena *IL28B* povezano sa izostankom odgovora na terapiju (BO) PEG-IFN/RBV, odnosno da je istovremeno prisustvo amino-kiselinske izmene na poziciji 91 proteina C i genotipa CC gena *IL28B* povezano sa postizanjem SVO. Dobijeni rezultati sugerišu da kombinovana analiza metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, polimorfizma rs1297860 gena *IL28B* domaćina i amino-kiselinskih izmena proteina C virusa može pomoći u predviđanju odgovora na kombinovanu terapiju.

Cljučne reči: hepatitis C virus; metilacija DNK; *RASSF1A*; *p16INK4a*; *IL28B*; protein C; odgovor na terapiju; progresija bolesti

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

Epigenetic changes as potential biomarkers in liver diseases induced by chronic hepatitis C virus genotype 1b infection

Abstract

Chronic hepatitis C virus infection leads to liver fibrosis, and potentially to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Prevention of disease complications is based on antiviral therapy and early diagnosis. Therefore, we analyzed the influence of host and virus factors on disease progression and response to pegylated interferon/ribavirin (PEG-IFN/RBV) therapy in subjects with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection. The methylation status of the *RASSF1A* and *p16INK4a* genes was investigated using the methylation-specific PCR method (MSP), the rs12979860 polymorphism of the *IL28B* gene was determined by the TaqMan assay, while the mutational status of the viral *C* gene in the plasma samples of the subjects was analyzed by automatic sequencing. Individually examined, methylation status of *RASSF1A* and *p16INK4a* genes, as well as amino-acid changes of protein C were not significant biomarkers of response to PEG-IFN/RBV therapy and disease progression. However, their simultaneous analysis with *IL28B* gene genotype showed that concomitant methylation of *RASSF1A* gene, as well as *p16INK4a* gene and the presence of *IL28B* genotype CC associated with sustained virological response (SVR). It was also determined that the simultaneous presence of an amino-acid substitutions at position 75 of protein C and CT/TT genotypes of the *IL28B* gene is associated with a lack of response to PEG-IFN/RBV therapy, and that the simultaneous presence of an amino-acid substitutions at position 91 of protein C and genotype CC of the *IL28B* gene associated with achieving SVR. The obtained results suggest that the combined analysis of the methylation status of the *RASSF1A* and *p16INK4a* genes, the rs12979860 polymorphism of the *IL28B* gene and the amino-acid changes of protein C can help predict the response to combined therapy.

Keywords: hepatitis C virus; DNA methylation; *RASSF1A*; *p16INK4a*; *IL28B*; protein C; response to therapy; disease progression

Scientific field: Biology

Special topic: Biochemistry and Molecular Biology

SKRAĆENICE

- 5mC**, 5-metil citozin (eng. *5-methyl Cytosine*, *5mC*)
- AFP**, alfa fetoprotein (eng. *Alpha Fetoprotein*, *AFP*)
- ALT**, alanin aminotransferaze (eng. *Alanine Aminotransferase*, *ALT*)
- AP1**, aktivirajući protein 1 (eng. *Activating Protein-1*, *AP1*)
- APC**, adenomatozna polipoza koli (eng. *Adenomatous Polyposis Coli*, *APC*)
- AST**, aspartat aminotransferaze (eng. *Aspartate Aminotransferase*, *AST*)
- BAX**, BCL2 asociran X regulator apoptoze (eng. *BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*, *BAX*)
- Bcl-2**, B-ćelijski limfom 2 (eng. *B-Cell CLL/Lymphoma 2*, *BCL2*)
- BCL-xL**, ekstra veliki protein limfoma B ćelija (eng. *B-cell Lymphoma-extra Large Protein*, *BCL-xL*)
- BCORL1**, BCL6 sličan korepresor 1 (eng. *BCL6 Corepressor Like 1*, *BCORL1*)
- BMI indeks**, indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index*, *BMI*)
- BO**, bez virusološkog odgovora
- BSA**, albumin goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*, *BSA*)
- CDK**, ciklin-zavisna kinaza (eng. *Cyclin-Dependent Kinase*, *CDK*)
- CDKN2A**, inhibitor ciklin zavisne kinaze 2A (eng. *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*, *CDKN2A*)
- CpG**, citozin-pirofosfat-guanin (eng. *Cytosine-pyrophosphate-Guanine*, *CpG*)
- CSMD1**, protein 1 sa višestrukim CUB i Sushi domenima (eng. *CUB and Sushi Multiple Domains 1*, *CSMD1*)
- CTLA4**, citotoksični T limfocit antigen 4 (eng. *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*, *CTLA4*)
- DAA**, terapije koje ispoljavaju direktno antivirusno delovanje (eng. *Direct Acting Antivirals*, *DAA*)
- ddH₂O**, dejonizovana destilovana voda (eng. *deionized distilled water*, *ddH₂O*)
- DMSO**, dimetil sulfoksid (eng. *Dimethyl Sulfoxide*, *DMSO*)
- DNK**, dezoksiribonukleinska kiselina (eng. *Deoxyribonucleic Acid*, *DNA*)
- DNMT**, DNK-metiltransferaza (eng. *DNA-Methyltransferase*, *DNMT*)
- E2F**, familija transkripcionih regulatora kod viših eukariota (eng. *family of transcription factors in higher eukaryotes*, *E2F*)
- ECM**, ekstracelularni matriks (eng. *The Extracellular Matrix*, *ECM*)
- EDTA**, etilendiaminetetrasirćetna kiselina (eng. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*, *EDTA*)
- eEF1A2**, eukariotski translacioni elongacioni factor 1 alfa 2 (eng. *Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 2*, *eEF1A2*)
- EGFR**, receptor za epidermalni faktor rasta (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*, *EGFR*)
- EGLN3**, Homolog 3 EGL devet (eng. *EGL Nine Homolog 3*, *EGLN3*)
- EMT**, epitelno-mezenhimska tranzicija (eng. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, *EMT*)
- ER**, endoplazmatični retikulum (eng. *Endoplasmic Reticulum*, *ER*)
- EtOH**, etanol (eng. *Ethyl alcohol*, *EtOH*)
- ETR**, odgovor na kraju terapije (eng. *End therapy response*, *ETR*)
- GEFH1/ ARHGEF2**, Rho/Rac faktor razmene guanina 2 (eng. *Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2*, *ARHGEF2*)
- HBV**, virusom hepatitisa B (eng. *Hepatitis B Virus*, *HBV*)
- HCC**, hepatocelularni karcinom (eng. *Hepatocellular Carcinoma*, *HCC*)
- HCV**, virus hepatitisa C (eng. *Hepatitis C Virus*, *HCV*)
- HIV**, virusom humane imunodeficijencije (eng. *Human Immunodeficiency Virus*, *HIV*)
- HSC**, zvezdaste ćelije jetre (eng. *Hepatic Stellate Cells*, *HSC*)
- HTA**, terapeutici koji deluju na domaćina (eng. *Host-targeted agents*, *HTA*)
- IFN-λ**, interferon λ (eng. *Interferon Lambda*, *IFN-λ*)
- IL**, interleukin
- IL28B**, interleukun 28 B (eng. *interleukun 28 B*, *IL28B*)
- IMPDH**, inozin 5'-monofosfat dehidrogenaza (eng. *Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase*, *IMPDH*)
- INK4**, familija inhibitora ciklin-zavisne kinaze CDK4 (eng. *Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase*, *CDK4*)

IRES, unutrašnje mesto vezivanja ribozoma (eng. *Internal Ribosome Entry Site, IRES*)

IRF9 interferon regulatorni faktor 9 (eng. *Interferon Regulatory Factor 9, IRF9*)

IRRDR, region odgovoran za rezistenciju na IFN/RBV (eng. *IFN/RBV Resistance-Determining Region, IRRDR*)

ISDR, region osetljiv na interferon (eng. *Interferon Sensivity Determining Region, ISDR*)

ISG, interferonom stimulisani geni (eng. *IFN-Stimulated Genes, ISG*)

ISGF-3, IFN-stimulisani genski faktor 3 (eng. *Interferon-Stimulated Gene Factor 3, ISGF-3*)

IVDU, intravenska upotreba narkotika (eng. *Intravenous Drug Use, IVDU*)

JAK, tirozin kinaza (eng. *Janus Kinase, JAK*)

KRAS, podfamilija proteina RAS (eng. *Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog, KRAS*)

LATS1, supresor kinaza 1 velikih tumora (eng. *Large Tumor Suppressor Kinase 1, LATS1*)

LINE1, dugi ispresecani nuklearni element 1 (eng. *long interspersed nuclear element-1, LINE1*)

LMP, polipeptidi male molekulske mase (eng. *Low Molecular Mass Polypeptides, LMP*)

LOX, lisil oksidaza (eng. *Lysyl Oxidase, LOX*)

m, metilovan (eng. *methylated, m*)

MAP, polipoza asocirana sa genom *MUTYH* (eng. *MUTYH Associated Polyposis, MAP*)

MAPK, mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK*)

MAPs, proteini asocirani sa mikro tubulama (eng. *Microtubule-associated Proteins, MAPs*)

MBD, metil-CpG-vezujući domen (eng. *Methyl-CpG-binding Domain, MBD*)

MBL, manan-vezujući lektin (eng. *Mannan-Binding Lectin, MBL*)

MBP, metil-vezujući protein (eng. *Methyl Binding Protein, MBP*)

MDM2, mišji dupli minut 2 homolog (eng. *mouse double minute 2 homolog, MDM2*)

MGMT, O6-metilguanin-DNK-metiltransferaza (eng. *O6-methylguanine-DNA Methyltransferase, MGMT*)

miRNK, mikro RNK (eng. *Micro RNA, miRNA*)

MNĆ, mononuklearne ćelije (eng. *Mononuclear Cells*)

MOAP-1, modulator apoptoze 1 (eng. *Modulator of Apoptosis 1, MOAP-1*)

MRI, magnetna rezonancija (eng. *Magnetic Resonance Imaging, MRI*)

MSP, reakcija lančane polimeraze specifična za metilaciju (eng. *Methylation Specific Polymerase Chain Reaction, MSP*)

MST1, kinaza 1 koja stimuliše makrofage (eng. *Macrophage Stimulating Ikinase, MST1*)

mTOERC1, meta sisarskog rapamicin kompleksa 1 (eng. *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1, mTOERC1*)

MxA, protein A otpornosti na miksovirus (eng. *Myxovirus Resistance Protein A, MxA*)

NAT, sistematski test nukleinskih kiselina (eng. *Systematic Nucleic Acid Test, NAT*)

ND, podatak nije dostupan

NDR2/ STK38L, kinaza slična serin/treonin kinazi 38 (eng. *Serine/threonine Kinase 38 Like, STK38L*)

NF-κB, nuklearni factor kappa, pojačivač lakof lanca aktiviranih B ćelija (eng. *Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells, NF-κB*)

NS, nestrukturani protein hepatitisa tipa C (eng. *Nonstructural Protein, NS*)

OAS1, oligoadenilat sintetaza 1 (eng. *Oligoadenylate Synthetase 1, OAS1*)

ORF, otvoreni okvir čitanja (eng. *Open Reading Frame, ORF*)

PAA, poliakrilamid (eng. *Polyacrylamide, PAA*)

PCR, lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*)

PEG-IFN/RBV, pegilovanim interferonom i ribavirinom (eng. *Pegylated Interferon/Ribavirin, PEG-IFN/RBV*)

PPP2R5D, protein fosfataza 2 regulatorna subjedinica B'delta (eng. *Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B'delta, PPP2R5D*)

RAS, substitucija asocirana sa rezistencijom na određene DAA lekove (eng. *resistance-associated substitution, RAS*)

RASAL1, RAS-u sličan protein aktivator 1 (eng. *RAS Protein Activator Like 1, RASAL1*)

RASSF1A, član 1 familije proteina sa RAs asociranim domenom (eng. *Ras Association Domain Family Member 1, RASSF1A*)

Rb, retinoblastoma (eng. *Retinoblastoma, Rb*)

RNK, ribonukleinska kiselina (eng. *Ribonucleic Acid, RNA*)

ROS, reaktivne vrste kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species, ROS*)

RT-PCR, lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija (eng. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR*)

RUNX3, transkripcioni faktor 3 povezan sa runtom (eng. *Runt-related Transcription Factor 3, RUNX3*)

SAD, Sjedinjene Američke Države

SAM, S-adenozil-L-metionin (eng. *S-Adenosyl-L-Methionine, SAM*)

SFRP1, sekretovani protein 1 povezan sa kovrdžanjem (eng. *Secreted Frizzled-related Protein 1, SFRP1*)

SL, stablo-petlja (eng. *Stem-Loop, SL*)

Smurf1, faktor regulacije ubikvitinacije Smad-a 1 (eng. *Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1, Smurf1*)

SMYD3, protein 3 koji sadrži SET i MYND domene (eng. *SET and MYND Domain-Containing Protein 3, SMYD3*)

SNP, polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphism, SNP*)

SOCS, supresor signalizacije citokina (eng. *suppressor of cytokine signaling, SOCS*)

STAT, transkripcioni regulatorni proteini (eng. *The Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT*)

SVO, stabilni virusološki odgovor

TDG, timin-DNK glikozilaza (eng. *Thymine-DNA Glycosylase, TDG*)

TEMED, tetrametiletilendiamin (eng. *Tetramethylethylenediamine, TEMED*)

TET, deset-jedanaest translokacija (eng. *Ten-Eleven Translocation, TET*)

TNF- α , faktor nekroze tumora α (eng. *Tumour Necrosis Factor α , TNF- α*)

TRAIL, Ligand receptor 1 koji indukuje apoptozu povezanu sa faktorom nekroze tumora (eng. *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1, TRAIL*)

TRD, domen za represiju transkripcije (eng. *Transcriptional Repression Domain, TRD*)

TRIS, tris hidroksimetil aminometan (eng. *Tris Hydroxymethyl Aminomethane, TRIS*)

UHRF, proteini koji poseduju ubikvitinu sličan domen sa PHD i RING prstima (eng. *Ubiquitin-like, Containing PHD and RING Finger Domain, UHRF*)

UTR, netranslatirajućim regionima (eng. *Untranslated Region, UTR*)

YAP, transkripcioni regulator asociran sa Yes1 (eng. *Yes1 Associated Transcriptional Regulator, YAP*)

ZNF 382, protein sa cinkanim prstima 382 (eng. *Zinc Finger Protein 382, ZNF 382*)

APC/CDC20, anafaza promovirajući kompleks/homolog proteina 20 ćelijske deobe (eng. *Anaphase-Promoting Complex/Cell Division Cycle Protein 20 Homolog, APC/CDC20*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija infekcije virusom hepatitisa C	1
1.2. Virus hepatitisa tipa C i organizacija njegovog genoma	2
1.2.1. Proteini HCV-a u asocijaciji sa odgovorom na terapiju i progresijom bolesti jetre.....	2
1.2.1.1. Protein za nukleokapsid (protein C)	3
1.2.1.2. Proteini omotača E1 i E2	3
1.2.1.3. Protein p7	3
1.2.1.4. Proteini NS2, NS3 i NS4A.....	4
1.2.1.5. Protein NS4B.....	4
1.2.1.6. Protein NS5A	4
1.2.1.7. Protein NS5B.....	5
1.3. Genotipovi HCV-a.....	5
1.4. Terapija hroničnog hepatitisa C	7
1.4.1. Faktori odgovora na antivirusnu terapiju PEG-IFN/RBV	8
1.6. HCV i progresija bolesti jetre	10
1.7. Metilacija molekula DNK.....	11
1.7.1. Mehanizam metilacije DNK	12
1.7.2. Metilacija DNK i regulacija transkripcije.....	13
1.7.3. Metilacija DNK i HCV	13
1.8. Gen RASSF1A	14
1.9. Gen p16INK4a	17
2. CILJEVI RADA	20
3. MATERIJAL I METODE	21
3.1. Materijal.....	21
3.1.1. Pacijenti.....	21
3.1.3. Kontrolni uzorci	22
3.2. Metode	23
3.2.1. Izolacija RNK HCV iz plazme	23
3.2.2. Određivanje koncentracije ukupne virusne RNK (RNK HCV)	24
3.2.3. Određivanje genotipa HCV-a.....	24
3.2.4. Izolacije cirkulišuće DNK.....	25
3.2.5. Izolacije genomske DNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	25

3.2.6. Određivanje koncentracije izolovane cirkulišuće i genomske DNK.....	26
3.2.7. <i>In vitro</i> metilacija molekula DNK izolovane iz mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	26
3.2.8. Bisulfitna modifikacija izolovane DNK	26
3.2.9. Amplifikacija molekula DNK MSP tehnikom.....	27
3.2.10. Analiza uspešnosti i specifičnosti PCR reakcija metodom elektroforeze.....	28
3.2.10.1. Elektroforeza na agaroznom gelu	28
3.2.10.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu.....	28
3.2.11. Genotipizacija gena <i>IL28B</i>	29
3.2.12. Amplifikacija regiona C u genomu HCV-a RT-PCR metodom.....	29
3.2.13. Metoda prečišćavanja PCR produkta.....	30
3.2.14. Automatsko sekvenciranje regiona C	31
3.2.15. Statistička obrada rezultata	31
4. REZULTATI	32
4.1. Analiza kliničko-patoloških karakteristika bolesnika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitis C genotipa 1b	32
4.2. Ispitivanje polimorfizma rs12979860 gena <i>IL28B</i>	32
4.3. Ispitivanje metilacionog statusa gena <i>RASSF1A</i> i <i>p16INK4a</i> u uzorcima plazme pacijenata sa hroničnom infekcijom virusom hepatitis C genotipa 1b.....	33
4.3.1 Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena <i>RASSF1A</i> i <i>p16INK4a</i> sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitis C genotipa 1b	35
4.3.2 Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena <i>RASSF1A</i> i <i>p16INK4a</i> sa genotipovima polimorfizma rs12979860 gena <i>IL28B</i>	36
4.4 Analiza amino-kiselinskih izmena u proteinu C HCV-a.....	39
4.4.1 Ispitivanje povezanosti ak izmena proteina C HCV-a sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika, genotipom gena <i>IL28B</i> i metilacionim statusom gena <i>RASSF1A</i> i <i>p16INK4a</i>	41
4.4.2 Ispitivanje povezanosti ak izmena proteina C HCV-a sa odgovorom na PEG-IFN/RBV terapiju	43
5. DISKUSIJA	48
6. ZAKLJUČCI	58
7. LITERATURA	59
STRUČNA BIOGRAFIJA	83

1. UVOD

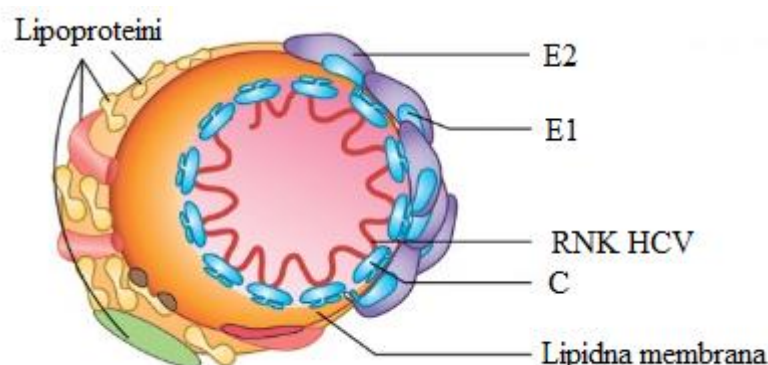
1.1. Epidemiologija infekcije virusom hepatitisa C

Hronična infekcija virusom hepatitisa tipa C (HCV) predstavlja jedan od značajnih zdravstvenih problema širom sveta. Prema najnovijim istraživanjima, procenjuje se da globalno 50 miliona ljudi, od čega 3,2 miliona adolescenata i dece, ima hroničnu HCV infekciju, sa oko million novih slučajeva godišnje (World Health Organization, 2024). Najveći broj hronično zaraženih se nalazi u regionu istočnog Mediterana, sa oko 12 miliona slučajeva, zatim slede regioni Jugoistočne Azije i evropski region sa oko 9 miliona zaraženih, region Zapadnog Pacifika sa 7 miliona zaraženih i na kraju, regioni Afrike i Amerike sa 5 miliona zaraženih (World Health Organization, 2024). Akutna HCV infekcija u 70-80% slučajeva prelazi u hroničnu infekciju, koja se razvija u fibrozu jetre, a kod 15-30% slučajeva prelazi u cirozu, dok se kod 10% slučajeva razvija hepatocelularni karcinom (HCK) (World Health Organization, 2024). Osobe sa akutnom HCV infekcijom su obično asimptomatske ili sa lakšom kliničkom slikom, međutim više od 50% slučajeva prelazi u hronični oblik koji dovodi do progresije fibroze jetre (Rabaan i sar., 2020). Hronični hepatitis C se definiše prisustvom RNK HCV-a u krvi šest meseci nakon transmisije (Seeff i Hoofnagle, 2002). Iako je prevalencija HCV-a u opadanju (World Health Organization, 2017; World Health Organization, 2024), mortalitet prouzrokovan hroničnim hepatitisom C raste, pre svega zbog nastanka fibroze jetre, ciroze i HCK (Taherkhani i sar., 2017). Virus hepatitisa C se prenosi preko krvi i krvnih produkata, putem direktnog kontakta sa zaraženom krvlju (transfuzija) ili indirektno, putem kontaminiranog materijala (nebezbedno korišćenje igala i nebezbedne medicinske procedure). Pre uvođenja testiranja donora krvi i primene univerzalnih mera predostrožnosti pre medicinskih procedura, najčešći način prenosa infekcije je bila transfuzija krvi. Zemlje koje su uvele sistematski test nukleinskih kiselina (eng. *Systematic Nucleic Acid Test*, NAT) su eliminisale rizik od prenosa infekcije putem transfuzije (Roth, 2019). Međutim, u ekonomski nerazvijenim zemljama, kao što su neke afričke zemlje, rizik od prenosa infekcije putem transfuzije je još uvek prisutan (Loua i sar., 2019). Drugi najčešći način prenosa infekcije je intravenska upotreba narkotika (eng. *Intravenous Drug Use*, IVU), koja pogađa sve zemlje sveta, kako u urbanim, tako i u ruralnim područjima (World Health Organization, 2021; World Health Organization, 2022). Ostali načini transmisije su: prenošenje HCV-a sa majke na dete, najčešće tokom porođaja, dvostruko češće kod majki sa koinfekcijom virusom humane imunodeficijencije (HIV) u odnosu na majke samo sa HCV infekcijom, transplantacija organa, hemodijaliza, profesionalni rizik kada se radi o zdravstvenim radnicima, seksualna transmisija, rizično tetoviranje i tradicionalno stvaranje ožiljaka (World Health Organization, 2022). Infekcija HCV-om, koji prvenstveno zaražava ćelije jetre, je jedan od vodećih uzroka hronične bolesti jetre, glavni je uzrok nastanka HCK i glavni je indikator za transplantaciju jetre u razvijenim zemljama (Sharma i sar., 2018). Progresija fibroze i ciroze jetre je učestalija kod muškaraca, osoba starijih od 40 godina u trenutku infekcije, pacijenata na terapiji imunosupresorima, pacijenata sa HIV-om, pacijenata sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa B (HBV), pacijenata sa dijabetesom, insulinskom rezistencijom, gojaznih pacijenata, pacijenata sa steatozom jetre i osoba koje učestalo konzumiraju alkohol (de Martel i sar., 2020; World Health Organization, 2022).

Procenjuje se da je prevalenca HCV-a u Srbiji 1,13% u opštoj populaciji (Mitrovic i sar., 2018, Bojovic i sar., 2020). Većina pacijenata nema značajan stepen fibroze (57,31%), dok se teška fibroza javlja kod 9,67% obolelih, a ciroza kod 14,1% obolelih. Hepatocelularni karcinom se javlja kod 4,7% pacijenata sa hroničnom infekcijom HCV-om (Bojovic i sar., 2020).

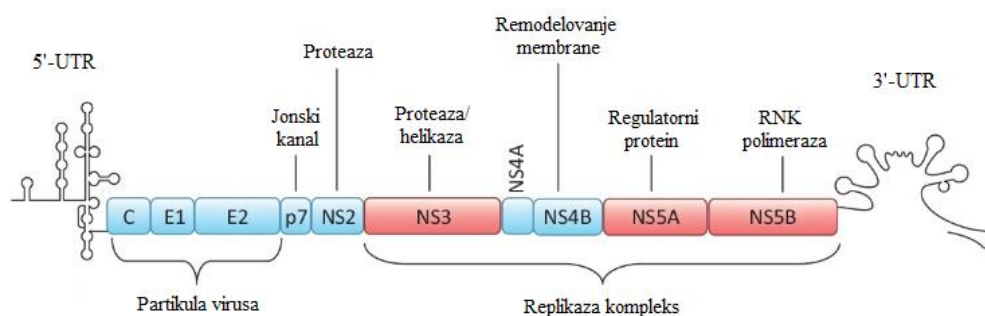
1.2. Virus hepatitisa tipa C i organizacija njegovog genoma

Virus hepatitisa tipa C je mali virus sa proteinskim omotačem ikozaedarne simetrije, prečnika 56-65 nm i pozitivno orijentisanom jednolančanom RNK u jezgri, prečnika oko 45 nm (Slika 1.1). Pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Hepacivirus* (Gastaminza i sar., 2010).



Slika 1.1. Struktura HCV-a (Modifikovano iz Pietschmann i sar., 2019)

Genom HCV-a je organizovan u pozitivan jednolančani molekul RNK dužine približno 9600 nukleotida. Ovaj molekul RNK kodira jedan otvoreni okvir čitanja (eng. *Open Reading Frame*, ORF), koji je okružen 5' i 3' netranslatirajućim regionima (eng. *Untranslated Region*, UTR) (Slika 1.2). U okviru 5'-UTR-a se nalazi šest stablo-petlja (eng. *Stem-Loop*, SL) sekundarnih struktura RNK označenih rimskim brojevima od I do VI. SLII, III i IV formiraju unutrašnje mesto za vezivanje ribozoma (eng. *Internal Ribosome Entry Site*, IRES) koje omogućava translaciju RNK HCV-a (Tabata i sar., 2020). Ovaj region takođe sadrži važne signale za sintezu negativnog lanca RNK (Tabata i sar., 2020), kao i mesta vezivanja mikro RNK (miRNK) specifičnih za jetru, kao što je miR-122. Interakcija 5'-UTR i miR-122 reguliše replikaciju i translaciju RNK HCV-a (Henke i sar., 2008). Region 3'-UTR je neophodan za replikaciju i učestvuje u IRES-posredovanoj translaciji HCV-a (Song i sar., 2006). Ovaj region se sastoji od kratkog varijabilnog regiona, poli-U niza i visoko konzervirane sekvence 3'-X repa (Kolykhalov i sar., 1996).



Slika 1.2. Organizacija genoma HCV-a (Modifikovano iz Pietschmann i sar., 2019)

1.2.1. Proteini HCV-a u asocijaciji sa odgovorom na terapiju i progresijom bolesti jetre

Virusna RNK kodira jedan poliprotein dužine oko 3000 amino-kiselina, čiju obradu vrše ćelijske i virusne proteaze, tokom i nakon translacije. Aktivnošću ovih proteaza se dobijaju tri strukturalna proteina (C, E1 i E2), protein jonskog kanala (p7) i šest nestrukturalnih proteina (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B) (Roger i sar., 2021) (Slika 1.2). Dosadašnja istraživanja su pokazala da određeni proteini HCV-a i njihove amino-kiselinske izmene utiču na odgovor na antivirusnu

terapiju i progresiju bolesti jetre (Kumthip i Maneekarn, 2015; Jovanovic-Cupic i sar., 2016; D'souza i sar., 2020; Alkhatib i sar., 2021; Lashgarian i sar., 2021; Anwar i sar., 2022; Campos i sar., 2023).

1.2.1.1. Protein za nukleokapsid (protein C)

Protein za nukleokapsid ili protein C je protein dužine od 191 amino-kiseline, težine približno 21 kDa, koji učestvuje u formiranju virusnog nukleokapsida, i jedini je protein HCV-a koji se vezuje i inkapsulira genomsku RNK (Mani i sar., 2022). Nakon isecanja iz HCV poliproteina, protein C se transportuje sa membrane endoplazmatičnog retikuluma (ER) na površinu lipidnih kapi (Gawlik i sar., 2014), mesta formiranja HCV-a (Miyanari i sar., 2007). Protein C je organizovan u tri domena: N-terminalni hidrofilni domen (D1, oko 117 amino-kiselina), C-terminalni hidrofobni domen (D2, oko 50 amino-kiselina) i dvadeset amino-kiselina dugačak hidrofobni domen (D3) (Ogawa i sar., 2009). Domen D1 sadrži česte pozitivno naelektrisane amino-kiseline, odgovoran je za vezivanje proteina C za genomsku RNK HCV-a, promoviše dimerizaciju virusne RNK i ima značajnu ulogu u formiranju nukleokapsida (Ogawa i sar., 2009; Mani i sar., 2022). Domen D2 je odgovoran za interakciju proteina C sa lipidnim kapima, kao i sa proteinima domaćina koji učestvuju u transportu lipida, dok je domen D3 domen kojim je protein C ukotvljen u ER i kojim intereaguje sa proteinima E1 i E2 (Ogawa i sar., 2009; Mani i sar., 2022). Utvrđeno je da se protein C najčešće nalazi u ER, mitohondrijama i lipidnim kapima u citoplazmi. Međutim, protein C se može nalaziti i u nukleusu, za šta je odgovorna sekvenca unutar domena D1 (Suzuki i sar., 2005). Nakon otpuštanja iz inficiranih hepatocita, protein C se može detektovati u krvi domaćina (Mani i sar., 2022). Prethodna istraživanja su pokazala da amino-kiselinske izmene u proteinu C HCV-a imaju uticaj na odgovor na kombinovanu antivirusnu terapiju pegilovanim interferonom i ribavirinom (PEG-IFN/RBV) (El-Shamy i sar., 2012; Campos i sar., 2023), kao i da su amino-kiselinske izmene proteina C povezane sa progresijom bolesti, nastankom ciroze i HCK (Nakamoto i sar., 2010; Miura i sar., 2012; Araujo i sar., 2014; Campos i sar., 2023). Takođe, protein C indukuje metilaciju DNK i inhibiciju ekspresije različitih tumor-supresor gena u genomu domaćina što se dovodi u vezu sa progresijom bolesti i nastankom HCK (Domovitz i Gal-Tanamy, 2021; Zhao i sar., 2021).

1.2.1.2. Proteini omotača E1 i E2

Proteini E1 i E2 formiraju kompleks glikoproteina na spoljašnjoj strani virusa. Ovaj glikoproteinski kompleks je neophodan za formiranje virusne partikule i ulazak virusa u ćeliju domaćina (Torrents de la Peña i sar., 2022). Protein E2 poseduje domen kojim se vezuje za receptore domaćina, kao što su SR-B1 i CD81 receptori, dok protein E1 poseduje domen za koji se pretpostavlja da je neophodan za fuziju sa ćelijskom membranom (Torrents de la Peña i sar., 2022). Protein E2 sadrži hipervarijabilne regione čije se amino-kiselinske sekvence razlikuju oko 80% između različitih genotipova virusa (Weiner i sar., 1991). Amino-kiselinske izmene unutar ovih proteina su učestalije kod pacijenata sa lošijim odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV (Serre i sar., 2013; Kumthip i Maneekarn, 2015). Takođe, protein E2 potencijalno poseduje tumor-supresorsku funkciju, stimulišući ekspresiju miR-490 u mast ćelijama, koja sa druge strane inhibira proliferaciju i migraciju ćelija (Pascut i sar., 2021).

1.2.1.3. Protein p7

Protein p7, viroporin, je mali membranski protein (63 amino-kiseline) sa dva transmembranska domena (Carrère-Kremer i sar., 2002). Ovaj protein je lokalizovan na ER (Matthaei i sar., 2024), formirajući heksamerne jonske kanale selektivne za katjone (Pavlović i sar., 2003), sa većom selektivnošću za jone Ca^{2+} , nego za jone K^+/Na^+ (Montserret i sar., 2010). Protein p7 je važan za sastavljanje partikula HCV-a u koracima pre formiranja kapsida (Matthaei i sar., 2024), kada je neophodan za lokalizaciju proteina NS2 (Lee i sar., 2020). Prema rezultatima prethodnih studija

amino-kiselinske izmene u ovom proteinu su povezane sa odgovorom na antivirusnu terapiju (Mihm i sar., 2006; Zeng i sar., 2012; Jovanovic-Cupic i sar., 2016).

1.2.1.4. Proteini NS2, NS3 i NS4A

NS2 je transmembranski protein koji se sastoji od N-terminalnog domena sa tri transmembranska heliksa i C-terminalnog domena sa cistein-proteaznom aktivnošću (Isken i sar., 2022a). Aktivnost katalitičkog domena proteina NS2 je regulisana N-terminalnim domenom proteina NS3, koji aktivira proteazu NS2 da efikasno raskine vezu između proteina NS2-NS3 (Isken i sar., 2022a). Pojedinačno, protein NS2 se vezuje za membranu ER (Franck i sar., 2005) i nije neophodan za formiranje replikacionog kompleksa virusa (Blight i sar., 2000). Ovaj protein inhibira RNK interferenciju, proces post-transkripcionog utišavanja gena značajan za antivirusni imunitet u ćelijama eukariota (Zhou i sar., 2020).

NS3 je multifunkcionalni protein (69 kDa) sa serin-proteaznim domenom na amino-kraju i sa helikaznim domenom, sa RNK helikaznom i ATPaznom aktivnošću, na karboksilnom kraju (Isken i sar., 2022b). NS3 je serinska proteaza koja uvodi prekide između svih ostalih nizvodnih NS proteina (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A i NS5A/NS5B) uz pomoć nekovalentno vezanog kofaktora NS4A. Ova aktivnost NS3 je neophodna za formiranje svih komponenti virusnog replikacionog kompleksa (Lindenbach i sar., 2005). Proteazna aktivnost NS3 je pojačana aktivnošću kofaktora NS4A, koji je potreban za zauzimanje konačne konformacije amino-kraja proteina NS3, kao i za njegovo vezivanje za ćelijske membrane (Kohlway i sar., 2014). Aktivnost NS3-4A proteaze je takođe uključena u blokiranje urođenog antivirusnog odgovora ćelije (Foy i sar., 2003). Protein NS3 može da odvije očuvane G4 (G kvadrupleks) strukture prisutne u genomu i negativnom lancu HCV-a, što dodatno ukazuje na njegov značaj u replikaciji virusa (Belachew i sar., 2022). Takođe, protein NS3 ima ključnu ulogu u formiranju funkcionalno različitih proteinskih kompleksa virusa. Skup filogenetski konzerviranih ostataka proteaznog i helikaznog domena ovog proteina formira kontinuirani površinski deo koji je kritičan za hiperfosforilaciju proteina NS5A, formiranje replikaze i morfogenezu viriona (Isken i sar., 2022b). Rezultati dosadašnjih istraživanja su pokazali da je veći broj amino-kiselinskih izmena u proteinu NS3 HCV-a asociiran sa lošijim odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV (Kumthip i Maneekarn, 2015).

1.2.1.5. Protein NS4B

NS4B je membranski protein (27 kDa) sa četiri transmembranska domena (Huang i Fischer, 2021). Ovaj protein se nalazi unutar membrane ER. Amino i karboksilni kraj proteina NS4B su lokalizovani u citosolu, međutim pokazano je da se deo amino-kraja nalazi u lumenu ER (Paul i sar., 2018). Protein NS4B, zajedno sa proteinom NS5A, dovodi do specifične promene ER membrane, označene kao membranska mreža, mesta formiranja kompleksa za replikaciju virusa (Chen i Harris, 2023; Zou i sar., 2023). Veći broj amino-kiselinskih izmena u proteinu NS4B je vezan za brz inicijalni pad koncentracije RNK HCV-a kod pacijenata nakon terapije PEG-IFN/RBV (Kumthip i Maneekarn, 2015). Sa druge strane, promene unutar motiva za vezivanje i hidrolizu GTP-a ovog proteina se vezuju za proces tumorigeneze kod genotipa 1b (Einav i sar., 2008).

1.2.1.6. Protein NS5A

Kao i većina proteina HCV-a, NS5A se nalazi vezan za membranu ER (Brass i sar., 2002). Pored domena kojim se vezuje za membrane, NS5A poseduje još tri domena. Domen I je cink-vezujući domen koji je neophodan za replikaciju virusnog genoma kao i formiranje virusnih partikula (Tellinghuisen i sar., 2005; Chen i Harris, 2023). Ovaj domen formira homodimere, mesta vezivanja virusne RNK (Tellinghuisen i sar., 2005). Domen II učestvuje u replikaciji virusne RNK tako što menja ćelijski metabolizam, povećavajući potrošnju glukoze, akumulaciju triglicerida i sintezu lipoproteina, ali smanjujući nakupljanje glikogena (Perrin-Cocon i sar., 2022). Domen III je bitan za

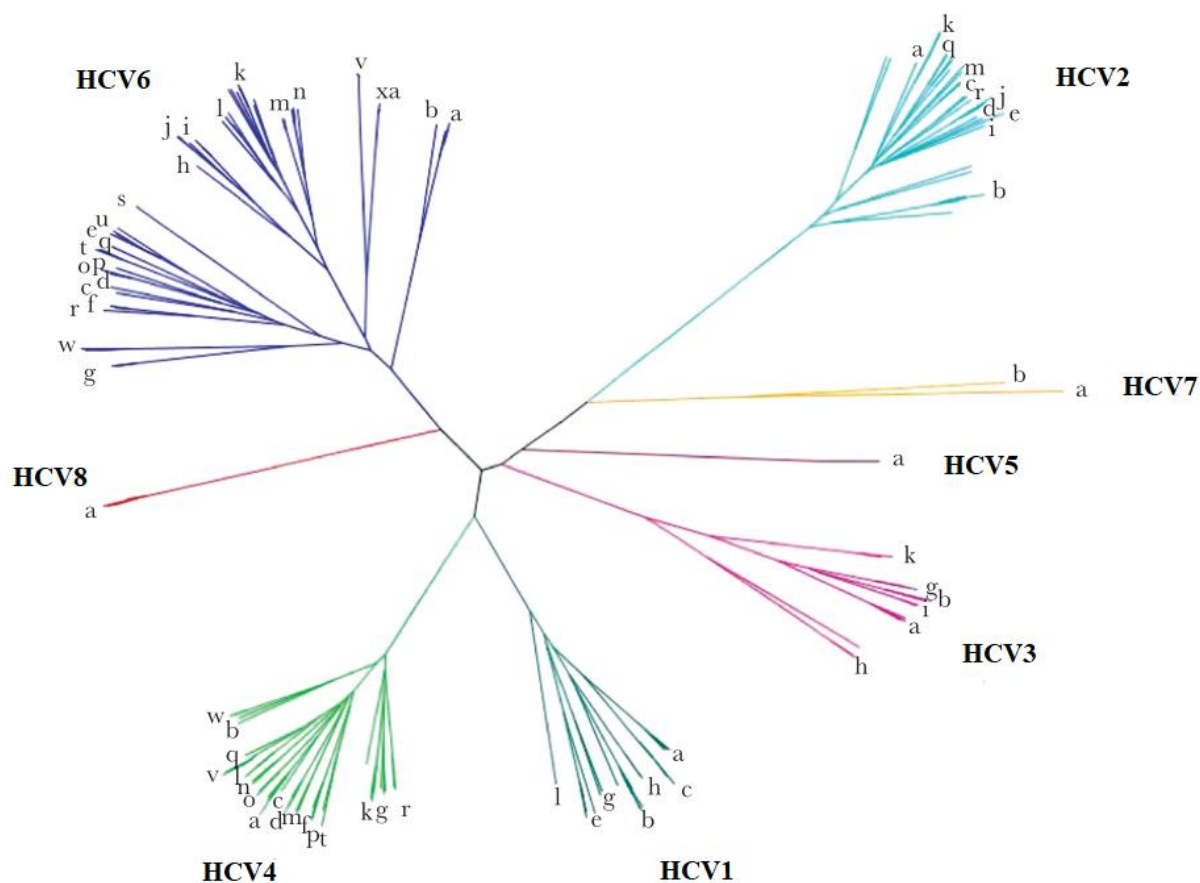
formiraje virusne partikule, ali ne i za replikaciju virusne RNK (Tellinghuisen i sar., 2008). Na karboksilnom kraju NS5A se nalazi region osetljiv na interferon (eng. *Interferon Sensivity Determining Region*, ISDR), preko kojeg NS5A indirektno utiče na odgovor na interferonsku terapiju (Chen i Harris, 2023). Utvrđena je veza između broja genetičkih varijacija domena IRRDR (eng. *IFN/RBV Resistance-Determining Region*), kojeg čine domen V3 (amino-kiseline 2356 do 2379) i domen ispred njega (amino-kiseline 2334 do 2355), i odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV (Lashgarian i sar, 2021; Tahata i sar., 2021). Međutim, dosadašnja istraživanja koja su vezana za asocijaciju genetičkih varijanti unutar regiona ISDR i odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV su oprečna. Tako je u japanskoj populaciji pokazana veza između broja genetičkih varijanti unutar regiona ISDR i odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV (Shen i sar., 2007), dok druge studije nisu pronašle vezu između broja genetičkih varijanti unutar regiona ISDR proteina NS5A i odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV (Lashgarian i sar, 2021). Sa druge strane, utvrđena je asocijacija između prisustva genetičkih varijanti unutar domena I, II i III ovog proteina i nastanka HCK (Alkhatib i sar., 2021).

1.2.1.7. Protein NS5B

NS5B je membranski protein sa transmembranskim domenom na svom karboksilnom kraju (Ivashkina i sar., 2002). NS5B je RNK-zavisna RNK polimeraza koja *de novo* sintetise RNK, koristeći negativni lanac RNK, koji predstavlja replikativni intermedijer, kao matricu za sintezu pozitivnog lanca RNK (Bartenschlager i sar., 2004). Aktivnost NS5B je regulisana njegovom interakcijom sa drugim nestrukturim proteinima kao što su NS3 i NS5A (Bartenschlager i sar., 2004), koji je kofaktor proteina NS5B (Shimakami i sar., 2004). Dosadašnja istraživanja su ustanovila vezu između prisustva amino-kiselinskih izmena na pozicijama 309, 333, 338 i 355 proteina NS5B i boljeg odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV (Hamano i sar., 2005; Kumthip i Maneekarn, 2015). Takođe, amino-kiselinska izmena D559G ovog proteina pozitivno utiče na njegovo vezivanje za protein fosfataza 2 regulatorna subjedinica B'delta (PPP2R5D) što je povezano sa progresijom bolesti jetre (Anwar i sar., 2022).

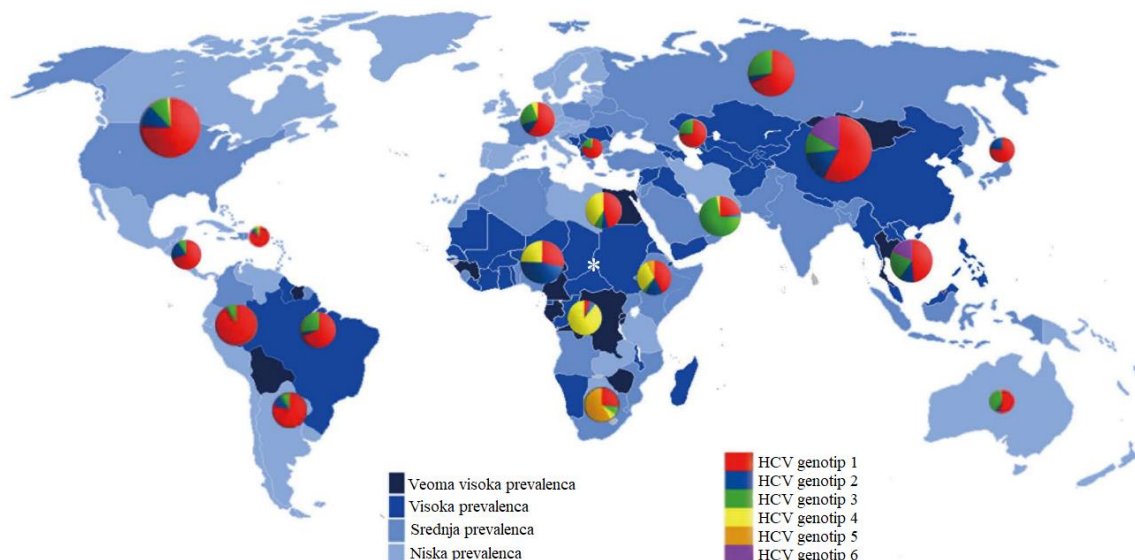
1.3. Genotipovi HCV-a

Zlatni standard genotipizacije HCV-a je sekvenciranje regiona C/E1 i NS5B i filogenetska analiza koja uključuje poređenje sa referentnim sekvencama (Amin i sar., 2023). Za određivanje genotipa HCV-a najčešće se primenjuje sekvenciranje visoko konzerviranih regiona genoma HCV, kao što su NS5, C, E1 i 5'-UTR (Kumar i sar., 2018). Filogenetskom analizom HCV je klasifikovan u 8 genotipova i 67 podtipova (Smith i sar., 2014; Petruzzello i sar., 2016) (Slika 1.3). Sekvence HCV koje variraju do 33-36% klasifikuju se kao genotipovi; sekvence koje variraju do 20-27% klasifikuju se kao podtipovi, dok se genetičke varijante sa razlikom do 12% unutar pojedinačnih izolata klasifikuju kao kvazivrste (Kato i sar., 1991; Chen i sar., 1992). Najzastupljeniji genotip je genotip 1 koji obuhvata oko 46% svih HCV slučajeva, zatim slede genotip 3 (30% svih infekcija), genotipovi 2, 4 i 6 koji čine oko 23%, dok genotip 5 obuhvata oko 1% svih infekcija (Messina i sar., 2015). Genotip 7 je pronađen kod samo nekoliko ljudi iz Centralne Afrike (Smith i sar., 2014; Murphy i sar., 2015), dok je genotip 8 pronađen kod četiri osobe iz Pundžaba, Indija (Borgia i sar., 2018; Martinez i Franco, 2020) (Slika 1.4).



Slika 1.3. *Filogenetsko stablo HCV-a (Modifikovano iz Borgia i sar., 2018)*

U većini zemalja Evrope i Severne Amerike najzastupljeniji je genotip 1, a po učestalosti ga prate genotipovi 2 i 3. Genotip 2 je najčešći u centralnoj Africi, a genotip 3 u zemljama Azije, Indiji, Pakistanu, Tajlandu i u severnoj Evropi. Genotip 4 je uglavnom zastupljen u centralnoj Africi i na Bliskom Istoku, dok se genotip 5 javlja u južnoj Africi. Prevalencija genotipa 6 je visoka u istočnoj i jugoistočnoj Aziji, pre svega u Laosu i Vijetnamu (Messina i sar., 2015; Petruzziello i sar., 2016) (Slika 1.4). Najučestaliji genotipovi u Srbiji su 1a, 1b i 3a (Babić i sar., 2019). Glavna razlika između genotipova je u odgovoru na antivirusnu terapiju interferenom (Orito i sar., 1994; Kohara i sar., 1995). Oboleli sa genotipom 1b ređe postižu stabilan virusološki odgovor (SVO) nakon interferonske terapije i češće razvijaju agresivniji oblik bolesti (Cuypers i sar., 2015). U kontekstu korišćenja interferonske terapije preporučuje se genotipizacija HCV-a, dok za nove DAA (eng. *Direct Acting Antivirals*) terapije koje ispoljavaju direktno antivirusno delovanje određivanje genotipa nije od suštinskog značaja (Cuypers i sar., 2015).



Slika 1.4. Prevalencija i globalna distribucija genotipova HCV-a (Modifikovano iz Daw i sar., 2016)

1.4. Terapija hroničnog hepatitisa C

Prevenција komplikacija hroničnog hepatitisa C podrazumeva postizanje SVO nakon primene antivirusne terapije i ranoj detekciji odgovarajućih biomarkera kod osoba koje su pod rizikom. Standardna terapija lečenja hroničnog hepatitisa C u Srbiji i ekonomski nerazvijenim zemljama je kombinovana terapija PEG-IFN/RBV (Babić i sar., 2019). Ribavirin je nukleozidni analog čije je dodavanje u terapiju pegilovanim interferonom ubrzalo eliminaciju virusa u ranoj fazi lečenja, što je smanjilo stopu relapsa (Te i sar., 2007). IFN se vezuje za svoje receptore čime se aktivira JAK-STAT signalni put. Fosforilovani STAT se vezuje za protein p48 i formira ISGF-3 (IFN-stimulisani genski faktor 3) koji zatim ulazi u jedro gde stimuliše IFN-stimulisani regulatorni element što dovodi do sinteze različitih proteina koji ometaju ulazak virusa u ćeliju, sintezu virusne RNK, formiranje virusnih partikula i njihovo oslobađanje (Wodak i sar., 2009). Antivirusni efekat ribavirina ostvaruje se preko četiri molekularna mehanizma koji se međusobno ne isključuju. Prvi mehanizam uključuje direktnu inhibiciju replikacije HCV-a, dok drugi mehanizam podrazumeva inhibiciju enzima IMPDH (inozin monofosfat dehidrogenaza), koji učestvuje u *de novo* sintezi guanina. Treći mehanizam proizilazi iz mutagene aktivnosti ribavirina, koja povećava učestalost nukleotidnih izmena u virusnoj RNK do te mere da dovodi do grešaka u replikaciji koje za posledicu imaju smanjenje broja virusnih partikula. Četvrti i poslednji mehanizam zasniva se na sposobnosti ribavirina da indukuje imuni odgovor putem T-pomoćnih ćelija (Th1 ćelije) (Te i sar., 2007). Iako praćena brojnim neželjenim efektima, dugotrajna IFN terapija efikasno smanjuje morbiditet i mortalitet kod pacijenata sa hroničnom infekcijom HCV-om (Manns i sar., 2006).

Tokom godina došlo je do razvoja oralnih agenasa, poznatih kao antivirusni lekovi sa direktnim delovanjem, DAA. Za razliku od interferona i ribavirina, DAA su specifičniji u načinu delovanja. Oboleli lečeni sa DAA postižu stopu izlečenja veću od 90% (Afdhal i sar., 2014). Današnji DAA su inhibitori dizajnirani da ometaju progresiju životnog ciklusa virusa, pri čemu su proteaza NS3/NS4A, protein NS5A i RNK zavisna RNK polimeraza NS5B, glavne mete DAA terapije. Većina pacijenata se danas leči glekaprevirom/pibrentasvirom (inhibitor NS3/4A i NS5A) ili velpatasvirom/sofosbuvirom (inhibitor NS5A i NS5B) bez obzira na prisustvo ciroze ili virusni genotip (Pawlotsky i sar., 2020; Hayes i sar., 2022). Izuzetak su oboleli sa genotipom 3 koji zahtevaju testiranje na prisustvo amino-kiselinske izmene Y93H proteina NS5A pre lečenja sa velpatasvirom/sofosbuvirom (Hayes i sar., 2022). Međutim, još uvek postoji problem javljanja amino-kiselinskih supstitucija asociranih sa rezistencijom na određene DAA lekove (eng.

Resistance-Associated Substitution, RAS), kao što je delecija P32 proteina NS5A koja može da dovede do neuspešnog ishoda lečenja, pogotovo kod pacijenata sa genotipom 1b (Sato i sar., 2018; Hayes i sar., 2022). Potencijalna alternativna pan-genotipska terapija uključuje HTA (eng. *Host-Targeted Agents*). Za razliku od DAA koje deluju direktno na virus, HTA deluju na domaćina, ometajući ćelijske faktore uključene u replikaciju virusa (Zeisel i sar., 2015). HTA ciljaju faktore domaćina sa niskom genetičkom varijabilnošću, čime je sprečena pojava rezistencije na lek. Shodno tome, smatra se da kombinacija DAA i HTA može smanjiti rezistenciju i potencijalno omogućiti još kraći period lečenja (Pawlotsky, 2014; Zeisel i sar., 2015). Problemi moderne terapije hroničnog hepatitisa C su potencijalna rezistencija pacijenata na jedan ili više DAA, cena antivirusne terapije, kao i progresija bolesti, uključujući i nastanak HCK, nakon postizanja SVO (Sorbo i sar., 2018; Janjua i sar., 2020).

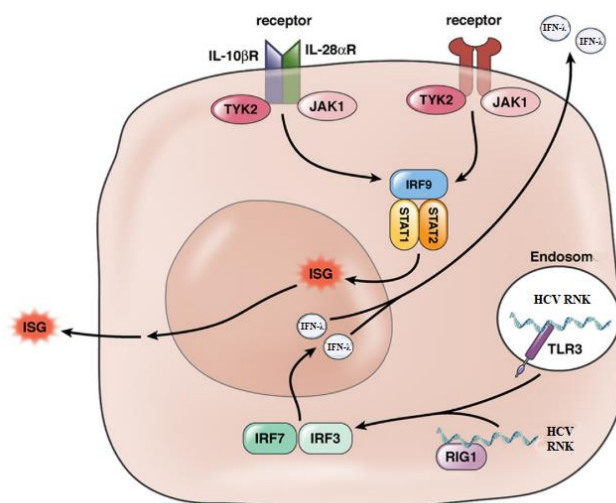
1.4.1. Faktori odgovora na antivirusnu terapiju PEG-IFN/RBV

Različiti virusni faktori i faktori domaćina mogu uticati na uspešnost kombinovane antivirusne terapije. Genotip HCV je najznačajniji nezavisni marker odgovora na terapiju interferonom (Fung i sar., 2008). Odgovor na kraju terapije (eng. *End Therapy Response*, ETR) i SVO su dva važna načina merenja odgovora na antivirusnu terapiju. ETR podrazumeva odsustvo detektibilne RNK HCV-a na kraju lečenja, dok SVO podrazumeva odsustvo detektibilne RNK HCV-a nakon 24 nedelje od kraja lečenja (Nguyen i sar., 2010). HCV genotipovi 2 i 3 bolje reaguju na terapiju PEG-IFN/RBV nego bilo koji drugi HCV genotip (Nguyen i Keeffe, 2005; Waheed, 2015). Rezultati ukazuju da se SVO postiže kod 70% do 80% pacijenata sa HCV genotipovima 2 i 3 i kod 30% do 50% pacijenata sa HCV genotipom 1 (O'Brien i sar., 2019; Tahata i sar., 2021). HCV genotip 6 najverovatnije ima sličan odgovor na terapiju kao genotipovi 2 i 3 (Nguyen i Keeffe, 2005; Nguyen i sar., 2010). Međutim, prediktivna vrednost genotipizacije HCV za terapiju zasnovanu na interferonu i ribavirinu je samo 55% (Yuen i Lai, 2006). Pored genotipa, važan faktor uspešnosti terapije su genetičke varijacije unutar genoma HCV-a. Ustanovljeno je da odgovor pacijenata na terapiju PEG-IFN/RBV zavisi prvenstveno od pozicije, ali ne i učestalosti genetičkih varijanti unutar IRES sekvence 5'-UTR-a (Kanwali sar., 2014), kao i da su amino-kiselinske izmene unutar proteina C, E2, p7, NS3, NS5A i NS5B povezane sa odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV (Kumthip i Maneekarn, 2015; Jovanovic-Cupic i sar., 2016; Lashgarian i sar., 2021; Campos i sar., 2023). Među najvažnijim regionima čije genetičke varijante utiču na odgovor na terapiju PEG-IFN/RBV je IRRDR region koji se nalazi unutar gena NS5A (Lashgarian i sar., 2021; Tahata i sar., 2021). Utvrđeno je da je amino-kiselinska izmena na poziciji 70 proteina C u korelaciji sa slabijim odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV (Alestig i sar., 2011). Takođe, pojava RNK HCV-a kod pacijenata nakon postizanja SVO negativno utiče na odgovor na terapiju PEG-IFN/RBV (Simmons i sar., 2016). Uzrok javljanja HCV RNK u krvi kod lečenih pacijenata nakon postizanja SVO može biti ponovna infekcija i kasni relaps (Minosse i sar., 2021). Oboleli koji su podložniji ponovnoj infekciji su intravenozni korisnici droga i bolesnici koinficirani HIV-om, koji mogu biti pod povećanim rizikom zbog imunokompromitovanog statusa (Simmons i sar., 2016; Minosse i sar., 2021). Potencijalni razlog pojave relapsa je nakupljanje HCV-a u mononuklearnim ćelijama (MNC) periferne krvi i gastrointestinalnim mukoznim ćelijama (Minosse i sar., 2021). Među bolesnicima lečenim interferonom sa kasnim relapsom, RNK HCV-a je često detektovana u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (Minosse i sar., 2021).

Karakteristike domaćina koje utiču na odgovor na terapiju PEG-IFN/RBV su pol i etničko poreklo pacijenta, godine starosti, težina (u smislu BMI (eng. *Body Mass Index*)) insulinska rezistencija, dijabetes, ciroza i steatoza jetre (Tahata i sar., 2021). Bolji odgovor na terapiju imaju osobe mlađe od četrdeset godina i oboleli azijskog porekla (Reddy i sar., 2009; Tahata i sar., 2021), dok je BMI > 25kg/m² povezan sa nastankom fibroze i lošim odgovorom na terapiju (Ortiz i sar., 2002; Hickman i sar., 2003). Koinfekcije sa HIV-om, HBV-om, kao i prekomerno konzumiranje alkohola i korišćenje narkotika, su takođe odgovorni za niske stope SVO-a (Alberti, 2009). Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) određenih

gena, kao što su gen koji kodira interferon- λ (O'Brien i sar., 2019), interferon- γ (Huang i sar., 2007), MBL (eng. *Mannan-Binding Lectin*) (Alves Pedroso i sar., 2008), CTLA4 (eng. *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) (Yan i Wang, 2017), interleukin 10 (Nelson i sar., 2003), interleukin 18 (Manohar i sar., 2009), TRAIL (eng. *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1*) (Cummins i Badley, 2009), TGF- β (Nattermann i sar., 2008), MxA (eng. *Myxovirus Resistance Protein A*) (Yan i Wang, 2017), osteopontin (Naito i sar., 2005), LMP (eng. *Low Molecular Mass Polypeptides*) (Sugimoto i sar., 2002) i OAS1 (eng. *Oligoadenylate Synthetase 1*) (Yan i Wang, 2017), takođe utiču na odgovor na interferonsku terapiju. Takođe, prethodna istraživanja su pokazala da HCV-indukovane epigenetičke promene u genomu domaćina, posebno promene u obrascima metilacije DNK, mogu uticati na odgovor na terapiju PEG-IFN/RBV (N Zekri i sar., 2014; Mostafa i sar., 2020).

Jedan od najznačajnijih faktora u genomu domaćina koji utiče na ishod bolesti je postojanje različitih varijanti u genima odgovornim za imuni sistem domaćina. Dosadašnja istraživanja ukazuju da je pojava određenih alela sa tačkastim polimorfizmima koji su locirani u blizini gena za interleukin *IL28B*, a koji učestvuje u sintezi jednog od antivirusnih citokina (IFN- λ), u direktnoj korelaciji sa odgovorom na terapiju pacijenata sa hroničnom infekcijom i genotipom 1 (Sugiyama i sar., 2011; Miri i sar., 2021; Mohamad i sar., 2021). Gen *IL28B* (*IFN- λ 3*) se zajedno sa genima *IL28A* (*IFN- λ 2*) i *IL29* (*IFN- λ 1*) nalazi u okviru hromozomskog regiona 19q13.13, čineći genski klaster (Altschul i sar., 1990). Proteinski produkti ovih gena pripadaju familiji IFN- λ proteina (Sheppard i sar., 2003). IFN- λ su potentni endogeni antivirusni citokini, funkcionalno najbliži tipu 1 IFN, dok su strukturno najhomologiji članovima porodice interleukina-10 (IL 10) (Gad i sar., 2009). Citokini se vezuju za heterodimere koje čine α lanac receptora za interleukin-28 (IL-28R α) i β lanac receptora za interleukin-10 (IL-10R β) (Balagopal i sar., 2010). Nakon dimerizacije ovih receptora, dolazi do kovalentnog vezivanja tirozin kinaza TYK2 i JAK1. Ove tirozin kinaze fosforilišu jedna drugu, kao i STAT1 i STAT2 proteine. Fosforilacija STAT1 i STAT2 za posledicu ima formiranje kompleksa IFN-stimulisanog genskog faktora 3, kao i aktiviranje interferon regulatornog faktora 9 (IRF9) koji povećava ekspresiju interferonom stimulisanih gena (eng. *IFN-Stimulated Genes*, ISG) čiji proteinski produkti dovode do pokretanja urođenih ćelijskih odbrana od virusne infekcije (Slika 1.5) (Deng i sar., 2022). Interferonom stimulisani geni se mogu podeliti u tri familije: Mx proteini; 2'-5'-oligoadenilat sintetaze; i dvolančanom RNK-aktivirana protein kinaza (Rojas i sar., 2021).



Slika 1.5. IFN- λ signalizacija kao odgovor na HCV (Modifikovano iz Balagopal i sar., 2010)

Utvrđeno je da je odgovor na terapiju povezan sa polimorfizmom gena *IL28B* (Alestig i sar., 2011; Sugiyama i sar., 2011; Miri i sar., 2021; Mohamad i sar., 2021). Postoje tri glavna SNP-a u ovom genu, i to su: rs12979860, rs809917 i rs12980275. S obzirom na to da se nalaze u okviru

promotorskog i regulatornog regiona gena *IL28B*, ovi SNP-ovi utiču na njegovu ekspresiju (Kim i sar., 2013). Nekoliko studija je pokazalo da postoji korelacija između ovih SNP-ova i spontane eliminacije virusa, kao i predviđanja odgovora na terapiju (Mizokami i sar., 2012; Jiménez-Sousa i sar., 2013; Miri i sar., 2021). Ustanovljeno je da je najjači prediktor SVO SNP rs12979860, koji se nalazi uzvodno od gena *IL28B* (Alestig i sar., 2011; Mohamad i sar., 2021). Najčešći alel na ovoj poziciji je C alel, koji je ujedno i povezan sa postizanjem SVO (Ge i sar., 2009). Nedavne studije su pokazale da je kombinacija genotipova CC/CT/TT polimorfizama rs12979860/rs8109886/rs8099917 preciznija u predviđanju postizanja SVO nakon terapije PEG-IFN/RBV od pojedinačnih SNP-ova (Silva i sar., 2021).

1.6. HCV i progresija bolesti jetre

Pošto je HCV RNK virus bez mogućnosti integracije svog genetičkog materijala u genom domaćina, kombinacija direktnih (virusni proteini) i indirektnih (hronična inflamacija, deregulisana signalizacija) faktora je odgovorna za razvoj i progresiju bolesti jetre izazvane HCV-om (Virzi i sar., 2020). Hronična inflamacija izazvana virusnom infekcijom dovodi do trajnih degenerativnih i regenerativnih procesa i pojave progresivne fibroze, ciroze jetre i na kraju HCK (Virzi i sar., 2020; Syyam i sar., 2023). Takođe, jedna od posledica hronične inflamacije je povećanje nivoa reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS), koje oštećuju hepatocite i mogu dovesti do akumulacije genetičkih i epigenetičkih promena u ćelijama jetre (Virzi i sar., 2020). Virusni proteini C, E1, E2, NS3, NS4B i NS5A podstiču nastanak ROS-a (Virzi i sar., 2020). Povišen nivo ROS-a dovodi do nastanka fibroze jetre, koju karakteriše prekomerna sinteza ekstracelularnog matriksa (ECM) i nastanak ožiljnog tkiva (Luangmonkong i sar., 2018). U isto vreme, ROS stimuliše protoonkogene signalne puteve ćelijske proliferacije i angiogeneze (Zhang i sar. 2016a). Pored povećanog nivoa ROS-a, hronična inflamacija doprinosi povećanoj koncentraciji proinflamatornih citokina, kao što je faktor nekroze tumora α (eng. *Tumour Necrosis Factor α* , TNF- α), koji je indukovano proteinima NS3, NS4 i NS5 (Virzi i sar., 2020). HCV izaziva inflamaciju aktiviranjem zvezdastih ćelija jetre (eng. *Hepatic Stellate Cells*, HSC) (Sun i Karin, 2008). Ove ćelije se aktiviraju delovanjem ROS, faktora rasta, citokina, adipokina i hemokina koje oslobađaju hepatociti, Kupferove ćelije i inflamatorne ćelije (McGivern i Lemon, 2011). Kumulativni efekat inflamacije, ROS, steatoze i insulinske rezistencije, izazvanih tokom hronične infekcije HCV-om, dovodi do progresije bolesti (Virzi i sar., 2020; Syyam i sar., 2023). Aktivirane HSC, pod dejstvom fibrogenih citokina, prolaze kroz epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) (Bartosch i sar., 2009). Svi ovi događaji mogu da promovišu neoplastičnu transformaciju hepatocita i progresiju malignih klonova (Hoshida i sar., 2014).

Istraživanja su pokazala da je HCV direktno uključen u hepatokarcinogenezu, delovanjem virusnih proteina na tumor-supresorske gene i protoonkogene domaćina, kao i na brojne signalne puteve u ćelijama domaćina (Virzi i sar., 2020; Syyam i sar., 2023). Protein C direktno ili indirektno dovodi do povećanja nivoa TGF- β 1, što za posledicu ima sintezu ekstracelularnog matriksa, nastanak fibroze i EMT (Mahmoudvand i sar., 2019; Katsuno i sar., 2019). EMT je indukovana i proteinima E1, E2, NS4B i NS5A (Zou i sar., 2023). Takođe, protein C povećava ekspresiju VEGF i aktivira matriksne metaloproteinaze, što dovodi do angiogeneze, procesa nastanka novih krvnih sudova, koji tumorima omogućava pristup kiseoniku i nutrijentima (Milosevic i sar., 2023). Protein NS5B se vezuje za tumor-supresorski protein Rb i time dovodi do proliferacije ćelije i posledično do karcinogeneze (Munakata i sar., 2005; D'souza i sar., 2020). Proteaza NS3/4A i protein NS5A dovode do aktivacije prolongirajući signalizaciju EGFR (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*) proteina, čija je ekspresija povećana kod približno 50% pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom i većine pacijenata sa cirozom i HCK (Virzi i sar., 2020). Signalizacija EGFR je evolutivno očuvan mehanizam ćelijske transdukcije koji reguliše mnoge vitalne ćelijske funkcije, kao što su proliferacija, diferencijacija i apoptoza (Virzi i sar., 2020). Zatim, proteinom NS5A indukovana stabilizacija faktora transkripcije β -katenina stimuliše ekspresiju onkogenog *c-Myc*, regulatora ćelijske proliferacije i regeneracije jetre (Virzi i sar., 2020).

Proteini NS3 i NS5A direktno, dok protein C indirektno utiču na aktivnost proteina P53 i na taj način stimulišu proliferaciju ćelije (Syyam i sar., 2023).

Hronična infekcija HCV-om izaziva epigenetičke promene, koje dugoročno utiču na obrasce ekspresije gena domaćina. Pokazano je da protein C dovodi do povećanja ekspresije lizin metiltransferaze SMYD3 (eng. *SET and MYND Domain-Containing Protein 3*) (Guo i sar., 2011). SMYD3 je uključena u posttranslacionu modifikaciju hromatina i povezana je sa nastankom i progresijom različitih tipova kancera kod ljudi vezujući se za promotore različitih tumor-supresorskih gena i regulišući na taj način njihovu ekspresiju. Pokazano je da uvećana ekspresija SMYD3 dovodi do metilacije promotora i inhibicije ekspresije i tumor-supresor gena *RASSF1A* (eng. *Ras Association Domain Family Member 1A*), čija se metilacija progresivno povećava sa napredovanjem oštećenja jetre kod obolelih sa hroničnom HCV infekcijom (Guo i sar., 2011; Bernard i sar., 2021). Na ovaj način bi HCV protein C, preko regulacije proteina SMYD3, mogao da reguliše metilaciju i ekspresiju gena *RASSF1A* kod obolelih od hroničnog hepatitis tipa C (Guo i sar., 2011). Drugi način na koji protein C utiče na metilaciju promotora i inhibiciju tumor-supresorskih gena je povećanje ekspresije enzima DNK metiltransferaza (DNMT) (Arora i sar., 2008; Quan i sar., 2014; Toh i sar., 2019; Jang, 2020). Hronična infekcija HCV-om dovodi do metilacije promotorskog regiona različitih tumor-supresorskih gena kao što su geni *p53*, *RASAL1* (eng. *RAS Protein Activator Like 1*), *EGLN3* (eng. *EGL Nine Homolog 3*), *CSMD1* (eng. *CUB and Sushi Multiple Domains 1*), *CDKN2A* (*p16INK4a/ p14ARF*) (eng. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*), *BCORL1* (eng. *BCL 6 Corepressor Like 1*), *SFRP1* (eng. *Secreted Frizzled-Related Protein 1*), *ZNF 382* (eng. *Zinc Finger Protein 382*), *RUNX3* (eng. *Runt-Related Transcription Factor 3*), *LOX* (eng. *Lysyl Oxidase*), *RBI* (eng. *Retinoblastoma 1*), *p73*, *APC* (eng. *Adenomatous Polyposis Coli*) (Milosevic i sar., 2023). Drugi način na koji protein C utiče na metilaciju promotora i inhibiciju tumor-supresorskih gena je povećanje ekspresije enzima DNK metiltransferaza (DNMT) (Arora i sar., 2008; Quan i sar., 2014; Toh i sar., 2019; Jang, 2020). Promene u obrascima metilacije različitih gena su rani događaj u hepatokarcinogenezi, a javljaju se i u ranim fazama fibroze (Zekri i sar., 2014). Pored toga, HCV indukuje modifikaciju histona (Hamdane i sar., 2019; Perez i Gal-Tanami, 2019) i izmenjenu ekspresiju brojnih miRNK, kao što su miR-122, miR-146, miR-150, miR-20a, miR-21-5p, miR-222, miR-27a, miR-30C, miR-335 i miR-378a, miR-503, što takođe za posledicu ima izmenjene obrasce ekspresije gena, progresiju bolesti i nastanak HCC (Xie i sar., 2017; Pascut i sar., 2021; Heredia-Torres i sar., 2022).

1.7. Metilacija molekula DNK

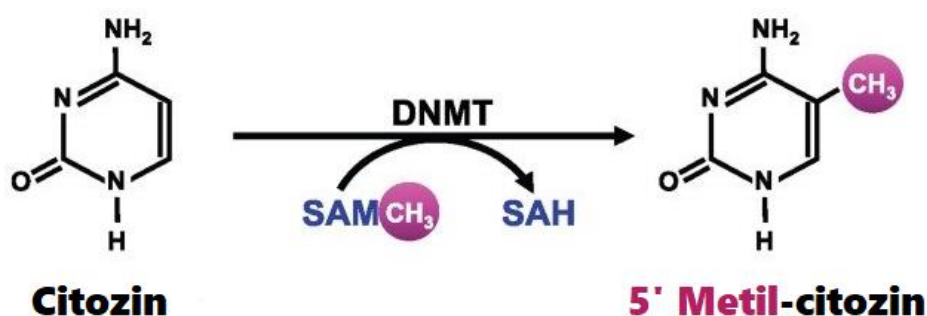
Najbolje proučen epigenetički mehanizam regulacije genske ekspresije koji utiče kako na progresiju bolesti tako i na odgovor na antivirusnu terapiju je metilacija molekula DNK (Zekri i sar., 2014; N Zekri i sar., 2014; Mattei i sar., 2022). Metilacija DNK je kovalentna modifikacija koja se javlja isključivo na C5 poziciji pirimidinskog prstena citozina i skoro uvek u kontekstu CpG dinukleotidne sekvence (Dor i Cedar, 2018). U genomima sisara CpG mesta su retka, kao rezultat mutagenog potencijala 5-metilcitozina (5mC) koji može biti deaminovan u timin (Bird, 1980). Preostala CpG mesta su raspoređena po genomu u okviru nekodirajućih repetitivnih elemenata, gde su metilovana, sa izuzetkom CpG dinukleotida u okviru tzv. „CpG ostrvaca” (eng. *CpG Islands*) (Petryk i sar., 2021). CpG ostrvca su regioni DNK dužine od 0,5 do 4kb sa većom učestalošću citozina i guanina u odnosu na ostatak genoma. Ovi regioni u normalnim fiziološkom uslovima obično nisu metilovani i najčešće se nalaze u promotorskim regionima ili prvim egzonima gena (Mattei i sar., 2022). Većina genskih promotora, otprilike 70%, sadrži CpG ostrvca i to na svojim 5' krajevima (Saxonov i sar., 2006). Konkretno, promotori konstitutivno eksprimirajućih, tj. *housekeeping* gena najčešće sadrže ova „ostrvca” (Gardiner-Garden i Frommer, 1987).

Metilacija DNK je neophodna za utišavanje retrovirusnih elemenata, regulisanje tkivno-specifične ekspresije gena, genetički imprinting i inaktivaciju X hromozoma (Schulz i sar., 2006; Mattei i sar., 2022; Xie i sar., 2023). Približno 45% genoma sisara se sastoji od retrovirusnih

elemenata koji su utišani metilacijom DNK ili genetičkih varijanti koje su nastale kao rezultat deaminacije 5mC (Schulz i sar, 2006). Tokom gametogeneze i ranog embrionalnog razvoja, CpG ostrvca prolaze kroz diferencijalnu metilaciju (Xie i sar., 2023). Regulacija ekspresije gena preko metilacije CpG ostrvaca je posebno važna za uspostavljanje genetičkog imprinting-a (Choi i sar, 2005a). Imprintovani geni se eksprimiraju samo sa jednog od dva nasleđena roditeljska hromozoma. Osim imprintovanih gena, metilacija CpG ostrvaca reguliše ekspresiju gena tokom razvoja i diferencijacije (Mattei i sar., 2022).

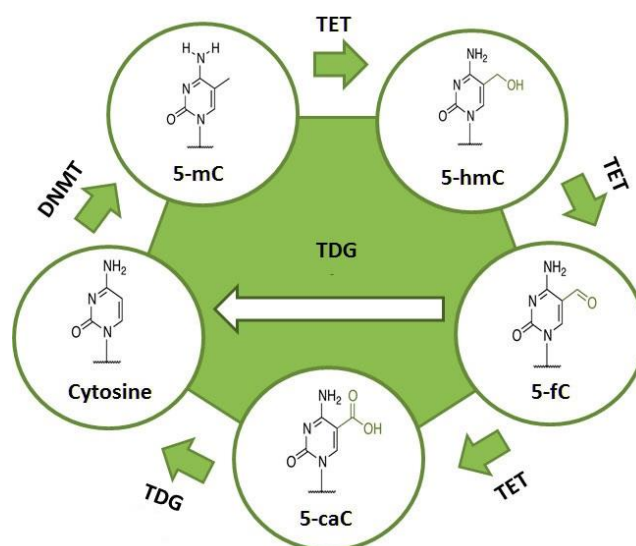
1.7.1. Mehanizam metilacije DNK

Metilaciju DNK katalizuje porodica enzima pod nazivom DNK metiltransferaze koje uz prisustvo S-adenozil-L-metionina (SAM) kao donora metil grupe katališu kovalentno dodavanje metil grupe na C5 poziciju citozina kako bi se formirao 5mC (Mattei i sar., 2022) (Slika 1.6). DNMT1 prvenstveno katalizuje metilaciju hemimetilovane DNK tokom replikacije DNK (Petryk i sar., 2021), održavajući originalni obrazac metilacije prisutan kod roditeljske DNK (Dahlet i sar., 2020). Pored toga, DNMT1 ima sposobnost da popravi metilaciju DNK (Mortusewicz i sar, 2005). DNMT3A i DNMT3B su izuzetno slični po strukturi i funkciji. Za razliku od DNMT1, i DNMT3A i DNMT3B kada su prekomerno eksprimirane, sposobne su da metiluju i nativnu i sintetičku DNK bez preferencije za hemimetilovanu DNK. Iz tog razloga, DNMT3A i DNMT3B se nazivaju *de novo* DNMT, jer mogu da metiluju „golu” DNK (Yagi i sar., 2020). DNMT3B je potrebna tokom ranog razvoja, dok je DNMT3A potrebna za normalnu ćelijsku diferencijaciju (Yagi i sar., 2020). Međutim, poslednjih godina je otkrivena sposobnost DNMT1 da *de novo* metiluje DNK (Wang i sar., 2020; Haggerty i sar., 2021). U muškim gametima je otkriven još jedan član porodice DNMT, DNMT3C, enzim koji štiti ove ćelije od aktivnosti transpozona (Barau i sar., 2016). Poslednji član porodice DNMT je DNMT3L, protein kome nedostaje katalitički domen prisutan kod drugih DNMT enzima (Aapola i sar, 2000). DNMT3L se uglavnom eksprimira tokom ranog razvoja, dok se u odraslom dobu eksprimira u gametima i timusu (Aapola i sar, 2000, 2001). Iako ne poseduje sopstvenu katalitičku funkciju, DNMT3L stimuliše metiltransferaznu aktivnost DNMT3A i DNMT3B (Jia i sar, 2007).



Slika 1.6. Mehanizam metilacije citozina u okviru CpG dinukleotida (Modifikovano iz Zakhari 2013)

Postoji aktivna i pasivna demetilacija. Pasivna demetilacija se javlja tokom deobe ćelije, kada inhibicija ili disfunkcija DNMT1 omogućava novougrađenom citozinu da ostane nemetilovan što potencijalno dovodi do smanjenja ukupnog nivoa metilacije nakon svake ćelijske deobe (Mortusewicz i sar, 2005; Wang i sar., 2020). Aktivna demetilacija se dešava tokom mejoze, održavanja imprintinga i reprogramiranja matičnih ćelija, delovanjem TET (eng. *Ten-Eleven Translocation*) proteina (Ginno i sar., 2020). TET proteini pretvaraju 5mC u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), zatim, dalje oksidacije rezultuju formiranjem 5-formilcitozina (5fC) i 5-karboksilcitozina (5caC), koji se mogu efikasno ukloniti pomoću enzima TDG (eng. *Thymine-DNA Glycosylase*) (Mattei i sar., 2022) (Slika 1.7).



Slika 1.7. Proces metilacije i demetilacije citozina (Modifikovano iz *What Is Epigenetics*, 2013)

1.7.2. Metilacija DNK i regulacija transkripcije

Regulacija transkripcije putem metilacije se odvija smenjivanjem demetilacije CpG dinukleotida unutar promotorskog regiona gena, koja omogućava da se transkripcioni faktori vežu i da dođe do transkripcije, i metilacije CpG dinukleotida koja inhibira vezivanje transkripcionih faktora, a samim tim i transkripciju gena (Mattei i sar., 2022). Metilaciju DNK prepoznaju tri odvojene familije proteina: proteini koji poseduju metil-CpG-vezujući domen (eng. *Methyl-CpG-Binding Domain*, MBD), proteini koji poseduju ubikvitinu sličan domen sa PHD i RING prstima (eng. *Ubiquitin-Like, Containing PHD and RING Finger Domain*, UHRF) i proteini sa cinkanim prstima. MBD proteini sadrže očuvani MBD domen koji ima veći afinitet vezivanja za pojedinačna metilovana CpG mesta (Liu i sar., 2018; Mattei i sar., 2022). Ova porodica uključuje MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 i MBD4 (Liu i sar., 2018). Pored svoje uloge transkripcionog represora, MeCP2 ima jedinstvenu ulogu u održavanju metilacije DNK. MeCP2 se vezuje za DNMT1 preko svog domena za represiju transkripcije (eng. *Transcriptional Repression Domain*, TRD), a zatim regrutuje DNMT1 na hemimetilovanu DNK (Liu i sar., 2018). Članovi proteinske familije UHRF se prvo vezuju za DNMT1, koga zatim usmeravaju na hemimetilovanu DNK kako bi održao metilaciju DNK, posebno tokom replikacije DNK (Ren, 2022). Poslednja familija metil-vezujućih proteina se vezuje za metilovanu DNK svojim domenom cinkanih prstiju i sastoji se od Kaiso, ZBTB4 i ZBTB38 proteina (Filion i sar, 2006). Ova familija proteina, slično porodici MBD, dovodi do represije transkripcije na način koji zavisi od metilacije DNK (Filion i sar, 2006; Kaplun i sar., 2021).

1.7.3. Metilacija DNK i HCV

Dugotrajna infekcija virusom HCV dovodi do metilacije DNK u inficiranim ćelijama jetre (Zhao i sar., 2021). Metilacione promene DNK nakon infekcije se akumuliraju vremenom, dovodeći do metilacionog profila koji odgovara HCK. Sličnost metilacionih profila sugerise da HCV infekcija igra značajnu ulogu u progresiji HCK (Zhao i sar., 2021). Osim hipermetilacije CpG ostrvaca u transkripciono regulatornim regionima i promotorima tumor-supresorskih gena, genom tumora karakteriše i ukupna hipometilacija DNK, uključujući hipometilaciju ponavljajućih DNK sekvenci, kao što su LINE1 (eng. *Long Interspersed Nuclear Element-1*) i Alu elementi, i hipometilaciju regulatornih elemenata i promotora onkogeno (Zhao i sar., 2021).

Prethodna istraživanja su ustanovila da tokom HCV infekcije virusni proteini utiču na metilaciju DNK. Protein C HCV-a značajno povećava ekspresiju DNMT1 (Quan i sar., 2014), i dovodi do

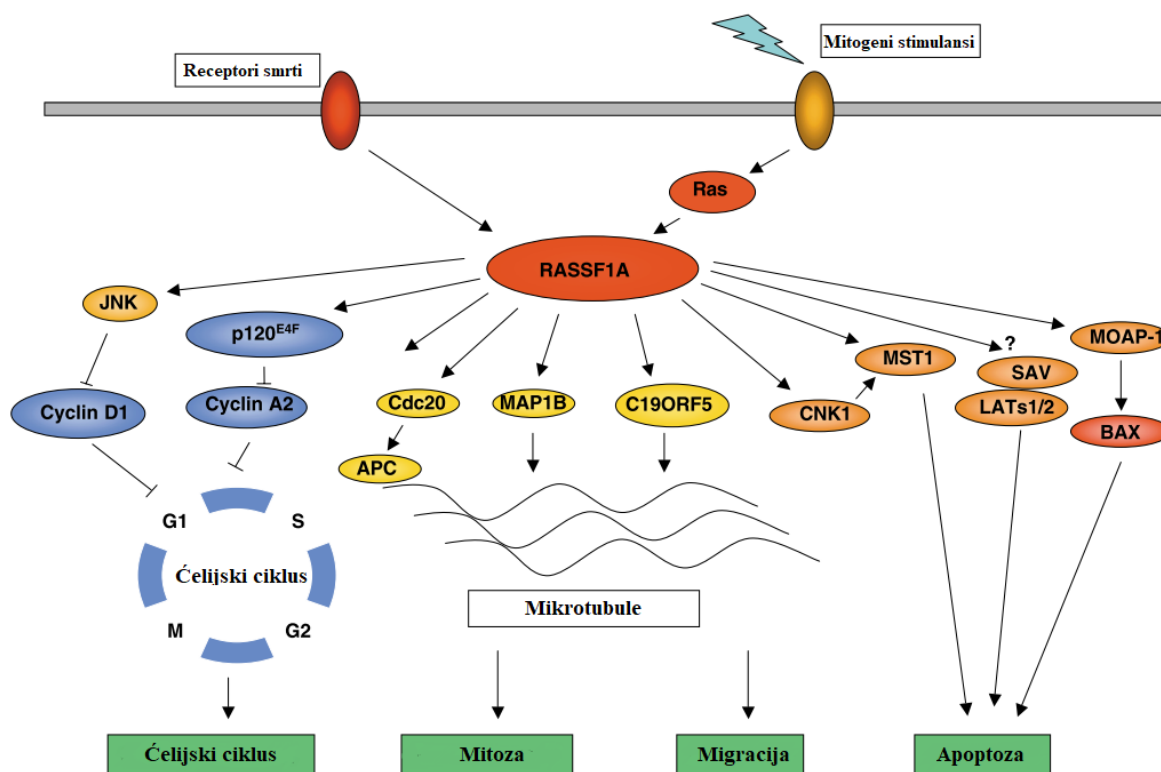
epigenetičkog utišavanja ekspresije tumor-supresorskih gena, metilacijom CpG dinukleotida u promotorskim regionima (Toh i sar., 2019). Tako protein C indirektno, putem hipermetilacije tumor-supresorskih gena, utiče na ključne ćelijske procese i signalne puteve. Jedan od najproučavanijih ćelijskih procesa za koji je pokazano da je epigenetički regulisan HCV-om je proces epitelijalno-mezenhimalne tranzicije. Pokazano je da protein C indukuje EMT preko inaktivacije WNT/ β -katenin signalnog puta. Indukujući hipermetilaciju promotora, protein C epigenetički utišava ekspresiju gena *SFRP* (eng. *Secreted Frizzled-Related Protein*), što dovodi do kontinuirane aktivacije WNT signalnog puta. Metilaciju gena *SFRP* indukuju DNMT1, HDAC1 i MBD proteini koji se vezuju za region blizu mesta početka transkripcije ovog gena (Quan i sar., 2014). Takođe, E-kadherin, koji učestvuje u održavanju kontakta ćelija-ćelija i igra ključnu ulogu u EMT, epigenetički je regulisan proteinom C. Protein C podiže nivo ekspresije DNMT1 i DNMT3B što dovodi do hipermetilacije E-kadherina (Arora i sar., 2008) a na sličan način, dovodi i do hipermetilacije promotora gena *p14ARF*, utičući na apoptozu (Kwak i sar., 2017). Hipermetilacija promotora gena *p14ARF*, za posledicu ima aktivaciju proteina MDM2 (eng. *Mouse Double Minute 2 Homolog*) koji inhibira transkripcionu aktivnost i dovodi do degradacije proteina P53, čime se inhibira apoptoza. Takođe, protein C putem uvećanog nivoa enzima DNMT1, DNMT3A i DNMT3B uzrokuje hipermetilaciju promotorskog regiona gena *p16INK4a* u hepatocitima (Park i sar., 2011; Jang, 2020). Aktivirajući protein AP-1, protein C podstiče ekspresiju DNMT1 (Tsai i sar., 2006). Na ovaj način protein C sprečava zaustavljanje ćelije u G1 fazi ćelijskog ciklusa, odnosno podstiče proliferaciju ćelije. Protein C indukcijom hipermetilacije promotorskog regiona gena *p16INK4a* dovodi do smanjenja nivoa P16INK4a i posledične fosforilacije proteina Rb, što omogućava ćeliji da prevaziđe ćelijsko starenje (Lim i sar., 2012). Konačno, protein C, aktivirajući protein PA28 γ , dovodi do ubikvitin-zavisne proteazomalne degradacije proteina P16INK4a (Cha i sar., 2021). Alternativni put kojim protein C dovodi do povećane ekspresije DNMT1 je fosforilacija proteina Rb, kojom se oslobađa E2F1, čime se stimuliše Rb-E2F put i aktivira ekspresija DNMT1 (Arora i sar., 2008).

Važno je istaći da su pronađene razlike u nivoima ekspresije iRNK i proteina DNMT1 i DNMT3B između različitih genotipova HCV. Oba enzima su pojačano eksprimirana kod genotipa 1b, dok je DNMT3B povećano eksprimiran na nivou proteina kod genotipova 2a i 3a, ali nivo njegove iRNK je isti kod sva tri genotipa (Siddiqui i sar., 2016). U ćelijskoj kulturi je pokazano da su DNMT1 i DNMT3B potrebni za HCV infekciju, ekspresiju proteina i sintezu RNK, što sugerise da oni igraju ulogu u životnom ciklusu HCV-a (Chen i sar., 2013).

Tumor-supresorski geni *RASSF1A* i *p16INK4a* su često inaktivirani metilacijom njihovog promotorskog regiona, ne samo u HCK, već i u različitim stadijumima fibroze i ciroze (Zang i sar., 2011; Mohamed i sar., 2012; N Zekri i sar., 2014).

1.8. Gen *RASSF1A*

Gen *RASSF1* (Familija 1 gena sa Ras asociranim domenom, eng. *Ras Association Domain Family 1*) je tumor-supresorski gen koji se nalazi na hromozomskoj poziciji 3p21.3 i kodira protein *RASSF1A* (Donninger i sar., 2007). Alternativnim splajsovanjem transkripta ovog gena mogu da se dobiju osam različitih izoformi *RASSF1A-RASSFH* (Donninger i sar., 2007). Dve najčešće izoforme su *RASSF1A* i *RASSF1C* (García-Gutiérrez i sar., 2020). *RASSF1A* je multifunkcionalni protein koji posreduje u regulaciji različitih ćelijskih procesa, kao što su zaustavljanje ćelijskog ciklusa, inhibicija nastanka metastaza, stabilizacija mikrotubula, apoptoza, ćelijska migracija i autofagija (Dubois i sar., 2019) (Slika 1.8). Funkcije proteina *RASSF1A* zavise od interakcija sa njegovim efektorima, koje sa druge strane zavise od ekspresije ovog proteina i regulacije iste, kao i njegovih post-translacionih modifikacija (Dubois i sar., 2019).



Slika 1.8. Različiti procesi na koje utiče protein RASSF1A (Modifikovano iz Donniger i sar., 2007)

RASSF1A je inhibitor progresije ćelijskog ciklusa koji učestvuje u regulaciji kompleksa različitih ciklin-zavisnih kinaza i ciklina (García-Gutiérrez i sar., 2020). Jedan od načina na koji RASSF1A učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa je njegova interakcija sa proteinskim kompleksom APC/CDC20 (eng. *Anaphase-Promoting Complex/Cell Division Cycle Protein 20 Homolog*). Ovaj proteinski kompleks reguliše prelazak iz metafaze u anafazu, tako što dovodi do degradacije ciklina S, omogućavajući razdvajanje sestrinskih hromatida (Watson i sar., 2019). RASSF1A inhibira aktivaciju kompleksa APC/CDC20 tako što se vezuje za CDC20 i na taj način održava visok nivo aktivnosti ciklin-zavisne kinase 1 (CDK1, eng. *Cyclin-Dependent Kinases*) (Song i sar., 2004). Takođe, protein RASSF1A učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa i tako što se vezuje i povećava aktivnost transkripcionog faktora p120 E4F, represora ekspresije gena za ciklin A (Ahmed-Choudhury i sar., 2005), kao i vezujući se za protein JNK (eng. *c-Jun N-terminal Kinases*), time smanjujući aktivnost ciklina D1 i povećavajući akumulaciju p27Kip1, CDK2/4 inhibitora (Yoo i sar., 2006).

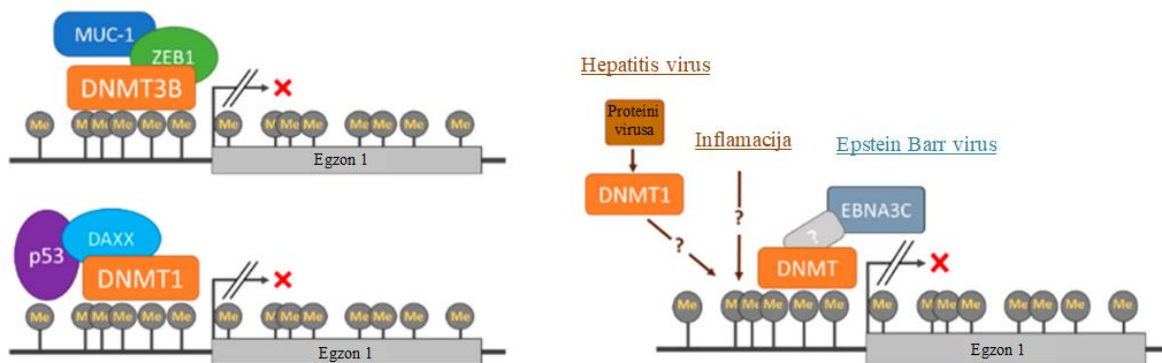
Dodatni način na koji RASSF1A utiče na ćelijski ciklus je podsticanje stabilnosti mikrotubula vezujući se za MAP proteine (eng. *Microtubule-Associated Proteins*, MAPs) kao što su MAP1b, C19ORF5 i MAP4, kao i za različite mikrotubularne strukture, uključujući citoskelet i mitotičko vreteno (Song i sar., 2005; Dallol i sar., 2007). MAP1b i C19ORF5 dovode do polimerizacije tubulina, dok MAP4 podstiče depolimerizaciju mikrotubula (Liu i sar., 2005). Interakcijom sa navedenim proteinima RASSF1A ima ključnu ulogu u regulaciji stabilnosti mikrotubula. Pokazano je da RASSF1A direktno vezan za mikrotubule menja svoju lokaciju tokom deobe ćelije od centrozoma do polova deobnog vretena, utičući na mehanička svojstva ovih struktura (García-Gutiérrez i sar., 2020).

RASSF1A utiče na pokretanje procesa apoptoze, učestvujući u više signalnih puteva, formirajući na taj način kompleksnu signalnu mrežu. RASSF1A aktivira apoptozu tako što aktivira protein MOAP-1 (eng. *Modulator of Apoptosis 1*) na KRAS-zavistan način (eng. *Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog*). Nastanak kompleksa RASSF1A-MOAP-1 sprečava autoinhibiciju

proteina MOAP-1. Ovaj proteinski kompleks stupa u interakciju sa proteinom BAX (eng. *BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*), što dovodi do njegove aktivacije i posledične translokacije u mitohondrije (García-Gutiérrez i sar., 2020). Dodatni način na koji RASSF1A aktivira protein BAX je preko aktivacije MST1 (eng. *Macrophage Stimulating 1*) kinaze. MST1 fosforiliše antiapoptotski protein BCL-xL (eng. *B-cell Lymphoma-Extra Large*), što omogućava translokaciju BAX proteina u mitohondrije (García-Gutiérrez i sar., 2020). MST1 se vezuje direktno za RASSF1A preko svog SARAH (Salvador/Rassf/Hippo) motiva (Praskova i sar., 2004; Hwang i sar., 2007). Pokazano je da RAS podstiče vezivanje RASSF1A za MST1/2 kinaze. Nakon vezivanja RASSF1A za MST1/2 kinaze dolazi do aktivacije ovih kinaza i posledično do apoptoze (Praskova i sar., 2004; Matallanas i sar., 2007). RASSF1A podstiče vezivanje MST2 kinaze za LATS1 (eng. *Large Tumor Suppressor Kinase 1*) kinazu, olakšavajući fosforilaciju LATS1 od strane MST2 kinaze, što dovodi do fosforilacije proteina YAP1 (eng. *Yes1 Associated Transcriptional Regulator*) i njegove translokacije u jedro. U ovom slučaju se formira proteinski kompleks YAP1-p73 koji aktivira transkripciju različitih pro-apoptotskih gena (Matallanas i sar., 2007). KRAS stabilizuje p53 na RASSF1A-zavistan način, tako što aktivirana (fosforilizovana) LATS1 kinaza vezujući se za MDM2 sprečava ubikvitinaciju i degradaciju proteina p53 (Matallanas i sar., 2011; García-Gutiérrez i sar., 2020).

Rho signalni put je jedan od najznačajnijih regulatora nastanka metastaza i RAS-zavisne transformacije ćelija. GTPaza RhoA aktivira ove procese, dok ih GTPaza RhoB inhibira (Chi i sar., 2013). Protein RAS preko RASSF1A negativno reguliše Rho signalizaciju. RhoA stupa u interakciju sa RASSF1A čime se podstiče Smurf1 (eng. *Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1*)-zavisna ubikvitinacija RhoA, dolazi do njegove degradacije i sprečavanja njegove onkogene funkcije (Lee i sar., 2016). Sa druge strane, RASSF1A indukuje defosforilaciju GEFH1 (eng. *Rho/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 2*, ARHGEF2), inhibira NDR2 kinazu (eng. *Serine/Threonine Kinase 38 Like*, STK38L), koja fosforiliše GEFH1, što za uzvrat omogućava GEFH1 proteinu da aktivira anti-metastatsku RhoB GTPazu (Keller i sar., 2019). RhoB takođe poboljšava fosforilaciju YAP posredovanu NDR2, što sprečava YAP da se translocira u jedro i reguliše transkripciju (Keller i sar. 2019). Ovaj signalni put objašnjava zašto gubitak ekspresije *RASSF1A* može dovesti do nastanka metastaza (García-Gutiérrez i sar., 2020).

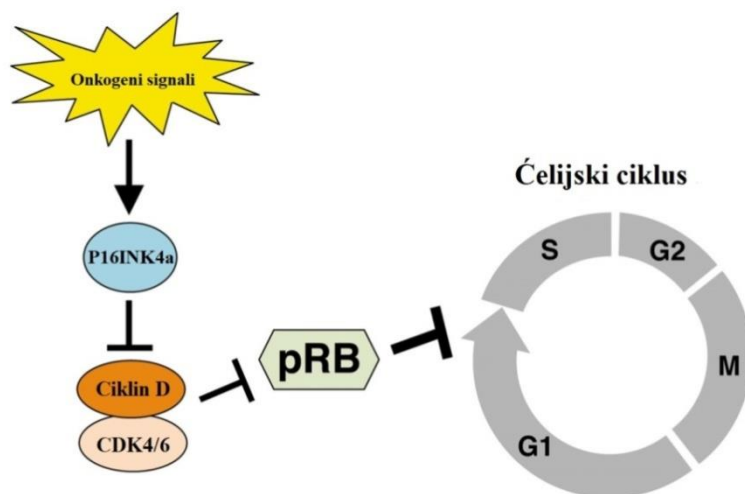
Gen *RASSF1A* je jedan od gena sa najčešće izmenjenom ekspresijom u tumorima (Grawenda i sar., 2015; Raos i sar., 2021). Inaktivacije alela gena *RASSF1A* može biti prouzrokovana kako genetičkim, tako i epigenetičkim promenama, kao i njihovom kombinacijom (Pfeifer and Dammann, 2005; Pan i sar., 2005). Najčešći način promene ekspresije gena *RASSF1A* u tumorima je aberantna hipermetilacija promotorskog regiona ovog gena, koja je jednim delom posledica izmenjene aktivnosti enzima DNMT1, DNMT3A i DNMT3B (Raos i sar., 2021) (Slika 1.9). Uočena je povezanost između metilacije promotorskog regiona gena *RASSF1A* i povećanog rizika za nastanak HCK prouzrokovanog HCV ili HBV infekcijom (Peng i sar., 2020; Nomeir i sar., 2022). Prema podacima iz literature, metilacija gena *RASSF1A* je zastupljena u 16,2-68,4% slučajeva hronične infekcije virusom hepatitisa tipa C, povećavajući se sa progresijom bolesti (Mohamed i sar., 2012; El-Sabakawy i sar., 2015; Mostafa i sar., 2020; Nomeir i sar., 2022). Stoga, u patološkim stanjima kao što su tumori i virusne infekcije, za sam nastanak i progresiju bolesti, hipermetilacija promotorskog regiona gena *RASSF1A* je veoma važna.



Slika 1.9. Regulacija ekspresije gena *RASSF1A* hipermetilacijom promotorskog regiona, posredovana DNMT1 i DNMT3 u interakciji sa različitim proteinim (Modifikovano iz García-Gutiérrez i sar., 2020)

1.9. Gen *p16INK4a*

Lokus *INK4a/ARF* se nalazi na hromozomskoj poziciji 9p21 i sadrži dva tumor-supresorska gena *p16INK4a* i *p14ARF*, koji kodiraju proteine P16INK4a i P14ARF, koristeći dva različita otvorena okvira čitanja (Rocco i Sidransky, 2001). Ovi geni imaju dva zajednička (egzoni 2 i 3) i jedan alternativni egzon (egzon 1 α i egzon 1 β) (Quelle i sar., 1995). Kontrolišući ćelijsku diferencijaciju, rast, starenje i apoptozu, protein P16INK4a se pokazao kao ključni regulator tkivne homeostaze. Ključna uloga P16INK4a je sprečavanje prelaska ćelije iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Slika 1.10). Pod uticajem različitih stresora dolazi do povećanje aktivnosti P16INK4a i njegovog vezivanja za ciklin zavisne kinaze 4 i 6 (CDK4/6), što sprečava formiranje kompleksa ciklin D-CDK4/6. Mutacionim analizama i analizama strukturnih modela, predviđeno je da je treći ANK (ankirinski) ponovak proteina P16INK4a neophodan za njegovo vezivanje i inhibiciju CDK4 (Buj i Aird, 2019). Vezivanje P16INK4a za CDK4 održava protein Rb u hipofosforilisanom stanju, što dovodi do sekvestracije transkripcionih regulatora iz E2F familije, čime se sprečava ekspresija gena povezanih sa proliferacijom i zaustavljane ćelijskog ciklusa u G1 fazi (Serrano, 1997).

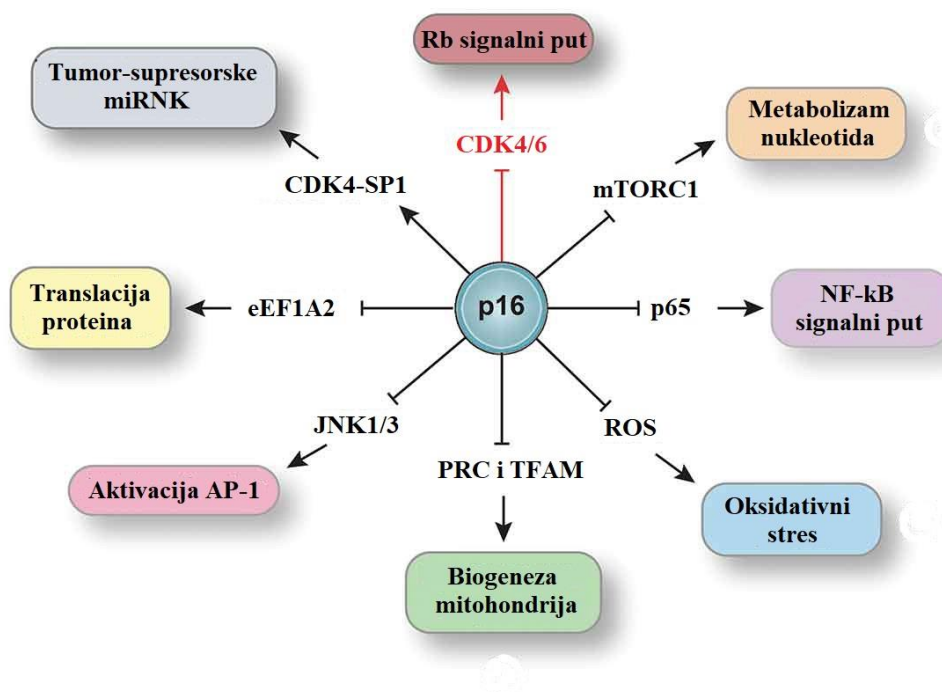


Slika 1.10. *P16INK4a* u regulaciji ćelijskog ciklusa (Modifikovano iz Kotake i sar., 2015)

Dosadašnja istraživanja ukazuju da je ekspresija ovog proteina povećana tokom različitih tipova ćelijskog starenja (senescencije) (Leon i sar., 2021). Različiti stresori, kao što su jonizujuće zračenje, genotoksične hemikalije, reaktivne vrste kiseonika, hemioterapeutske agensi ili nedostatak dNTP, kao i povećana ekspresija onkogena, dovode do senescencije (Itahana i sar., 2004). U

najvećem broju slučajeva do zaustavljanja ćelijskog ciklusa tokom senescencije dolazi usled povećane ekspresije gena *p16INK4a* i povećane aktivnosti proteina P16INK4a, kao direktne posledice različitih signalnih puteva (Deng i sar., 2004), epigenetičkih faktora (Ito i sar., 2018) i transkripcionih faktora (Nakade i sar., 2009), izmenjenih od strane gore navedenih stresora. Tako, na primer, dolazi do pokretanja onkogenom-indukovane senescencije preko P16INK4a/pRb puta, usled aktivacije onkogenog *KRAS* (Bennecke i sar., 2010).

Sve je veći broj dokaza koji ukazuju na dodatne uloge proteina P16INK4a nezavisne od proteina Rb (Slika 1.11). Pokazano je da ćelija supresijom ekspresije ili smanjenjem aktivnosti proteina P16INK4a zaobilazi onkogenima-indukovanu senescenciju, tako što povećava nivo nukleotida i dezoksinukleotida, mehanizmom posredovanim kompleksom mTORC1 (eng. *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) (Leon i sar., 2021). Dodatno, protein P16INK4a se direktno vezuje za subjedinicu p65 kompleksa NF-kB (eng. *Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells*), što dovodi do prekida NF-kB indukovane tumorogeneze u odsustvu I κ B α , najčešćeg inhibitora kompleksa NF-kB (Wolff i sar., 1999). P16INK4a takođe učestvuje u regulaciji odgovora na oksidativni stres, za sada nepoznatim mehanizmom. Ćelije kod kojih je P16INK4a deficitan imaju uvećanu mitohondrijalnu masu i smanjen respiratorni kapacitet, što zajedno dovodi do povećane koncentracije ROS-a (Tyagi i sar., 2017). Sledeći od procesa na koje P16INK4a utiče je aktivacija transkripcionog faktora AP1 (eng. *Activating Protein-1*), koji se aktivira nakon vezivanja P16INK4a za kinaze JNK1/3 (Choi i sar., 2005b). Pored JNK1/3 P16INK4a se direktno vezuje i za eEF1A2 (eng. *Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 2*) i inhibira translaciju proteina (Lee i sar., 2013). Na kraju, P16INK4a reguliše ekspresiju tumor-supresorskih miRNK. Pod uticajem UV zračenja dolazi do formiranja heterokompleksa između proteina P16INK4a, CDK4 i transkripcionog faktora SP1, koji aktivira transkripciju tumor-supresorske miR-141 i miR-146b-5p (Al-Khalaf i sar., 2013).



Slika 1.11. Različite uloge i signalni putevi u kojima učestvuje protein P16INK4a (Modifikovano iz Buj i Aird, 2019)

Gen *p16INK4a* je često deletiran ili metilovan u različitim tipovima maligniteta kod ljudi (Rocco i Sidransky, 2001; Leon i sar., 2021). Hipermetilacija promotorskog regiona ovog gena je prvo ustanovljena u plazmi i serumu pacijenata sa tumorom jetre (Wong i sar., 1999). Zatim je

ustanovljeno da metilacija njegovog promotora u tkivu jetre povećava rizik za nastanak HCK (Zang i sar., 2011). Prema literaturnim podacima, metilacija gena *p16INK4a* se sreće kod 23,5-62% slučajeva hronične infekcije virusom hepatitisa C, rastući sa progresijom bolesti (Kaneto i sar., 2001; Mostafa i sar., 2020; Elsewify i sar., 2020). Delecije ovog gena su takođe česte kod HCK prouzrokovanog hroničnom infekcijom HCV (Forbes i sar., 2010).

Promene u obrascima metilacije mogu se detektovati kako u tkivu tako i u krvi pacijenata na stadijumu prekanceroznih promena (Wong i sar., 1999; Fiegl i sar., 2005). Nedavna istraživanja su pokazala da cirkulišuća DNK, ako se koristi kao neinvazivna „tečna biopsija”, test krvi koji omogućava molekularno testiranje bolesti jetre, potencijalno može promeniti dijagnozu, prognozu i predviđanje odgovora na terapiju kod fibroze, ciroze jetre i HCK (Mann i sar., 2018; Johnson i sar., 2022). Cirkulišuća DNK predstavlja fragmente genomske DNK koji se mogu detektovati u serumu i/ili plazmi obolelih (Mann i sar., 2018). Njena prosečna dužina je oko 180 baznih parova (bp), što se poklapa sa dužinom DNK koja se nalazi u najmanjoj jedinici hromatina, nukleozomu. Stoga je najverovatnije da fragmente cirkulišuće DNK oslobađaju ćelije koje prolaze kroz apoptozu. Duži ili značajno kraći fragmenti od navedenog ukazuju da cirkulišuću DNK mogu da oslobađaju i ćelije koje umiru nekrozom (Jiang sar., 2015).

Dok se različiti modaliteti snimanja, kao što su elastografija zasnovana na magnetnoj rezonanciji (eng. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) i ultrazvuku, široko koriste za procenu steatoze i fibroze jetre, ove tehnike nemaju osetljivost i specifičnost za rane faze fibroze i upale jetre. Jedinu trenutno dostupan biomarker je alfa-fetoprotein, ograničene kliničke primene zbog niske osetljivosti i specifičnosti (Bruix i sar., 2011) što ima za posledicu da i pacijenti sa SVO razviju hronično oštećenje jetre, uključujući i nastanak HCK (Lohmann i sar., 2019; Janjua i sar., 2020; Kanwal i sar., 2020). Biomarkeri koji bi premostili ove nedostatke, trebalo bi da imaju visoku senzitivnost i specifičnost prognozirajući tok i ishod bolesti kao i uspešnost odgovora na antivirusnu terapiju. Upravo, metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, polimorfizam gena *IL28B*, kao i varijabilnost virusnog gena *C* bi potencijalno mogli biti biomarkeri koji bi ispunili ove uslove. Imajući u vidu da se promene u obrascima metilacije DNK javljaju u ranim fazama infekcije, da mogu da opstanu i nakon postizanja SVO (Domovitz i Gal-Tanamy, 2021), kao i da njihov uticaj na odgovor na antivirusnu terapiju još uvek nije razjašnjen, utvrđivanje metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* bi moglo da bude posebno značajano, kako za predikciju odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV, tako i za definisanje grupe ispitanika sa povećanim rizikom za nastanak HCK.

2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada su bili:

1. Formirati homogenu grupu pacijenata u odnosu na karakteristike virusa (tip, podtip).
2. Odrediti metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a* u plazmi periferne krvi pacijenata sa hroničnom infekcijom HCV genotipa 1b.
3. Ispitati polimorfizam rs12979869 gena *IL28B* u genomu ispitanika.
4. Analizirati deo nukleotidne sekvence (C gena) u genomu HCV-a koji kodira protein za nukleokapsid i utvrditi aminokiselinske izmene koje su u korelaciji sa odgovorom na terapiju i stadijumom fibroze i ciroze jetre.
5. Ispitati korelaciju epigenetičkih promena navedenih gena sa svim relevantnim kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika (pol, starost, progresija fibroze jetre i virusološki odgovor pacijenata).
6. Utvrditi moguću asocijaciju genotipa rs12979869 *IL28B* sa odgovorom na terapiju i epigenetičkim promenama kod pacijenata sa hroničnom infekcijom HCV-om.
7. Detektovati aminokiselinske izmene u proteinu C HCV-a koje su u asocijaciji sa metilacionim statusom gena *RASSF1A* i *p16INK4a* i polimorfizmom gena *IL28B*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Pacijenti

Ovom studijom je obuhvaćena homogena grupa od 49 ispitanika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b, lečenih u Kliničkom centru Srbije u Beogradu, u periodu od 2008. do 2020. godine. Studiju je odobrila Etička komisija za rad sa humanim materijalom Instituta za nuklearne nauke „Vinča” u Beogradu (broj odluke 116-8-2/2021-000 od 31.05.2021.). Kao uzorci humanog tkiva korišćeni su uzorci krvne plazme, dobijeni pre početka terapije PEG-IFN/RBV. Prisustvo RNK HCV-a u plazmi, nalaz biopsije jetre koji potvrđuje da se radi o hroničnom hepatitisu C, kao i povećan nivo alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) u serumu pacijenata predstavljaju indikacije za primenu antivirusne terapije, ukoliko nisu prisutne druge kontraindikacije za lečenje antivirusnom terapijom. Odgovor ispitanika na PEG-IFN/RBV terapiju je klasifikovan kao SVO ukoliko virusna RNK nije bila prisutna u plazmi 24 nedelje nakon završetka lečenja i kao BO (bez virusološkog odgovora), ukoliko je virusna RNK bila prisutna u plazmi 24 nedelje nakon prestanka lečenja.

Od osnovnih kliničko-patoloških karakteristika, prikupljenih iz medicinske dokumentacije navedene klinike, za analizu su korišćeni sledeći podaci: 1) pol; 2) starost; 3) virusna RNK / (viremija), izražena u internacionalnim jedinicama po mililitru (IU/mL); 4) stepen histološke aktivnosti i fibroze jetre. Stepenn fibroze jetre je određen prema METAVIR klasifikaciji (Bedossa i Poynard, 1996), zasnovanoj na pet stadijuma fibroze: F0 (bez fibroze), F1 (blaga fibroza), F2 (umerena fibroza sa malo septi), F3 (teška fibroza sa brojnim septama bez ciroze) i F4 (ciroza), sve histopatološke analize tkiva jetre dobijenih biopsijom su odrađena na navedenoj klinici; 5) odgovor na PEG-IFN/RBV terapiju na osnovu prisustva virusne RNK u plazmi ispitanika šest meseci nakon prestanka lečenja. Navedeni podaci su prikazani u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1: Kliničko-patološke karakteristike ispitanika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

Broj uzorka	Pol [†]	Starost	Viremija (IU/mL)	Stadijum fibroze [‡]	Odgovor na terapiju [§]
1	Ž	50	136,000	0	BO
2	Ž	31	820,260	0	SVO
3	M	58	160,000	0	BO
4	Ž	22	440,000	0	SVO
5	M	28	713,000	0	SVO
6	M	40	368,000	0	BO
7	M	30	420,000	0	SVO
8	M	53	180,143	1	SVO
9	M	32	4,325,000	0	BO
10	Ž	35	128,870	0	BO
11	M	37	325,500	0	SVO
12	M	43	30,875	1	BO
13	Ž	56	28,500	0	SVO
14	Ž	40	717,500	0	SVO
15	Ž	50	ND*	1	BO
16	M	22	921,516	0	SVO

Broj uzorka	Pol [†]	Starost	Viremija (IU/mL)	Stadijum fibroze [‡]	Odgovor na terapiju [§]
17	M	30	521,875	1	BO
18	M	53	ND	0	BO
19	Ž	58	42,500	0	SVO
20	M	24	464000	1	SVO
21	M	45	198,965	1	BO
22	M	35	3,519,925	0	BO
23	M	31	15,875	0	SVO
24	Ž	33	918,000	0	BO
25	M	47	36,000	1	SVO
26	Ž	56	305,000	1	SVO
27	M	49	930,000	0	BO
28	M	53	768,600	1	BO
29	Ž	54	554,560	1	SVO
30	Ž	67	1,107,549	1	BO
31	M	34	272,700	0	SVO
32	M	58	21,867,585	1	SVO
33	Ž	49	155,741	0	BO
34	Ž	54	265,000	1	SVO
35	M	33	259,293	0	BO
36	M	45	ND	1	SVO
37	Ž	56	152.250	0	SVO
38	M	55	110.000	0	BO
39	M	60	250000	1	BO
40	M	38	25000000	0	BO
41	M	53	64500000	0	BO
42	M	35	184925	1	BO
43	Ž	35	117150	1	BO
44	M	42	203629	1	SVO
45	M	52	ND	1	BO
46	Ž	53	109700	1	BO
47	Ž	62	446000	1	BO
48	Ž	35	<1000	1	BO
49	Ž	62	406000	0	BO

[†] Pol: Ž-Žene, M-Muškarci; [‡] Stadijum fibroze izražen prema METAVIR sistemu klasifikacije (Rani stadijum-stadijum fibroze (F0 - F2) i Kasni stadijum-stadijum fibroze (F3 - F4)); [§] Odgovor na terapiju: BO-Bez virusološkog odgovora, SVO-Stabilan virusološki odgovor; * ND-podatak nije dostupan

3.1.3. Kontrolni uzorci

Za ispitivanje metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* su korišćene odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole. Kao standardno zdravo tkivo korišćene su MNC periferne krvi zdravih osoba. DNK izolovana iz MNC je služila kao pozitivna kontrola za nemetilovane, odnosno kao negativna kontrola za metilovane alele. Ista DNK, metilovana *in vitro* upotrebom enzima M.SssI (*New England Biolabs*, SAD), a zatim i bisulfitno-modifikovana, služila je kao pozitivna kontrola za metilovane alele gena *RASSF1A* i *p16INK4a*.

3.2. Metode

Za određivanje koncentracije i genotipa HCV-a, analizu metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, određivanje polimorfizma gena *IL28B*, kao i amino-kiselinskih izmena virusnog proteina C, korišćene su sledeće metode molekularne biologije:

1. izolacija RNK HCV iz plazme;
2. koncentracija RNK HCV je određena PCR metodom u realnom vremenu (real time PCR);
3. određivanje genotipa HCV;
4. izolacija cirkulišuće DNK iz plazme periferne krvi i izolacija genomske DNK iz MNĆ periferne krvi zdravih osoba;
5. *in vitro* metilacija molekula DNK izolovane iz MNĆ periferne krvi;
6. bisulfitna modifikacija izolovane cirkulišuće i genomske DNK;
7. umnožavanje željenih fragmenata molekula modifikovane DNK PCR tehnikom specifičnom za metilaciju, MSP (eng. *Methylation Specific PCR*), korišćenjem posebno dizajniranih prajmera za metilovanu, tj. nemetilovanu DNK;
8. analiza rezultata dobijenih u MSP reakcijama elektroforezom na agaroznim i poliakrilamidnim gelovima (PAA);
9. genotipizacija gena *IL28B*;
10. amplifikacija regiona C u genomu HCV RT-PCR metodom;
11. provera rezultata RT-PCR reakcija elektroforezom na poliakrilamidnom gelu;
12. metoda prečišćavanja PCR produkta;
13. automatsko sekvenciranje regiona C;
14. statistička obrada dobijenih rezultata.

3.2.1. Izolacija RNK HCV iz plazme

Ukupna RNK HCV je izolovana standardizovanim kit-om za izolaciju RNK (*Sacace biotechnologies, Como, Italija*) prema protokolu proizvođača, koji se sastoji iz sledećih koraka:

- HCV LYS (pufer za lizu ćelija) pripreman je mešanjem uz blago grejanje na temperaturi od 60 - 65°C;
- Istovremeno je pripremana i HCV IC (interna kontrola) mešanjem na vorteksu u trajanju od 5-10 s;
- Dodavanjem 120 µl HCV IC u bočicu sa HCV LYS dobijen je radni reagens za lizu ćelija. U obeležene tube dodavano je po 450 µl radnog reagensa za lizu ćelija;
- Pripremane su tri tube za kontrole: HCV *Rec IC* (-), HCV *Rec Pos 1 C+* i HCV *Rec Pos 2 C+*;
- U tubu obeleženu za negativnu kontrolu izolacije dodato je 100 µL HCV *Rec IC* (-), potom je dodato po 90 µl ostale dve kontrole u obeležene tube, zatim promešano vorteksovanjem i kratko centrifugirano na sobnoj temperaturi;
- U tube sa radnim reagensom dodato je 100 µl plazme, zatim je kratko vorteksovano;
- U sve obeležene tube je dodato po 25 µl sorbenta koji je pre dodavanja snažno vorteksovano;
- Tube su inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje i vorteksovanje;
- Nakon inkubacije sve tube su centrifugirane 1min na 10000 g na sobnoj temperaturi;
- Nakon odlivanja supernatanta u tube je dodavano 500 µl HCV WB pufer za pranje (eng. *Washing Buffer*), nakon čega su tube kratko vorteksovane;
- Tube sa sadržajem su centrifugirane 1 min na 10000 g na sobnoj temperaturi;
- Nakon odlivanja supernatanta dodavano je po 500 µl 70% etanola u sve tube. Nakon čega su tube vorteksovane, a potom i centrifugirane na 10000 g 1 min i sobnoj temperaturi. Prethodni korak je ponovljen;
- Nakon odlivanja supernatanta dodato je 500 µl acetona u svaku tubu, koje su vorteksovane, a zatim centrifugirane na 10000 g u trajanju od 1 min;

- Uzorci su sušeni oko 10 min na termo bloku na temperaturi od 56°C;
- Nakon sušenja pelet je rastvoren u 50 µl RNK eluenta (rastvarača). Sve tube sa sadržajem su inkubirane 10 min na 56°C na termo bloku, zatim centrifugirane 1 min na 12-14000 g.

Materijal koji smo na ovaj način dobili se koristio za amplifikaciju isti dan nakon izolacije ili je čuvan na -70°C. Kvantitativni test može da se radi RT-PCR tehnikom isti dan nakon izolacije. Kvantitativna interna kontrola (*HCV Rec IC*) predstavlja rekombinantnu RNK i služi kao kontrola uspešnosti svih koraka izolacije nukleinskih kiselina, amplifikacije i detekcije svakog uzorka ponaosob. Uz pomoć *HCV Rec IC* prati se mogući gubitak RNK kao i moguća inhibicija PCR-a za vreme izolacije.

3.2.2. Određivanje koncentracije ukupne virusne RNK (RNK HCV)

Metodom RT-PCR-a u realnom vremenu je određena koncentracija ukupne virusne RNK. Koncentracije RNK HCV-a i koncentracije interne kontrole (HCV IC) su određene simultano u jednoj reakciji („duplex PCR“), a kvantifikacija je obavljena preko standardne krive komercijalnim reagensima baziranim na TaqMan tehnologiji, primenom HCV R-TMQ kita (*Sacace biotechnologies*, Italija).

Prajmeri i probe eseja za kvantitativni test HCV-a su specifični za 5'-UTR HCV. Koncentracija RNK HCV-a i kontrola HCV IC određena je posebno za svaki uzorak očitavanjem fluorescencije na dve različite talasne dužine (*Fam* i *Joe*), izračunata na osnovu serije standardnih razblaženja, a izražena u IU/ml. Prilikom izračunavanja koncentracije RNK HCV koristi se sledeća formula:

$$\frac{\text{HCV DNK kopija/uzorku}}{\text{IC DNK kopija/uzorku}} \times \text{koeficijent} * = \text{IU HCV/ml}$$

* koeficijent je specifičan za svaki lot koji se nalazi u kitu.

Preporučeni faktor konverzije IU HCV/mL u broj kopija/mL za dati reagens je 4.

Nakon izolacije ukupne RNK HCV pripreman je radni reagens za amplifikaciju RNK HCV, na sledeći način:

- U tubu sa DTT, dodato je 300 µl RT - PCR smeše - 1, zatim 200 µl RT - PCR smeše - 2, 20 µl Hot Start Taq Polimeraze i 10 µl M - MLV reverzne transkriptaze (radni reagens DTT, RT - PCR 1 i 2 smeše, stabilan je mesec dana na temperaturi od -20°C).

U obeležene tube je dodato 25 µl radnog reagensa i 25 µl izolovane RNK. Potom je pripremljeno 6 standarda i 1 negativna kontrola. U obeležene tube je dodato po 25 µl standarda za kvantifikaciju RNK HCV (*QS1 HCV*, *QS2 HCV* i *QS3 HCV*) i kvantitativnih standarda IC (*QS1 IC*, *QS2 IC* i *QS3 IC*). U tubu za negativnu kontrolu dodato je 25 µl TE - pufera. Reverzna transkripcija i PCR rađeni su u reakcionoj smeši od 25 µl. Ova metoda je rađena na aparatu *SDS 7500*, *Applied Biosystems* (*Applied Biosystems*, SAD).

3.2.3. Određivanje genotipa HCV-a

Za genotipizaciju HCV-a korišćen je komercijalni *in vitro* test za određivanje HCV genotipova putem reverzne transkripcije i PCR-a, sa genotip specifičnim prajmerima (*HCV Genotype Kit*, *Sacace biotechnologies*, Italija). Glavni koraci za genotipizaciju HCV su: izolacija ukupne RNK HCV, reverzna transkripcija RNK i amplifikacija. U okviru ovog kita nalaze se genotip specifični prajmeri za najučestalije genotipove, a to su: 1a, 1b, 2 i 3a. Nakon izolacije RNK HCV, urađena je reverzna transkripcija. Reverzna transkripcija je podrazumevala pripremu radnog reagensa (Master Mix) na sledeći način:

- U tubu sa RT mixom dodato je 5 μ l RT-G-mixa-1 (smeše), zatim vorteksovano i kratko centrifugirano na sobnoj temperaturi. Master mix pripremljen na ovaj način stabilan je mesec dana na temperaturi od - 20°C.
- Zatim je 6 μ l M-MLV (reverzne transkriptaze) dodato u tubu sa Master mixom, potom kratko vorteksovano i centrifugirano u trajanju od 3 do 5 s.
- U obeležene tube dodavano je 10 μ l reakcionog mixa i 10 μ l izolovane RNK, nakon čega je sledila reakcija reverzne transkripcije u aparatu za PCR na temperaturi od 37°C u trajanju od 30 min.
- Nakon reverzne transkripcije rastvorena je cDNK sa TE puferom u odnosu 1:2. Ovako pripremljena cDNK može da se čuva u frižideru na temperaturi od -20°C mesec dana, a na - 80°C i do godinu dana.
- Zatim su pripremane tube sa komercijalno napravljenim PCR smešama za genotipove 1a/1b i PCR smešama za genotipove 2 i 3a. Potom je dodavano 10 μ l PCR-mix-a 2 i 5 μ l cDNK (uzorka) nakon reakcije RT. U tubu za negativnu kontrolu amplifikacije dodato je 5 μ l DNK pufera.
- 5 μ l HCV cDNK (uzorka) je dodato u tubu sa PCR smešom koja sadrži genotipove 1a i 1b, a zatim i u tubu sa PCR smešom za genotip 2 i 3a.

Temperaturni uslovi pod kojima se odvijala reakcija amplifikacije su bili sledeći: 95°C 5 min (početna denaturacija), potom u 42 ciklusa cDNK se umnožavala na: 95°C 10 s, 68°C 10 s, 72°C 10 s. U poslednjem ciklusu finalna elongacija je trajala 1 min. Na kraju reakcija se završavala hlađenjem na temperaturi od 4°C u trajanju od 5 min. Amplifikovani produkti su se čuvali na temperaturi od - 20°C. Sve reakcije RT - PCR-a sa kitovima *Sacace* su rađene na PCR aparatu, model *Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 2700 i 9700 (Applied Biosystems, SAD)*.

Uspešnost reakcije je proveravana prisustvom ili odsustvom specifičnih traka amplifikovane DNK na 8% PAA. Dužina amplifikovanog fragmenta DNK za genotip 1b iznosila je 395 bp. Komponente za pripremu 8% PAA gela su navedene u Tabeli 3.2.

Tabela 3.2: Komponente za pripremu poliakrilamidnog gela

komponente za 8% gel	količina (25 ml)
PAA štok* 40%	5 ml
10 x TBE**	2,5 ml
10% amonijum persulfat	210 μ l
N, N, N', N' TEMED	16 μ l
ddH ₂ O	17,5 μ l

*38:2 (akrilamid:bis-akrilamid); **10 x TBE pufer, pH 8,3 (108 g Tris, 55 g H₃BO₃, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, ddH₂O do 1000 ml).

3.2.4. Izolacije cirkulišuće DNK

Cirkulišuća DNK je izolovana iz plazme periferne krvi ispitanika koristeći komercijalno dostupne kitove QIAmp UltraSens (*Qiagen, GmbH, Nemačka*) i Ribo-Sorb-100 (HCV Quant) RNA/DNA Extraction Kit (*Sacace Biotechnologies, Italija*), prema uputstvima proizvođača.

3.2.5. Izolacije genomske DNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi

Iz taloga MNĆ periferne krvi koji je dobijen prema protokolu koji je opisao Boyum (1968), izolovana je genomska DNK klasičnom fenol/hloroform/izoamil-alkohol procedurom (Ausubel, 1987). Nakon digestije i fenolske ekstrakcije DNK, usledila je precipitacija i rastvaranje molekula DNK prema protokolu:

- u svaki uzorak je dodato po 500 μ l digestionog pufera koji u finalnoj koncentraciji sadrži 25 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM TRIS-HCl, pH 8,0; 0,5 % SDS i 100 μ g (19,6 mg/ml) proteinaze K (Thermo Fisher Scientific, SAD);
- uzorci su inkubirani preko noći na temperaturi 50-55°C, uz povremeno mućkanje;
- u svaki uzorak (500 μ l) dodata je ista količina smeše koja sadrži fenol/hloroform/izoamil-alkohol (F/H/I) u odnosu 25:24:1, nakon čega je mućkano ručno 10 min, uzorci su zatim centrifugirani 5 min/10600g, pa je izdvojena vodena faza i prebačena u novu epruvetu;
- postupak sa fenolom je ponovljen još 1-2 x;
- vodenoj fazi je dodata ista zapremina smeše H/I (24:1), nakon čega je mućkano ručno 10 min i centrifugirano 5 min/10600 g;
- vodena faza je izdvojena u novu epruvetu;
- vodenoj fazi je dodata 1/10 zapremine 3 M natrijum acetata, pH 5,2 i 2 zapremine hladnog apsolutnog EtOH, nakon čega je, uz ručno mućkanje, došlo do precipitacije DNK u vidu končica;
- makroskopski vidljivi končići DNK su zatim namotani na staklenu Pasterovu pipetu, zatopljenog i zakrivljenog vrha;
- DNK je isprana uranjanjem Pasterove pipete u 70% EtOH, a zatim je sušena na vazduhu 15 min, rastvorena u 100-200 μ l ddH₂O i odložena na 4°C.

3.2.6. Određivanje koncentracije izolovane cirkulišuće i genomske DNK

Koncentracija i kvalitet izolovane DNK određeni su merenjem apsorbance na spektrofotometru BioSpec-nano (*Shimadzu Corporation*, Japan). Maksimum apsorbance za nukleinske kiseline je na 260 nm i na osnovu njega se računa koncentracija DNK u našem izolatu (1OD = 50 ng). Maksimum apsorbance soli je na 230 nm, a za proteine na 280 nm. Visoko prečišćena DNK ima odnos apsorbanci A₂₆₀/A₂₈₀ > 1,8 (Glasel, 1995), što je bio slučaj i sa našim uzorcima.

3.2.7. *In vitro* metilacija molekula DNK izolovane iz mononuklearnih ćelija periferne krvi

U cilju dobijanja kontrolne DNK, kod koje će svi CpG dinukleotidi biti metilovani, DNK izolovana iz MNĆ periferne krvi zdravih osoba tretirana je komercijalno dostupnim enzimom CpG metiltransferazom M.SssI (*New England Biolabs*, SAD). Reakcija se odvijala u zapremini od 20 μ l. Na 2 μ g izolovane DNK iz MNĆ periferne krvi zdravih osoba, dodata su 2 μ l 10 x M.SssI pufera (finalna koncentracija 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 0,4 μ l 32 mM SAM (finalna koncentracija 0,64 mM) i 8 j enzima M.SssI (4 j/ μ g DNK). Uzorci su inkubirani 4 h/37°C, nakon čega je usledila inaktivacija enzima dodatnim inkubiranjem 20 min/65°C. Tako metilovana DNK je čuvana na 4°C do bisulfitne modifikacije.

3.2.8. Bisulfitna modifikacija izolovane DNK

Izolovana DNK je modifikovana korišćenjem *EZ DNA Methylation*TM kit-a (*Zymo Research*, SAD). Ova metoda zasniva se na hemijskoj modifikaciji citozina, čime se nemetilovani citozini prevode u uracil, dok metilovani citozini ne podležu ovoj modifikaciji. Postupak modifikacije je izvršen po protokolu preporučenom od strane proizvođača:

- zapremini uzorka koji sadrži 500 ng DNK je dodato 5 μ l *M-Dilution Buffer*-a i dopunjeno vodom do ukupne zapremine od 50 μ l, a zatim su uzorci inkubirani 30 min na 42°C;
- nakon inkubacije svakom uzorku je dodat *CT Conversion Reagent* u zapremini od 100 μ l nakon čega su uzorci inkubirani 12-16 sati u mraku na 50°C, a zatim su inkubirani 10 min do 20 sati na 4°C;

Nakon bisulfitne modifikacije, DNK je prečišćena sledećim postupkom:

- dodato je 400 µl MBB (eng. *M-Binding Buffer*) na *Zymo-Spin*TM kolonicu, pa je kolonica stavljena u tubu za prikupljanje;
- modifikovani uzorak je dodan na *Zymo-Spin*TM kolonicu koja sadrži MBB, pa je ceo sadržaj promešan okretanjem kolonice nekoliko puta;
- uzorci su centrifugirani na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s), nakon čega je rastvor odliven;
- dodato je 100 µl MWB (eng. *M-Washing Buffer*) na kolonicu, pa su uzorci centrifugirani na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s);
- dodato je 200 µl LDB (eng. *L-Desulphonation Buffer*) na kolonicu, nakon čega su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi 15-20 min. Uzorci su zatim centrifugirani na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s);
- na svaku kolonicu je dodato 200 µl MWB, pa su uzorci centrifugirani na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s). Ovaj korak ispiranja je ponovljen;
- kolonice su stavljene u tube od 1,5 ml i u svaku je dodato 10 µl MEB (eng. *M-Elution Buffer*), direktno na matriks kolonice. Nakon toga su tubice sa kolonama centrifugirane na maksimalnoj brzini (>10000g /30 s) kako bi se eluirala DNK.
- ovako modifikovana i prečišćena DNK je čuvana na -20°C i predstavljala je matricu za amplifikaciju MSP tehnikom.

3.2.9. Amplifikacija molekula DNK MSP tehnikom

Metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INKa* ispitivan je amplifikacijom modifikovane DNK PCR tehnikom specifičnom za metilaciju - MSP. Za razlikovanje nemetilovanih od metilovanih promotrskih regiona analiziranih gena, korišćena su dva seta prajmera, specifičnih za nemetilovanu, odnosno metilovanu modifikovanu DNK. Za svaki uzorak modifikovane DNK izvedene su po dve PCR reakcije za odgovarajući gen, upotrebom dva seta prajmera. U Tabeli 3.3 su prikazane sekvence prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju gena *RASSF1A* (Wang i sar., 2008) i *p16INKa* (Herman i sar., 1996).

Tabela 3.3: Prajmeri za MSP

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Dužina produkta (bp)/ Temperatura hibridizacije
<i>RASSF1Am</i>	<i>s</i> GGGTTTTGCGAGAGCGCG <i>a</i> GCTAACAAACGCGAACCG	169 bp / 60°C
<i>RASSF1An</i>	<i>s</i> GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG <i>a</i> CACTAACAAACACAAACCAAAC	169 bp / 55°C
<i>p16INK4am</i>	<i>s</i> TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC <i>a</i> GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150 bp / 60°C
<i>p16INK4an</i>	<i>s</i> TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT <i>a</i> CAACCCCAAACCAACCATAA	151 bp / 60°C

m, metilovan; n, nemetilovan; s, sens; a, antisens; bp, bazni par

Pored uzoraka, korišćene su i „slepa kontrola“ za proveru specifičnosti reakcije (ddH₂O umesto DNK), kao i pozitivna i negativna kontrola za uzorke (nemetilovana i *in vitro* metilovana DNK izolovana iz MNC periferne krvi zdravih osoba). MSP je izvođen na PCR aparatu *Applied Biosystems 2720* (*Applied Biosystems*, SAD) u Eppendorf epruветama (0,2 ml) u finalnoj zapremini od 25 µl. Amplifikacija se odvijala u toku 40 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije DNK (45 s na 95°C), hibridizacije (50 s za gen *RASSF1A*, 45 s za gen *p16INKa*, na odgovarajućoj temperaturi u zavisnosti od korišćenih prajmera, Tabela 3.2) i elongacije prajmera (60 s na 72°C). Prvi ciklus amplifikacije je započet sa 5 min inicijalne denaturacije na 95°C, a u poslednjem je elongacija produžena na 4 min na 72°C. Za svaku PCR reakciju su pripremljene odgovarajuće PCR smeše u čiji sastav ulaze komponente prikazane u Tabeli 3.4.

Tabela 3.4: Sastav smeše za MSP

Komponente	Finalna koncentracija u 25 μ l	
	<i>RASSF1A</i>	<i>p16</i>
10 x PCR pufer*	2,5 x	2,5 x
25 mM MgCl ₂	6,7 mM	6,7 mM
10 mM dNTP	3,125 mM	3,125 mM
50 μ M <i>RASSF1A/p16 sense</i> prajmeri	0,43 μ M	0,4 μ M
50 μ M <i>RASSF1A/p16 antisense</i> prajmeri	0,45 μ M	0,46 μ M
100% DMSO	/	1,25%
20 mg/ml BSA	/	0,5 mg/ml

*pufer koji je korišćen za PCR je napravljen prema protokolu koji su dali Herman i sar., (1996) i omogućava specifičnu i visoko efikasnu amplifikaciju. MgCl₂ koji prema originalnom protokolu ulazi u sastav 1 x PCR pufera je dodavan posebno u PCR reakcionu smešu. Sastav 10 x pufera: 16,6 mM amonijum sulfat, 67 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM 2-merkaptoetanol.

Nakon dodavanja i mešanja svih komponenti, jednaka zapremina reakcione smeše je podeljena u epruvete za PCR, nakon čega je dodato po 1 μ L zapremine modifikovane DNK. Epruvete su postavljene u aparat za PCR, gde su zagrevane 5 min/95°C (inicijalna denaturacija) i nakon isteka ovog vremena u svaku epruvetu je dodata po 1 jedinica *Taq* polimeraze (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) razblažene u 2,8 μ L ddH₂O, u tzv. „hot-start“ reakciji. „Hot-start“ reakcija se izvodi u cilju povećanja specifičnosti amplifikacije molekula DNK.

3.2.10. Analiza uspešnosti i specifičnosti PCR reakcija metodom elektroforeze

Detekcija produkata MSP reakcije za gene *RASSF1A* i *p16INK*, kao i njihovo razdvajanje na osnovu dužine, vršena je elektroforezom na agaroznom i poliakrilamidnom gelu. Utvrđivanje dužine ispitivanih fragmenata je vršeno u odnosu na odgovarajući marker, *GeneRuler 50 bp* (*Thermo Fisher Scientific, SAD*).

3.2.10.1. Elektroforeza na agaroznom gelu

Provera uspešnosti MSP reakcija je rađena na 1,8% agaroznom gelu koji je pripreman prema sledećem protokolu prikazanom u Tabeli 3.5.

Tabela 3.5: Komponente za pripremu agaroznog gela

komponente za 2% gel	količina(50 ml)
Agaroz	0,9 g
10xTAE*	5 ml
SYBR Green I (<i>Sigma, SAD</i>)	5 μ l
ddH ₂ O	45 ml

*10xTAE pufer, pH 8,0 (48,4 g Tris, 11,42 ml CH₃COOH, 20 ml 0,5 M EDTA, ddH₂O do 1000 ml).

Razdvajanje fragmenata DNK odvijalo se na sistemu za horizontalnu elektroforezu u električnom polju jačine 120 V (7,5 V/cm) u trajanju od 40 min. Na gel je nanošeno po 10 μ l uzorka pomešanog sa 2 μ l boje bromfenol plavo (0,25% bromfenol plavo, 0,25% ksilen-cijanolo u 30% glicerolu). Vizuelizacija traka nakon elektroforeze odvijala se pod UV-svetlošću transiluminatora.

3.2.10.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Razdvajanje fragmenata DNK i analiza rezultata MSP reakcije, vršena je elektroforezom na 6% PAA gelu u nenedenaturišućim uslovima. Gel je pripreman prema protokolu prikazanom u Tabeli 3.6.

Tabela 3.6: Komponente za pripremu poliakrilamidnog gela

komponente za 6% gel	količina (25 ml)
PAA štok* 40%	5 ml
10 x TBE**	2,5 ml
10% amonijum persulfat	210 µl
N, N, N', N' TEMED	16 µl
ddH ₂ O	17,5 µl

*38:2 (akrilamid:bis-akrilamid); **10 x TBE pufer, pH 8,3 (108 g Tris, 55 g H₃BO₃, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, ddH₂O do 1000 ml).

Elektroforeza se odvijala u vertikalnom polju u kadama sa 1x TBE puferom, u trajanju od 5 min/90 V (4 V/cm), a zatim 75 min/140V (7,5 V/cm). Na gel je nanošeno po 10 µl uzorka pomešanog sa 2 µl boje bromfenol plavo (0,25% bromfenol plavo, 0,25% ksilen-cijanolo u 30% glicerolu). Vizuelizacija razdvojenih DNK fragmenata na gelu izvršena je postupkom bojenja srebronitratom prema sledećem protokolu (Hiort i sar., 1994):

- 10% rastvor EtOH, 5-10 min;
- 1% rastvor HNO₃, 3 min;
- ispiranje u ddH₂O, 2-3x po 1 min;
- 0,2% rastvor AgNO₃ (500 mg AgNO₃ u 250 ml ddH₂O), 20-30 min;
- ispiranje u ddH₂O, 2-3x po 1 min;
- 2,96% Na₂CO₃ sa 0,02% formaldehidom (9 g Na₂CO₃/300 ml ddH₂O + 227 µl formaldehida), do pojave traka;
- fiksiranje u 10% CH₃COOH, nekoliko minuta;
- ispiranje u ddH₂O i pakovanje gela u plastičnu foliju.

3.2.11. Genotipizacija gena *IL28B*

Polimorfizam jednog nukleotida rs12979860, gena *IL28B*, je analiziran korišćenjem Custom® SNP Genotyping Assays (*Applied Biosystems*, SAD), sa alel specifičnim TaqMan probama koje su dizajnirane i prijavljene ranije (Alestig i sar., 2011). Genotipizacija je urađena na ABI-7500 PCR aparatu (*Applied Biosystems*, SAD) u 25 µl reakcionoj zapremini koja sadrži 10 ng DNK, 12,5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix i 1,25 µl (40x) Custom® SNP Genotyping Assays.

3.2.12. Amplifikacija regiona C u genomu HCV-a RT-PCR metodom

Za amplifikaciju C regiona HCV-a korišćen je One-step RT-PCR, nakon kojeg je usledila druga PCR reakcija. Za reverznu transkripciju izolovane HCV-RNK je korišćen One-Step RT-PCR Kit (*QIAGEN GmbH*, Nemačka) prema protokolu proizvođača. Amplifikaciona mešavina RT-PCR reakcije je sadržala 5 µL izolovane ukupne RNK HCV. RT-PCR se odvijala u 35 ciklusa (reverzna transkripcija na 50°C tokom 30 minuta i 95°C tokom 15 minuta), nakon čega je usledila amplifikacija na 94°C tokom 45 s, 56°C tokom 45 s, 72°C za 45 s i konačna elongacija na 72°C tokom 7 min. Prajmeri za region C, koji su korišćeni za RT-PCR i drugu PCR reakciju su dizajnirani korišćenjem Primer-BLAST (Tabela 3.7).

Tabela 3.7: Prajmeri za amplifikaciju C regiona virusa hepatitisa C genotipa 1b

	Smer	Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Pozicija [†]
RT i prvi PCR	Sens	G1+	CGCGCGACTAGG	478-487
	Antisens	G2	ATGTACCCCATGAGGTCGGC	720-739
Drugi PCR	Sens	F2	GGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	307-327
	Antisens	G2	ATGTACCCCATGAGGTCGGC	720-739

[†] Položaji nukleotida prema HCV 1b prototipu HCV-J (pristupni broj D90208)

Jedan µl PCR proizvoda je korišćen kao matrica za drugu PCR reakciju. Mešavina amplifikacije nested PCR reakcije sadržala je 1,75 jedinica DreamTaq polimeraze (*Thermo Fisher Scientific*, Litvanija), 2,5 µl 10x PCR pufera sa MgCl₂, 2 µl dNTP (10 mM svaki), 0,25 µl svakog internog prajmera (40 pmol konačne koncentracije 0,6 µM). Dodata je destilovana voda bez DNaza/RNaza da bi se dobila konačna zapremina od 25 µl. Protokol amplifikacije je uključivao početnu denaturaciju tokom 3 minuta na 95°C, nakon čega je usledilo 30 ciklusa amplifikacije na 94°C tokom 45 s, 60°C tokom 45 s i 72°C tokom 60 s, zatim je usledila konačna elongacija na 72°C tokom 7 min. RT-PCR i nested PCR su izvedeni na PCR aparatu Applied Biosystems Gene Amp® PCR Sistem 9700 (*Applied Biosystems*, SAD). Konačni PCR proizvodi (dužine 433 bp) su razdvojeni elektroforezom na 6% PAA gelovima i obojeni srebro nitratom i natrijum karbonatom.

3.2.13. Metoda prečišćavanja PCR produkta

Nakon amplifikacije, PCR produkti su prečišćeni od zaostalih komponenti reakcije. Za prečišćavanje je korišćen Kit za ekstrakciju DNK (*MBI Fermentas*, Litvanija). Prečišćavanje se zasniva na sledećem principu: u prisustvu haotropnih soli, 6 M rastvora natrijum jodida (eng. *Binding Solution*, BS), DNK se vezuje za specijalno dizajnirane staklene čestice, a zatim da bi se dobila prečišćena DNK, ove soli i zaostale nečistoće se uklanjaju ispiranjem u odgovarajućim puferu koji sadrži u jednakom odnosu supstance (Tris, NaCl, EDTA) i 95% etanol (eng. *Washing Buffer*, WB). Nakon ispiranja, DNK se eluira sa staklenih čestica pomoću ddH₂O ili odgovarajućeg pufera. Metoda prečišćavanja se izvodila na sledeći način:

- Sadržaj PCR produkta u tubi podeljen je na dva jednaka dela i potom je dodavano 3 volumena BS rastvora i odgovarajuće zapremine resuspendovane silika-puder suspenzije koja sadrži staklene čestice za vezivanje DNK (2 µl suspenzije vezuje 1µg DNK). Tube su inkubirane na temperaturi od 55°C u trajanju od 5 - 15 min, sa kratkim vorteksovanjem svaka 2 min, potom su sve tube centrifugirane 5s na 10000 g.
- Nakon odlivanja supernatanta dodavano je 500 µl hladnog WB. Pelet je razbijan nastavkom automatske pipete, zatim su tube centrifugirane 5 s na 10000 g, nakon čega je ponovo odliven supernatant. Navedeni postupak je ponovljen još 2 puta.
- Uzorci u tubama su sušeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 - 15 min.
- Ispiranje cDNK je rađeno dodavanjem 40 µl 1 mM TRIS-HCl, pH 8.0, potom je pelet razbijan nastavkom automatske pipete, nakon čega su tube sa uzorcima inkubirane u trajanju od 5 min na 55°C.
- Nakon inkubacije sve tube su centrifugirane 30 s na 11000 g, nakon čega je supernatant odliven u novu tubu. Ovaj postupak je ponovljen još 2 puta sa istom količinom 1 mM TRIS- HCl, pH 8.0.
- Nove tube sa odlivenim supernatantom centrifugirane su u trajanju od 20 min na 13000 g pri temperaturi od 4°C, nakon čega je supernatant odliven u čiste tube i dodana je 1/2 volumena 70% etanola, potom centrifugirano 10 min na 13000 g na temperaturi od 4°C.

Nakon odlivanja supernatanta uzorci su sušeni u trajanju od 15 - 30 min dok sav etanol ne upari.

- cDNK je rastvorena u 40 μ l ddH₂O ili 1 mM TRIS-HCl, pH 8.0 i može se čuvati na temperaturi od -20°C. Ovako prečišćen PCR produkt je bio spreman za automatsko DNK sekvenciranje.

3.2.14. Automatsko sekvenciranje regiona C

Svi virusni izolati su sekvencirani na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Institut za mikrobiologiju i imunologiju. Automatsko sekvenciranje amplifikovanog fragmenta iz regiona C genoma HCV-a rađeno je na automatskom sekvenatoru metodom završetka lanca (*ABI 310, Applied Biosystems, SAD*). Metoda je bazirana na kapilarnoj elektroforezi sa fluorescentno obeleženim ddNTP-ovima (Sanger i sar., 1997). Rezultati automatskog sekvenciranja su dobijeni u vidu grafičkog i slovnog zapisa, nakon čega se moglo pristupiti detaljnoj analizi sekvence primenom različitih metoda. Sekvenciranje je rađeno sa kombinacijom prajmera: G1+, G2 i F2. Za analizu amino-kiselinskih supstitucija i sličnosti između sekvenci korišćeni su programi Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information NCBI*) Blastp (protein-protein BLAST). Sve sekvence iz regiona C HCV-a su poređene sa referentnom sekvencom HCV-J (GenBank, pristupni broj D90208) za genotip 1b.

3.2.15. Statistička obrada rezultata

Deskripcija numeričkih obeležja je urađena klasičnim metodama opisne statistike i to aritmetičkom sredinom, i medijanom od srednjih vrednosti, a od mera varijabiliteta standardnom devijacijom, koeficijentom varijacije i standardnom greškom, kao i minimalnom i maksimalnom vrednošću. Relativni brojevi su korišćeni u svim tabelama. Za poređenje razlike između učestalosti kod neparametarskih obeležja i to za jedno odnosno dva obeležja korišćen je Pirsonov χ^2 -test, i to u obliku testova slaganja i tablica kontingencija, za poređenje razlike između učestalosti kod neparametarskih obeležja i to za jedno odnosno dva obeležja. Kod numeričkih ograničenja tablice 2x2 primenjen je Fišerov test tačne verovatnoće. Za utvrđivanje razlike srednjih vrednosti kontinualnih varijabli koje su u normalnoj raspodeli između dve grupe korišćen je t - test za nezavisne uzorke ili Mann Whitney U-test kao neparametrijski test za kontinualne varijable koje nisu bile u normalnoj raspodeli. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) ili broj (procenat). P vrednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim. Sve statističke analize su obavljene korišćenjem licenciranog softverskog paketa za statističku analizu Sigma Plot 14.0.

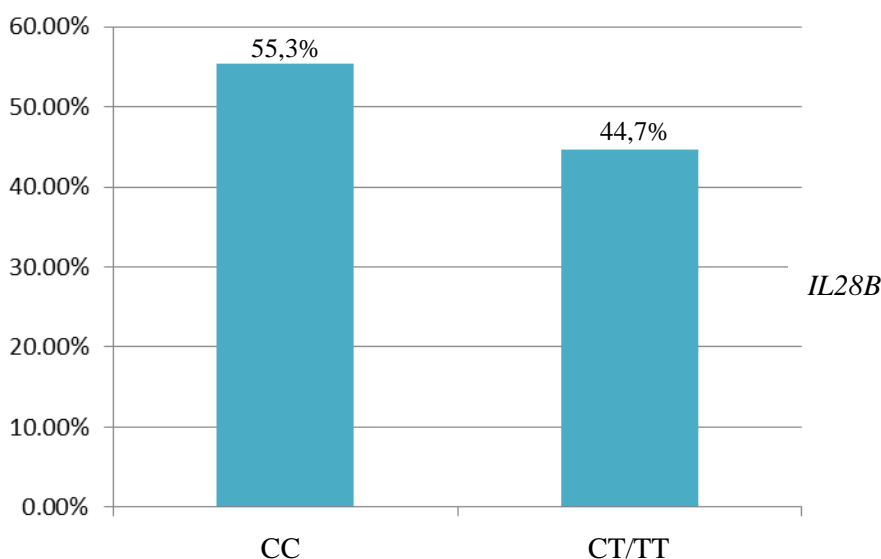
4. REZULTATI

4.1. Analiza kliničko-patoloških karakteristika bolesnika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

Grupa obolelih sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b je obuhvatala 49 ispitanika, od kojih je 20 (40,8%) ispitanika bilo ženskog i 29 (59,2%) ispitanika muškog pola, prosečne starosti $44,3 \pm 11,8$ godina (opseg 22-67). Stabilan virusološki odgovor na kombinovanu PEG-IFN/RBV terapiju je postignut kod 42,9% (21/49) ispitanika, dok 57,1% (28/49) ispitanika nije odgovorilo na terapiju. Prema METAVIR sistemu klasifikacije stadijuma fibroze, 55,1% ispitanika je klasifikovano u grupu sa ranim stadijumom, koji obuhvata odsustvo fibroze, blagu do umerenu fibrozu sa malo septi, dok je 44,9% (22/49) ispitanika klasifikovano u grupu sa kasnim stadijumom fibroze, koji obuhvata tešku fibrozu sa brojnim septama, kao i cirozu jetre.

4.2. Ispitivanje polimorfizma rs12979860 gena *IL28B*

Analizom polimorfizma rs12979860 u blizini gena *IL28B*, genotip CC je detektovan kod 55,3% (26/47) ispitanika, dok je genotip CT detektovan kod 21,3% (10/47) ispitanika, a genotip TT kod 23,4% (11/47) ispitanika. Genotipovi CT/TT su u daljim analizama objedinjeni u jednu grupu i detektovani su kod 44,7% (21/47) ispitanika (Slika 4.1). Analiza polimorfizma rs12979860 gena *IL28B* nije uspela kod dva ispitanika.



Slika 4.1. Distribucija genotipova polimorfizma rs12979860 gena *IL28B* među ispitanicima sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

Ispitanici sa genotipom CC polimorfizma rs12979860 gena *IL28B* bili su statistički značajno mlađi od onih sa genotipovima CT/TT ovog polimorfizma ($41,9 \pm 11,9$ vs. $48,9 \pm 10,1$; $p=0,039$; Studentov t-test; Tabela 4.1). U odnosu na odgovor na terapiju, uočili smo da su ispitanici sa genotipom CC gena *IL28B* bili učestaliji u SVO grupi (95% vs. 25,9%), dok su ispitanici sa genotipovima CT/TT bili češću u BO grupi (74,1% vs. 5%), ($p<0,001$, Fišerov test tačne verovatnoće; Tabela 4.1). Daljom analizom nije ustanovljena povezanost genotipa gena *IL28B* sa polom ispitanika, stadijumom fibroze i koncentracijom ukupne HCV RNK (Tabela 4.1).

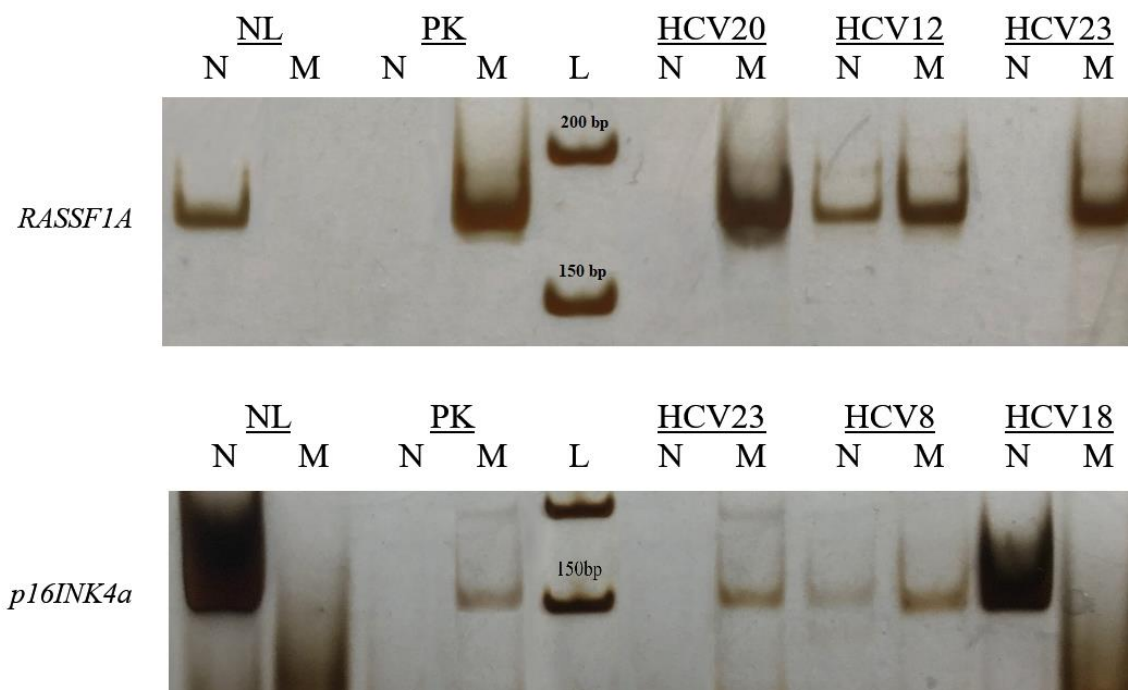
Tabela 4.1. Distribucija genotipova gena *IL28B* prema odgovoru na terapiju i osnovnim karakteristikama ispitanika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

Kliničko-patološke karakteristike	Genotip gena <i>IL28B</i>		p
	CT/TT	CC	
Starost (Godine) †	48,857 ± 10,101	41,923 ± 11,883	0,039*
Pol			
Muški	13/29 (44,8%)	16/29 (55,2%)	0,782
Ženski	8/18 (44,4%)	10/18 (55,6%)	
Stadijum fibroze ‡			
F0 - F2	11/26 (42,3%)	15/26 (57,7%)	0,945
F3 - F4	10/21 (47,6%)	11/21 (52,4%)	
Odgovor na terapiju			
Bez virusološkog odgovora (BO)	20/27 (74,1%)	7/27 (25,9%)	<0,001*
Stabilan virusološki odgovor (SVO)	1/20 (5%)	19/20 (95%)	
Viremija (IU/ml) ¶			
< 400 000	11/24 (45,8%)	13/24 (54,2%)	0,778
≥ 400 000	7/19 (36,8%)	12/19 (63,2%)	

† Podaci izraženi kao srednja vrednost±SD; ‡ Stadijum fibroze izražen METAVIR skorom (fibroza 0-2 i 3-4); ¶ Analiza nije uspela kod dva ispitanika; * Statistički značajna vrednost. Korišćeni statistički testovi bili su Studentov t-test, Pearsonov χ^2 testi i Fišerov test tačne verovatnoće. Analiza nije uspela kod dva ispitanika.

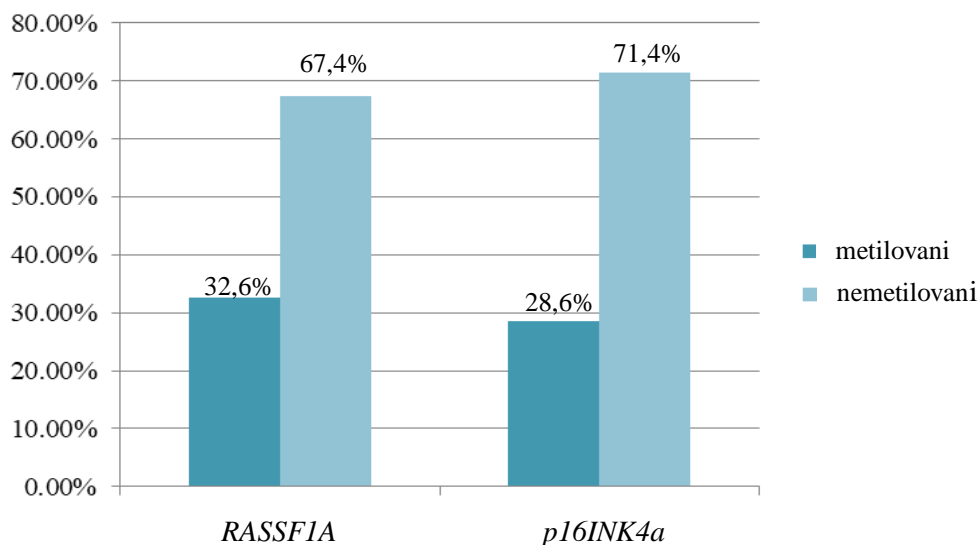
4.3. Ispitivanje metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* u uzorcima plazme pacijenata sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

Nakon MSP reakcije i elektroforeze, na osnovu prisustva specifičnih produkata MSP reakcija koji su odgovarali nemetilovanom, odnosno metilovanom alelima, određen je metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a*. Metilacija navedenih gena nije detektovana ni u jednom od kontrolnih uzoraka poreklom iz MNC periferne krvi zdravih osoba, dok je metilacija oba gena uočena kod svih kontrolnih DNK prethodno metilovanih *in vitro*. U određenom broju uzoraka su detektovani i produkti koji odgovaraju nemetilovanom alelu, kao i produkti koji odgovaraju metilovanom alelu ispitivanih gena, što ukazuje na heterogenost cirkulišuće DNK. Reprezentativni primeri analize metilacije prikazani su na slici 4.2. Dužina dobijenih produkata je određena na osnovu molekularnog markera sa umnošcima DNK od 50 bp (*O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use, Thermo Fisher Scientific, SAD*).



Slika 4.2. Rezultati MSP za gene RASSF1A i p16INK4a za uzorke plazme pacijenata sa hroničnom infekcijom virusom hepatitis C genotipa 1b. Prisustvo vidljivog PCR proizvoda u kolonama N ukazuje na prisustvo nemetilovanih alela RASSF1A (169 bp) i p16INK4a (151 bp); prisustvo proizvoda u kolonama M ukazuje na prisustvo metilovanog RASSF1A (169 bp) i p16INK4a alela (150 bp). NL – normalne MNC kao pozitivna kontrola za nemetilovane alele; PK – in vitro metilovana DNK iz normalnih MNC kao pozitivna kontrola za metilovane alele; L – marker molekulske težine (50 bp); HCV – virus hepatitis C tipa C.

Metilacioni status gena RASSF1A i p16INK4a je uspešno utvrđen kod svih 49 ispitanika. Metilacija gena RASSF1A je detektovana kod 32,6% (16/49) ispitanika, dok je metilacija gena p16INK4a detektovana kod 28,6% (14/49) ispitanika (Slika 4.3). Istovremena metilacija oba gena detektovana je u 3 od 49 (6,1%) slučajeva, dok je 27 od 49 ispitanika (55,1%) imalo bar jedan metilovani gen.



Slika 4.3. Metilacioni profil uzoraka plazme pacijenata sa hroničnom infekcijom virusom hepatitis C genotipa 1b

4.3.1 Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

Rezultati analiza povezanosti metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b sumirani su u tabeli 4.2. Nije uočena asocijacija između metilacionog statusa, bilo gena *RASSF1A* ili gena *p16INK4a* i ispitivanih parametara, uključujući starost pacijenata, pol i stadijum fibroze jetre. Međutim, utvrđena je statistički značajna asocijacija metilacije promotora gena *RASSF1A* i koncentracije ukupne HCV RNK ($\geq 400\ 000$ IU/ml, $p=0,009$, χ^2 test; Tabela 4.2). Takva asocijacija nije pronađena u slučaju gena *p16INK4a*.

Tabela 4.2: Povezanost metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

Kliničko-patološke karakteristike	Metilacioni status gena <i>RASSF1A</i>		p	Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i>		p
	Metilovan	Nemetilovan		Metilovan	Nemetilovan	
Starost (Godine) [†]	43,438 ± 13,059	44,788 ± 11,401	0,712	44,429 ± 10,646	44,314 ± 12,442	0,976
Pol						
Muški	11/29 (37,9%)	18/29 (62,1%)	0,523	8/29 (27,6%)	21/29 (72,4%)	0,890
Ženski	5/20(25%)	15/20 (75%)		6/20 (30%)	14/20 (70%)	
Stadijum fibroze ‡						
F0 - F2	9/27 (33,3%)	18/27 (66,7%)	0,846	8/27 (29,6%)	19/27 (70,4%)	0,892
F3 - F4	7/22 (31,8%)	15/22 (68,2%)		6/22 (27,3%)	16/22 (72,7%)	
Odgovor na terapiju						
Bez virusološkog odgovora (BO)	6/28 (21,4%)	22/28 (78,6%)	0,104	7/28 (25%)	21/28 (75%)	0,749
Stabilan virusološki odgovor (SVO)	10/21 (47,6%)	11/21 (52,4%)		7/21(33,3%)	14/21 (66,7%)	
Viremija (IU/ml) ¶						
< 400 000	9/25 (36%)	16/25 (64%)	0,009*	8/25 (32%)	17/25 (68%)	0,607
≥ 400 000	15/20 (75%)	5/20 (25%)		5/20 (25%)	15/20 (75%)	
Genotip gena <i>IL28B</i> ¶						
CC	13/26 (50%)	13/26 (50%)	0,024*	7/26 (26,9%)	19/26 (73,1%)	0,875
CT/TT	3/21 (14%)	18/21 (86%)		7/21 (33,3%)	14/21 (66,7)	

[†] Podaci izraženi kao srednja vrednost±SD; [‡] Stadijum fibroze izražen METAVIR skorom (fibroza 0-2 i 3-4);

¶ Analiza nije uspjela kod dva ispitanika; * Statistički značajna vrednost. Korišćeni statistički testovi bili su Studentov t-test, Pearsonov χ^2 test i Fišerov test tačne verovatnoće.

Status metilacije gena *RASSF1A* i *p16INK4a* razmatran pojedinačno nije bio povezan sa odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV. Međutim, kada su upoređene grupe ispitanika sa oba metilovana (*p16INK4am/RASSF1Am*) i oba nemetilovana gena (*p16INK4an/RASSF1An*), primećeno je da svi ispitanici kod kojih nije došlo do odgovora na terapiju imaju nemetilovane promotore oba ispitivana gena (15/15), dok su sva tri ispitanika (3/3) sa metilovanim promotorima oba ispitivana gena odgovorili na antivirusnu terapiju. Ipak, ovaj rezultat nije dostigao statistički značajnu vrednost jer se radi o malom broju uzoraka ($p= 0,052$, Fišerov test tačne verovatnoće, Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Povezanost istovremenog metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b

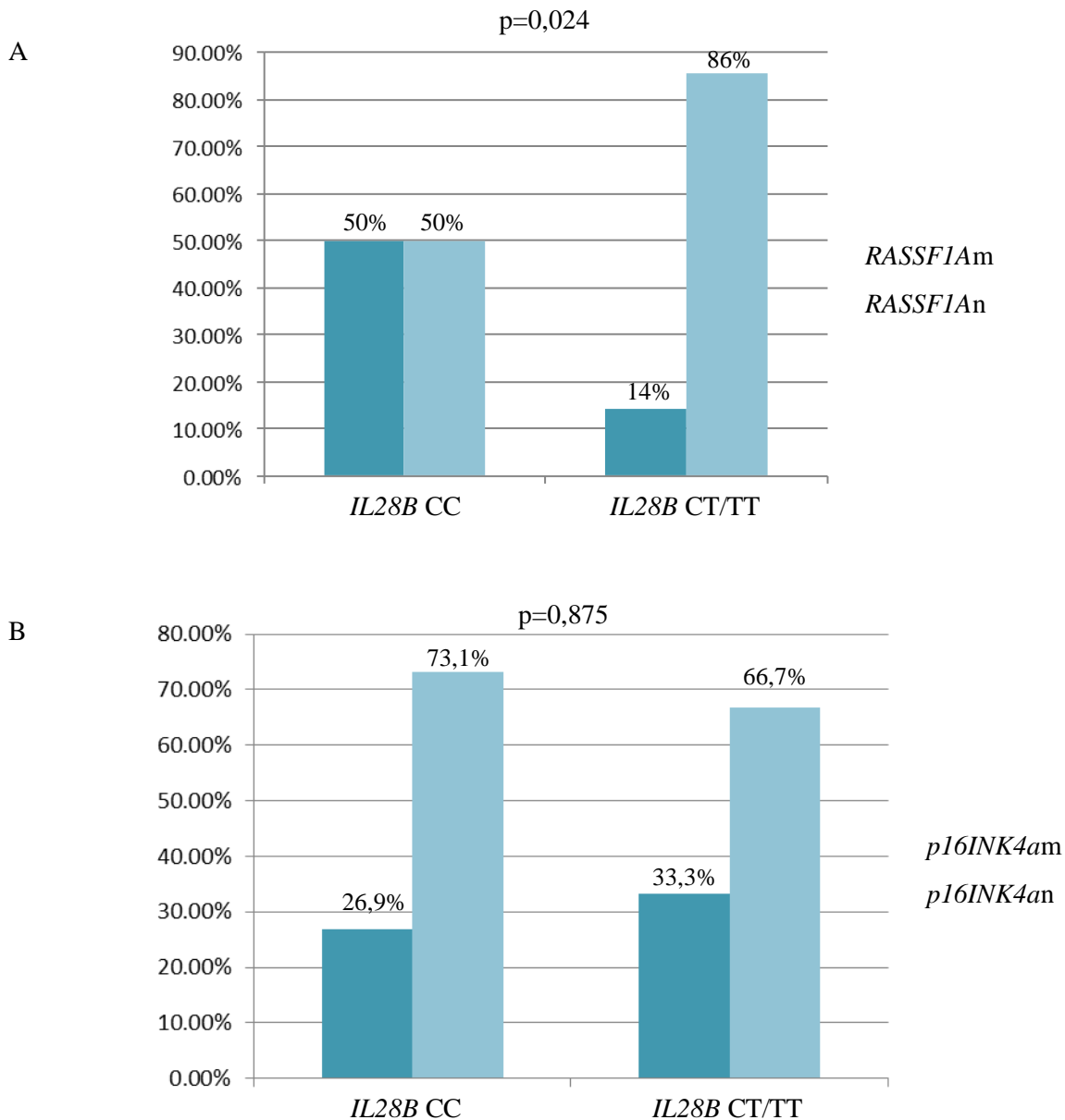
Kliničko-patološke karakteristike	Metilacioni status gena <i>RASSF1A</i> i <i>p16INK4a</i>		p
	<i>RASSF1Am/ p16INK4am</i>	<i>RASSF1An/ p16INK4an</i>	
Starost (Godine) †	48,333±15,044	45,500±12,274	0,780
Pol			
Muški	1/12 (8,33 %)	11/12 (91,77%)	1,000
Ženski	2/13 (15,38%)	11/13 (84,62%)	
Stadijum fibroze ‡			
F0 - F2	3/16 (18,75%)	13/16 (81,25%)	0,280
F3 - F4	0/9 (0%)	9/9 (100%)	
Odgovor na terapiju			
Bez virusološkog odgovora (BO)	0/15 (0%)	15/15 (100%)	0,052
Stabilan virusološki odgovor (SVO)	3/10 (30%)	7/10 (70%)	
Genotip gena <i>IL28B</i> ¶			
CC	3/12 (25%)	9/12 (75%)	0,217
CT/TT	0/11 (0%)	11/11 (100%)	

† Podaci izraženi kao srednja vrednost±SD; ‡ Stadijum fibroze izražen METAVIR skorom (fibroza 0-2 i 3-4);

¶ Analiza nije uspela kod dva ispitanika; *RASSF1Am* – metilovan promotor gena *RASSF1A*; *RASSF1An* – nemetilovan promotor gena *RASSF1A*; *p16INK4am* – metilovan promotor gena *p16INK4a*; *p16INK4an* – nemetilovan promotor gena *p16INK4a*. Korišćeni statistički testovi bili su Studentov t-test, Pearsonov χ^2 test i Fišerov test tačne verovatnoće.

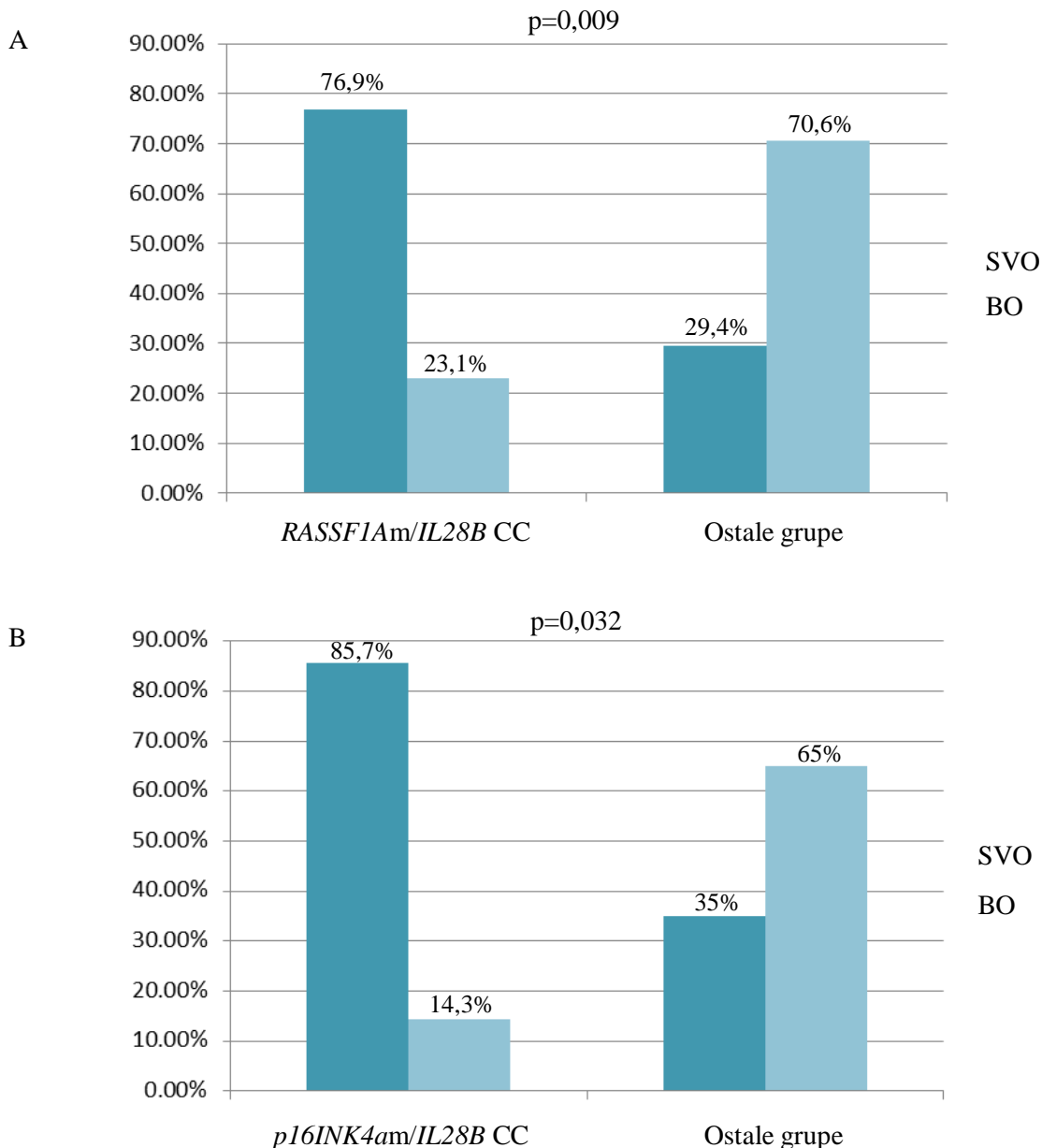
4.3.2 Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* sa genotipovima polimorfizma rs12979860 gena *IL28B*

Ispitivanjem povezanosti metilacionog statusa gena *RASSF1A* i genotipova polimorfizma rs12979860 gena *IL28B* utvrđeno je da se metilacija promotora *RASSF1A* značajno češće javlja kod ispitanika sa genotipom CC gena *IL28B*, nego kod preostala dva genotipa (50% vs. 14%, p=0,024, Fišerov test tačne verovatnoće; Tabela 4.2, Slika 4.3). Asocijacija između metilacionog statusa gena *p16INK4a* i ispitivanog polomorfizma gena *IL28B* nije pronađena (Tabela 4.2, Slika 4.3).



Slika 4.3. Analiza povezanosti metilacije promotora gena *RASSF1A* (A) i *p16INK4a* (B) i genotipa gena *IL28B*. *RASSF1Am* – metilovan promotor gena *RASSF1A*; *RASSF1An* – nemetilovan promotor gena *RASSF1A*; *p16INK4am* – metilovan promotor gena *p16INK4a*; *p16INK4an* – nemetilovan promotor gena *p16INK4a*.

U cilju utvrđivanja moguće asocijacije daljom analizom smo ispitivali da li postoji povezanost metilacionog statusa svakog od ispitivanih gena u kombinaciji sa genotipom gena *IL28B* i odgovora na antivirusnu terapiju. Utvrđeno je da je u grupi ispitanika sa istovremenim prisustvom metilovanog gena *RASSF1A* i genotipa CC gena *IL28B* (*RASSF1Am/IL28BCC*), SVO je postignut u 76,9% (10/13) slučajeva, dok je kod preostalih ispitanika postignut samo kod 29,4% (10/34). Slično, u grupi pacijenata sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p16INK4a* i genotipa CC gena *IL28B* (*p16INK4am/IL28BCC*), SVO je postignut kod 85,7% (6/7) ispitanika, dok je u grupi preostalih pacijenata postignut kod 35% (14/40) ispitanika. Dobijeni rezultati su bili statistički značajni za oba gena ($p=0,009$ za gen *RASSF1A* i $p=0,032$ za gen *p16INK4a*, Fišerov test tačne verovatnoće; Slika 4.4). Međutim, nakon izvršene Bonferoni korekcije, samo je rezultat vezan za gen *RASSF1A* ostao značajan ($p<0,0125$).



Slika 4.4. Analiza povezanosti istovremenog metilacionog statusa gena RASSF1A i p16INK4a i genotipa gena IL28B sa odgovorom na terapiju. A – Uticaj metilacije gena RASSF1A i genotipa gena IL28B na odgovor na terapiju. Ostale grupe: RASSF1An/IL28B CT/TT; RASSF1Am/IL28B CT/TT i RASSF1An/IL28B CC. B – Uticaj metilacije gena p16INK4a i genotipa gena IL28B na odgovor na terapiju. Ostale grupe: p16INK4an/IL28B CT/TT; p16INK4am/IL28B CT/TT i p16INK4an/IL28B CC. SVO – stabilan virusološki odgovori; BO – bez virusološkog odgovora. Sve p-vrednosti su dobijene pomoću Fišerovog testa tačne verovatnoće.

Nakon sveobuhvatnije analize, primećeno je da je kod ispitanika sa uznapredovalom fibrozom i genotipovima CT/TT gena *IL28B*, gen *RASSF1A* bio isključivo nemetilovan (10/10, 100%; Tabela 4.4) i da 90% (9/10) ovih ispitanika nije odgovorilo na terapiju (Tabela 4.5). S druge strane, odgovor na kombinovanu terapiju, među ispitanicima sa metilovanim genom *RASSF1A* i genotipom CC gena *IL28B* je bio sličan, bez obzira na stadijum fibroze. Tako je u podgrupi sa blagom fibrozom ili bez fibroze 83,3% (5/6) ispitanika postiglo SVO, dok je SVO zabeležen kod 71,4% (5/7) ispitanika sa teškom fibrozom (Tabela 4.5). Ovi rezultati nisu statistički obrađeni zbog malog broja uzoraka u svakoj grupi.

Tabela 4.4. Povezanost metilacionog statusa gena *RASSF1A* sa stadijumom fibroze i genotipom gena *IL28B*

Stadijum fibroze [†] /genotip gena <i>IL28B</i>	Metilacioni status gena <i>RASSF1A</i>	
	Metilovani	Nemetilovani
F0-F2/CC	6/15 (40%)	9/15 (60%)
F0-F2/CT/TT	3/11 (27,3%)	8/11 (72,7%)
F3-F4/CC	7/11 (63,6%)	4/11 (36,4%)
F3-F4/CT/TT	0/10 (0%)	10/10 (100%)

[†] Stadijum fibroze izražen METAVIR skorom (fibroza 0-2 i 3-4).

Tabela 4.5. Odgovor na terapiju PEG-IFN/RBV u grupama ispitanika sa različitim stadijumom fibroze, genotipom gena *IL28B* i metilacionim statusom gena *RASSF1A*

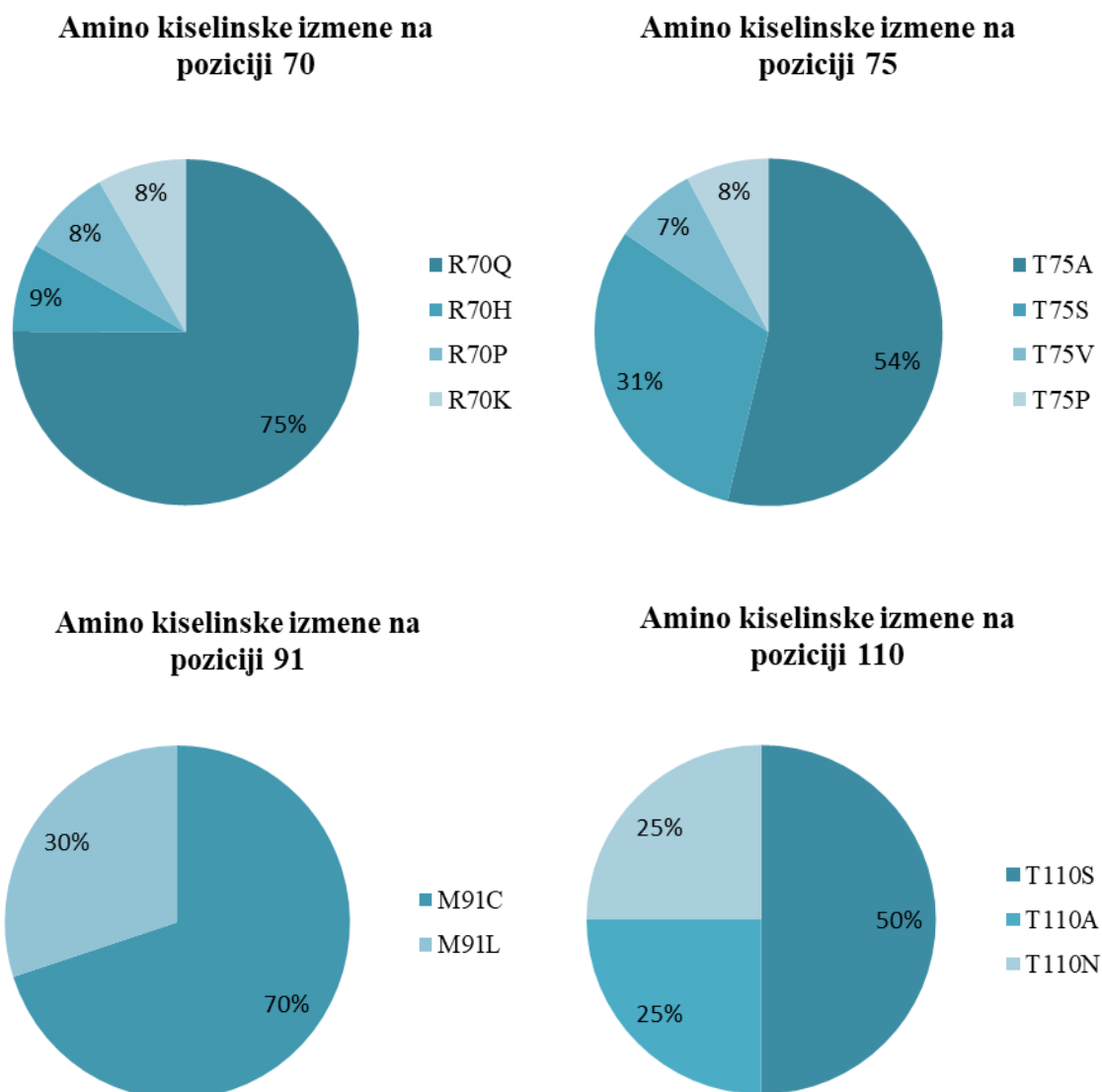
Stadijum fibroze [†] /genotip gena <i>IL28B</i> /metilacioni status gena <i>RASSF1A</i>	Odgovor na terapiju	
	Stabilan virusološki odgovor (SVO)	Bez virusološkog odgovora (BO)
F0-F2/CC/RASSF1Am	5/6 (83,3% %)	1/6(16,7%)
F0-F2/CC/RASSF1An	6/9 (66,70%)	3/9 (33,3%)
F0-F2/CT/TT/RASSF1Am	3/3 (100%)	0/3 (0%)
F0-F2/CT/TT/RASSF1An	0/8 (0%)	8/8 (100%)
F3-F4/CC/RASSF1Am	5/7 (71,4%)	2/7 (28,6%)
F3-F4/CC/RASSF1An	3/4 (75%)	1/4 (25%)
F3-F4/CT/TT/RASSF1Am*	/	/
F3-F4/CT/TT/RASSF1An	1/10 (10%)	9/10 (90%)

*Nijedan od ispitanika nije imao kombinaciju F3-F4/CT/TT/RASSF1Am. [†] Stadijum fibroze izražen METAVIR skorom (fibroza 0-2 i 3-4).

4.4 Analiza amino-kiselinskih izmena u proteinu C HCV-a

Analiza amino-kiselinskih (ak) izmena u proteinu C virusa je bila uspešna kod 29 ispitanika. Sekvenca regiona C HCV-a svakog od izolata je poređena sa referentnom sekvencom za genotip 1b, HCV-J (GenBank pristupni broj D90208). Dobijene sekvence su deponovane u bazu podataka GenBank pod pristupnim brojevima (OQ607636-OQ607663).

Amino-kiselinske izmene na poziciji 70 su detektovane kod 41,4% (12/29) ispitanika, a izmene na poziciji 75 kod 44,8% (13/29) ispitanika, dok su izmene na poziciji 91 prisutne kod 34,5% (10/29) ispitanika. Izmene na poziciji 110 detektovane su kod samo 13,8% (4/29) ispitanika. Kod 13 ispitanika primećene su dve ili više ak izmena istovremeno. Distribucija ak izmena na sve četiri pozicije je prikazana na slici 4.5.



Slika 4.5. Amino-kiselinske izmene u proteinu C HCV-a kod pacijenata sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b. R-arginin; Q-glutamin; H-histidin; P-prolin; K-lizin; T-treonin; A-alanin; S-serin; V-valin; M-metionin; C-cistein; L-leucin; N-asparagin.

Najčešće detektovana izmena na poziciji 70 bila je zamena arginina u lizin (R70Q), koja je detektovana kod 75% (9/12) ispitanika, dok je najčešća supstitucija na poziciji 75 bila zamena treonina u alanin (T75A), koja je uočena u 53,8% (7/13) slučajeva. Najčešća ak izmena na poziciji 91 bila je zamena metionina u cistein (M91C), detektovana kod 70% (7/10) ispitanika, dok je najčešća ak izmena na poziciji 110 bila zamena treonina u serin (T110S), otkrivena kod 50% (2/4) ispitanika. Sekvence svih izolata sa ak izmenama na specifičnim pozicijama prikazane su na slici 4.6.

D90208	61	RRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGGMGAGWLLSPRGRSRPSWGPTDPRRRSRNLG	120
1	61	120
2	61	120
3	61	120
4	61H.....	120
5	61N.....	120
6	61Q...S.....	120
7	61Q.....	120
8	61C.....	120
9	61C.....	120
10	61Q...A.....	120
11	61L.....D	120
12	61Q...S.....	120
13	61Q...S.....	120
14	61C.....	120
15	61Q...A.....	120
16	61A.....L.....	120
17	61Q...A.....	120
18	61Q.....	120
19	61Q...A.....I.....	120
20	61Q...A.....L.....S.....	120
21	61Q...A.....L.....S.....	120
22	61PS...A.....C.....	120
23	61	G.....K...AC.....	120
24	61S...S.....C.....N.....	120
25	61S...LV.....C.....H.....	120
26	61	S...G.TC.....H.....	120
27	61	S...G.TC.....H.....	120
28	62	121
29	60C.Q...SP.P...QG.VW.G.C.....	119

Slika 4.6. Sekvence proteina C HCV-a svih izolata sa najčešćim ak izmenama na određenim pozicijama. Sve sekvence proteina C HCV-a su poređene sa referentnom sekvencom za genotip 1b, HCV-J (GenBank pristupni broj D90208) i njihove nukleotidne sekvence su deponovane u bazu podataka GenBank pod pristupnim brojevima (OQ607636-OQ607663). Prikazane su sekvence između amino-kiselina 61 i 120. Tačke označavaju amino-kiseline identične onima u referentnoj sekvenci.

4.4.1 Ispitivanje povezanosti ak izmena proteina C HCV-a sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika, genotipom gena *IL28B* i metilacionim statusom gena *RASSF1A* i *p16INK4a*

U daljim analizama nije pronađena asocijacija ak izmena proteina C na pozicijama 70, 75, 91 i 110 sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa hroničnom infekcijom HCV genotipa 1b, uključujući starost, pol, stadijum fibroze jetre, kao ni sa genotipom gena *IL28B*. Međutim, uočen je statistički trend ka češćoj pojavi genotipa CC gena *IL28B* sa prisustvom ak izmene na poziciji 91 (53,3%, $p=0,055$, Tabela 4.6). Takođe, uočena je asocijacija ak izmena proteina C i metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a*. Značajno je da su svi pacijenti sa izmenom R70Q imali nemetilovani gen *RASSF1A*, dok je u grupi ispitanika bez ak izmene R70Q, njih 66,7% (2/3) imalo metilovani gen *RASSF1A* ($p=0,046$, Fišerov test tačne verovatnoće).

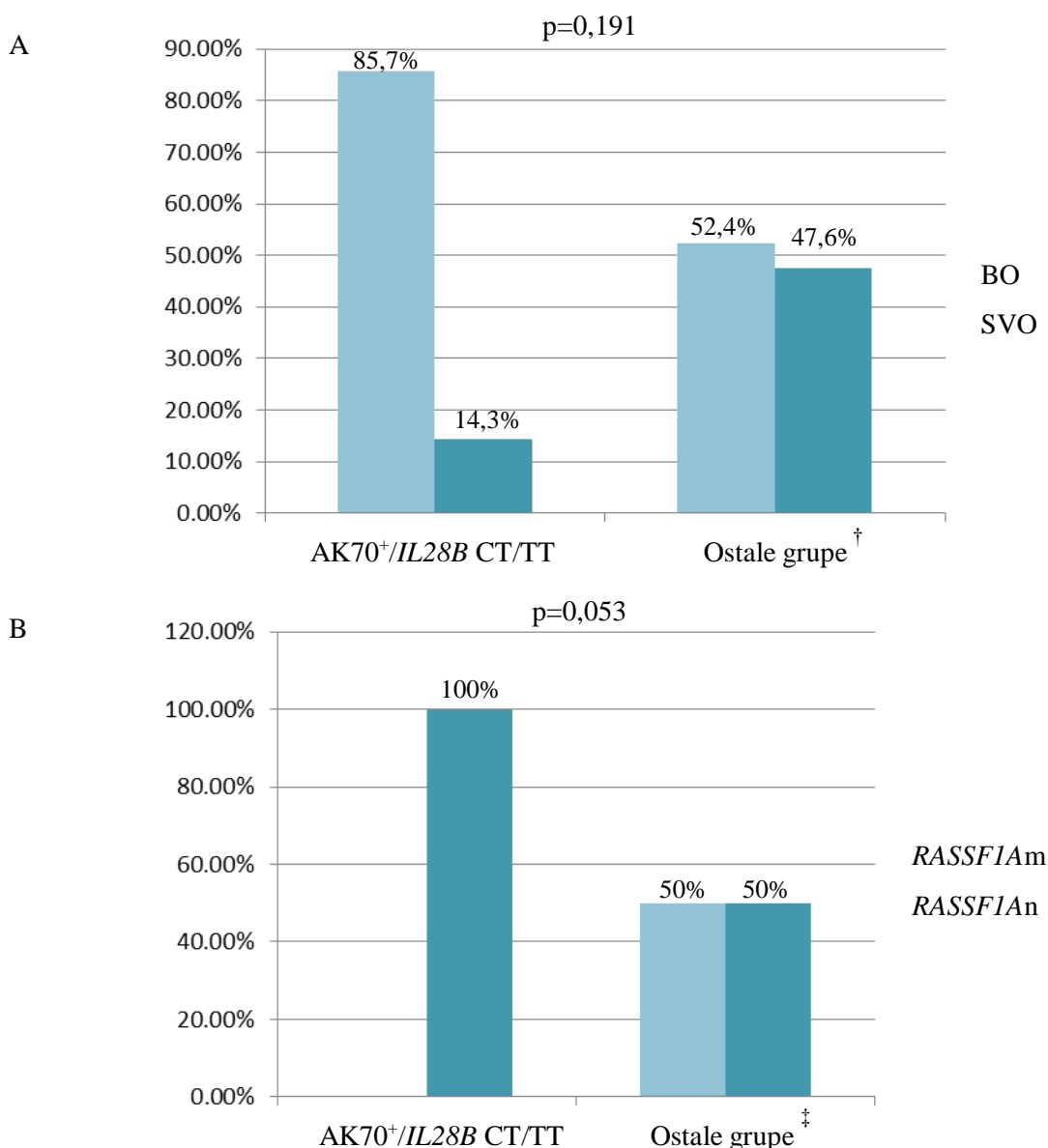
Tabela 4.6. Povezanost ak izmena proteina C HCV-a sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika, metilacionim statusom gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, genotipom gena *IL28B* i odgovorom na terapiju kod pacijenata sa hroničnom infekcijom HCV genotipa 1b

Kliničko-patološke karakteristike ispitanika	Ak izmena proteina C virusa na poziciji 70		p	Ak izmena proteina C virusa na poziciji 75		p
	+	-		+	-	
Starost (Godine) †	45,667±12,985	40,941±12,060	0,331	42,308±14,291	43,375±11,194	0,828
Pol						
Muški	5/16 (31,25%)	11/16 (68,75%)	0,396	7/16 (43,75%)	9/16 (56,25%)	0,806
Ženski	7/13 (53,75%)	6/13 (46,15%)		6/13 (46,15%)	7/13 (53,75%)	
Stadijum fibroze ‡						
F0 - F2	3/11 (27,3%)	8/11 (72,7%)	0,273	3/11 (27,3%)	8/11 (72,7%)	0,249
F3 - F4	9/18 (50%)	9/18 (50%)		10/18 (55,6%)	8/18 (44,4%)	
Metilacioni status gena <i>RASSF1A</i> ¶						
Metilovani	2/10 (18,7%)	8/10 (81,3%)	0,230	2/10 (20%)	8/10 (80%)	0,124
Nemetilovani	8/17 (33,3%)	9/17 (63,7%)		9/17 (52,9%)	8/17 (47,1%)	
Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> ¶						
Metilovani	2/7 (18,7%)	5/7 (81,3%)	0,678	1/7 (14,3%)	6/7 (85,7%)	0,183
Nemetilovani	8/20 (33,3%)	12/20 (63,7%)		10/20 (50%)	10/20 (50%)	
Genotip gena <i>IL28B</i> §						
CC	5/15 (33,3%)	10/15 (66,7%)	0,477	6/15 (40%)	9/15 (60%)	0,724
CT/TT	7/13 (53,8%)	6/13 (46,2%)		7/13 (53,8%)	6/13 (46,2%)	
Odgovor na terapiju						
Bez virusološkog odgovora (BO)	8/18 (44,4%)	10/18 (55,6%)	0,717	10/18 (55,6%)	8/18 (44,4%)	0,249
Stabilan virusološki odgovor (SVO)	4/11 (36,4%)	7/11 (63,6%)		3/11 (27,3%)	8/11 (72,7%)	
	Ak izmena proteina C virusa na poziciji 91		p	Ak izmena proteina C virusa na poziciji 110		p
	+	-		+	-	
Starost (Godine) †	39,700±12,815	44,579±12,258	0,336	39,500±13,026	43,440±12,544	0,603
Pol						
Muški	8/16 (50%)	8/16 (50%)	0,114	4/16 (25%)	12/16 (75%)	0,107
Ženski	2/13 (15,4%)	11/13 (84,6%)		0/13 (0%)	13/13 (100%)	
Stadijum fibroze ‡						
F0 - F2	4/11 (36,4%)	7/11 (63,6%)	1,000	0/11 (0%)	11/11 (100%)	0,268
F3 - F4	6/18 (33,3%)	12/18 (66,7%)		4/18 (22,2%)	14/18 (77,8%)	
Metilacioni status gena <i>RASSF1A</i> ¶						
Metilovani	2/10 (20%)	8/10 (80%)	0,219	1/10 (10%)	9/10 (90%)	1,000
Nemetilovani	9/17 (52,9%)	8/17 (47,7%)		2/17 (11,8%)	15/17 (88,2%)	
Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> ¶						
Metilovani	1/7 (14,3%)	6/7 (85,7%)	0,363	1/7 (14,3%)	6/7 (85,7%)	1,000
Nemetilovani	10/20 (50%)	10/20 (50%)		2/20 (10%)	18/20 (80%)	
Genotip gena <i>IL28B</i> §						
CC	8/15 (53,3%)	7/15 (46,7%)	0,055	3/15 (20%)	12/15 (80%)	0,600
CT/TT	2/13 (15,4%)	11/13 (84,6%)		1/13 (7,7%)	12/13 (92,3%)	
Odgovor na terapiju						
Bez virusološkog odgovora (BO)	4/18 (22,2%)	14/18 (77,8%)	0,114	1/18 (5,6%)	17/18 (94,4%)	0,139
Stabilan virusološki odgovor (SVO)	6/11 (54,5%)	5/11 (45,5%)		3/11 (27,3%)	8/11 (72,7%)	

+ Prisustvo ak izmene na određenoj poziciji; - Odsustvo ak izmene na određenoj poziciji; † Podaci izraženi kao srednja vrednost ± SD; ‡ Stadijum fibroze izražen METAVIR skorom (fibroza 0-2 i 3-4); ¶ Analiza nije uspjela kod dva ispitanika; § Analiza nije uspjela kod jednog ispitanika. Korišćeni statistički testovi bili su Studentov t-test, Pearsonov χ^2 test i Fišerov test tačne verovatnoće.

4.4.2 Ispitivanje povezanosti ak izmena proteina C HCV-a sa odgovorom na PEG-IFN/RBV terapiju

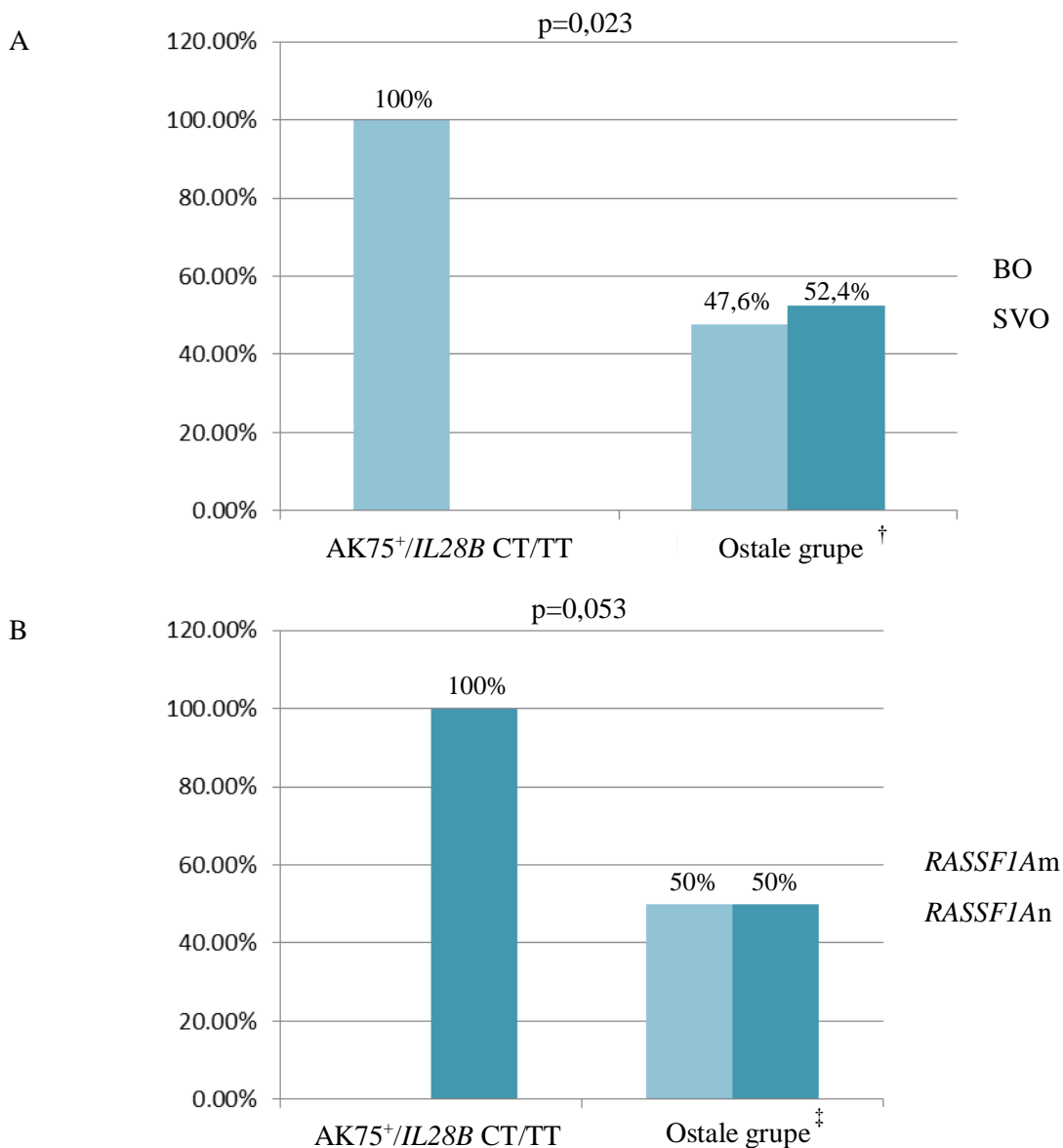
U našoj grupi ispitanika, SVO je bio povezan samo sa prisustvom genotipa CC gena *IL28B* ($p=0,005$, Fišerov test tačne verovatnoće). Nije uočena asocijacija pojedinačnih ak izmena proteina C HCV-a i odgovora na terapiju. Praćenjem polimorfizma rs12979860 gena *IL28B* i metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, uočili smo da kod HCV izolata koji su imali ak izmenu na poziciji 70 proteina C, nije postojala razlika u odgovoru na terapiju u zavisnosti od genotipa gena *IL28B* i metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a*. Čak 85,7% ispitanika sa ak izmenom na poziciji 70 proteina C i genotipovima CT/TT gena *IL28B* (ak70⁺/CT/TT) nije odgovorilo na terapiju (BO), u poređenju sa 52,4% ispitanika koji nisu imali kombinaciju ak70⁺/CT/TT i takođe nisu odgovorili na terapiju ($p=0,191$, slika 4.7A). Pored toga, kod svih ispitanika (100%) u grupi ak70⁺/CT/TT bio je prisutan nemetilovani gen *RASSF1A*, dok je kod 50% svih ostalih ispitanika detektovan nemetilovani gen *RASSF1A* ($p=0,053$, slika 4.7B).



Slika 4.7. Analiza povezanosti istovremenih ak izmena na poziciji 70 proteina C HCV-a i genotipa gena *IL28B* sa ishodom terapije i metilacionim statusom gena *RASSF1A*. A – Uticaj ak izmena na poziciji 70 proteina C i genotipa gena *IL28B* na odgovor na terapiju. † Ostale grupe: ak70⁺/CT/TT, ak70⁺/CC, ak70⁻/CC; ak70⁺, prisutna je ak izmena na poziciji 70; ak70⁻, nije prisutna ak izmena na poziciji 70; SVO, stabilan virusološki odgovor; BO, bez virusološkog odgovora.

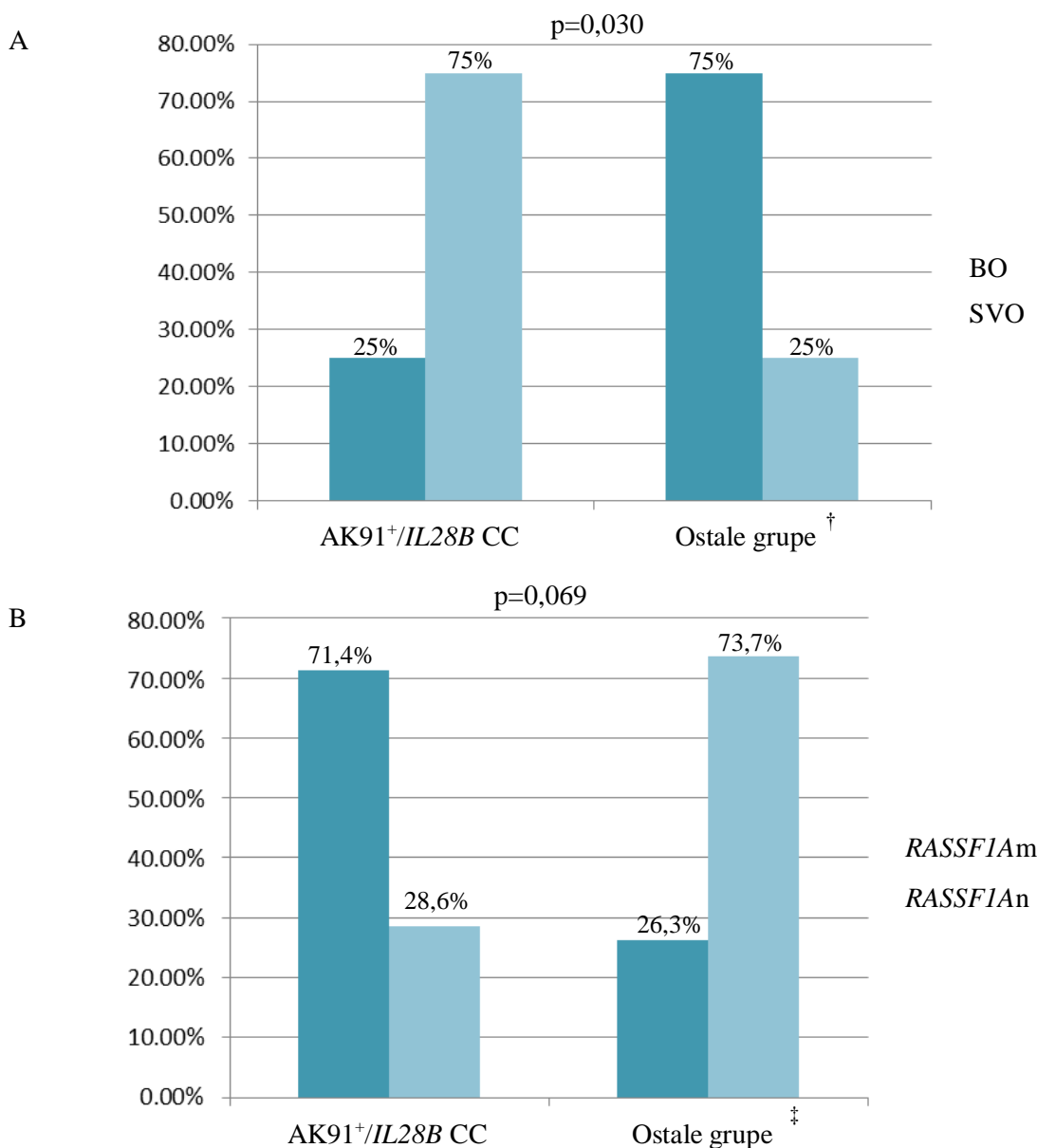
B – Distribucija metilacionog statusa gena RASSF1A kod pacijenata sa različitim ak 70 statusom i genotipom gena IL28B. ‡ Ostale grupe: ak70⁻/CT/TT, ak70⁺/CC, ak70⁻/CC; ak70⁺, prisutna je ak izmena na poziciji 70; ak70⁻, nije prisutna ak izmena na poziciji 70; m, metilovan; n, nemetilovan.

Sa druge strane, nijedan izolat sa ak izmenom na poziciji 75 proteina C i genotipovima CT/TT gena *IL28B* nije odgovorio na terapiju, što je bilo statistički značajno u poređenju sa svim ostalim ispitanicima (47,6%) koji nisu nosili ak75⁺/CT/TT kombinaciju (p=0,023, Slika 4.8A). Štaviše, svi ispitanici sa ak izmenom na poziciji 75 proteina C i genotipovima CT/TT gena *IL28B* imali su nemetilovani gen *RASSF1A*, u poređenju sa 50% svih ostalih ispitanika (p=0,053, slika 4.8B).



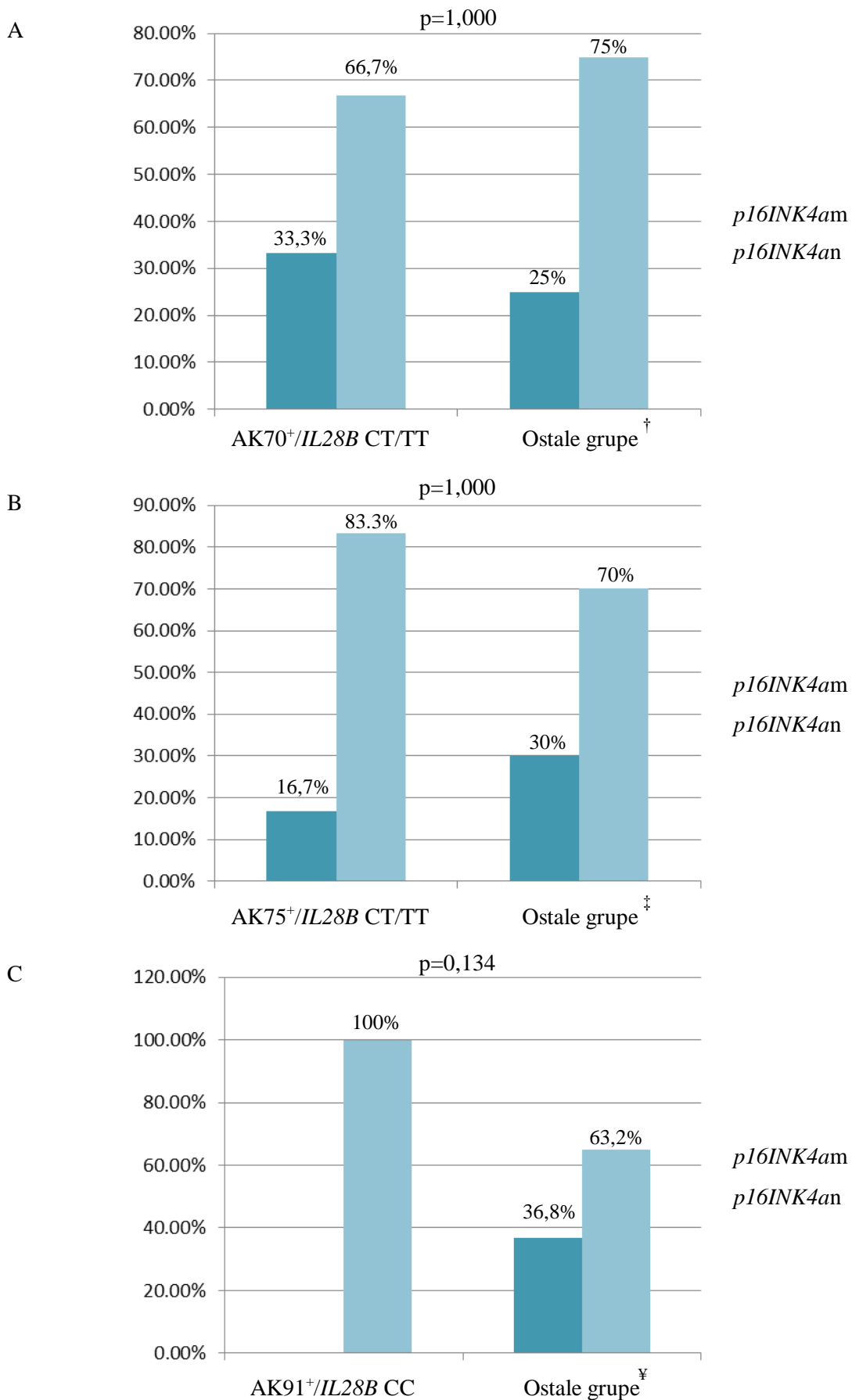
Slika 4.8. Analiza povezanosti istovremenih ak izmena na poziciji 75 proteina C HCV-a i genotipa gena *IL28B* sa ishodom terapije i metilacionim statusom gena *RASSF1A*. A – Uticaj ak izmena na poziciji 75 proteina C i genotipa gena *IL28B* na odgovor na terapiju. † Ostale grupe: ak75⁻/CT/TT, ak75⁺/CC, ak75⁻/CC; ak75⁺, prisutna je ak izmena na poziciji 75; ak75⁻, nije prisutna ak izmena na poziciji 75; SVO, stabilan virusološki odgovor; BO, bez virusološkog odgovora. B – Distribucija metilacionog statusa gena *RASSF1A* kod pacijenata sa različitim ak 75 statusom i genotipom gena *IL28B*. ‡ Ostale grupe: ak75⁻/CT/TT, ak75⁺/CC, ak75⁻/CC; ak75⁺, prisutna je ak izmena na poziciji 75; ak75⁻, nije prisutna ak izmena na poziciji 75; m, metilovan; n, nemetilovan.

U podgrupi ispitanika sa ak izmenom na poziciji 91 proteina C i genotipom CC gena *IL28B* ($ak91^+/CC$), SVO je postignut kod 75%, u poređenju sa samo 25% svih ostalih ispitanika ($p=0,030$, Slika 4.9A). Iako nije bio statistički značajan rezultat, metilovani gen *RASSF1A* je učestaliji u podgrupi pacijenata sa $ak91^+/CC$ (71,4% vs. 26,3%, $p=0,069$, slika 4.9B).



Slika 4.9. Analiza povezanosti istovremenih ak izmena na poziciji 91 proteina C HCV-a i genotipa gena *IL28B* sa ishodom terapije i metilacionim statusom gena *RASSF1A*. A – Uticaj ak izmena na poziciji 91 proteina C i genotipa gena *IL28B* na odgovor na terapiju. † Ostale grupe: $ak91^-/CT/TT$, $ak91^+/CT/TT$, $ak91^-/CC$; $ak91^+$, prisutna je ak izmena na poziciji 91; $ak91^-$, nije prisutna ak izmena na poziciji 91; SVO, stabilan virusološki odgovor; BO, bez virusološkog odgovora. B – Distribucija metilacionog statusa gena *RASSF1A* kod pacijenata sa različitim ak 91 statusom i genotipom gena *IL28B*. ‡ Ostale grupe: $ak91^-/CT/TT$, $ak91^+/CT/TT$, $ak91^-/CC$; $ak91^+$, prisutna je ak izmena na poziciji 91; $ak91^-$, nije prisutna ak izmena na poziciji 91; m, metilovan; n, nemetilovan.

U našoj grupi ispitanika nije ustanovljena asocijacija između ak izmene na poziciji 110 proteina C i odgovora na terapiju, genotipa gena *IL28B* i metilacionog statusa gena *p16INK4a* (Slika 4.10).



Slika 4.10. Analiza povezanosti ak izmena na poziciji 70, 75 i 91 proteina C HCV-a sa metilacionim statusom gena *p16INK4a*. A – Distribucija metilacionog statusa gena *p16INK4a* kod pacijenata sa razlicitim ak 70 statusom i genotipom gena *IL28B*. † Ostale grupe: ak70/CT/TT,

ak70⁺/CC, ak70⁻/CC; ak70⁺, prisutna je ak izmena na poziciji 70; ak70⁻, nije prisutna ak izmena na poziciji 70; m, metilovan; n, nemetilovan. B – Distribucija metilacionog statusa gena p16INK4a kod pacijenata sa različitim ak 75 statusom i genotipom gena IL28B. ‡ Ostale grupe: ak75⁻/CT/TT, ak75⁺/CC, ak75⁻/CC; ak75⁺, prisutna je ak izmena na poziciji 75; ak75⁻, nije prisutna ak izmena na poziciji 75; m, metilovan; n, nemetilovan. C – Distribucija metilacionog statusa gena p16INK4a kod pacijenata sa različitim ak 91 statusom i genotipom gena IL28B. ¥ Ostale grupe: ak91⁻/CT/TT, ak91⁺/CT/TT, ak91⁻/CC; ak91⁺, prisutna je ak izmena na poziciji 91; ak91⁻, nije prisutna ak izmena na poziciji 91; m, metilovan; n, nemetilovan.

5. DISKUSIJA

Hronična infekcija virusom hepatitisa tipa C predstavlja značajan svetski zdravstveni problem, koji često vodi ka progresivnoj fibrozi i cirozi jetre, a kod određenog broja pacijenata i do nastanka HCK (World Health Organization, 2024). Rizik za nastanak HCK je najveći kod obolelih inficiranih HCV-om genotipa 1b, koji je ujedno i najzastupljeniji genotip virusa u Srbiji, kao i u zemljama zapadne Evrope i SAD (Simonović-Babić i sar., 2019; World Health Organization, 2024). Prevencija komplikacija hronične infekcije zasniva se na postizanju SVO nakon primene antivirusne terapije, kao i na ranoj detekciji odgovarajućih biomarkera kod osoba koje su pod rizikom (World Health Organization, 2024). Dok se nekoliko metoda široko koriste za procenu steatoze i fibroze jetre, ove tehnike nemaju osetljivost i specifičnost za dijagnostikovanje rane faze fibroze i upale jetre. Predloženo je nekoliko neinvazivnih metoda za određivanje stadijuma fibroze i predviđanje ciroze, međutim, ostaje neispunjena potreba za uspostavljanjem prediktivnih markera razvoja HCK kod pacijenata sa hroničnom infekcijom HCV-om (El-Bendary i sar., 2018; El-Bendary i sar., 2019). Kod ovih pacijenata, različite karakteristike domaćina i virusa mogu uticati na odgovor na terapiju i progresiju bolesti jetre (N Zekri i sar., 2014; Syyam i sar., 2023). Uobičajena klinička praksa ranog otkrivanja HCK su metode skrininga, ali njihova efikasnost ostaje kontroverzna (Zhang i sar., 2007). Na osnovu svega navedenog, cilj ove disertacije je bio da se ispita potencijalna povezanost epigenetičkih faktora, kao što je metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, zatim genetičkih faktora domaćina, kao što je polimorfizam rs12979860 gena *IL28B* i amino-kiselinskih izmena proteina C HCV-a genotipa 1b sa odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV i progresijom bolesti.

Brojne studije su pokazale da je jedan od najznačajnijih prediktora za postizanje SVO nakon terapije PEG-IFN/RBV genotip CC gena *IL28B* (Sugiyama i sar., 2011, Jovanovic-Cupic i sar., 2019), što se pokazalo i u našoj grupi ispitanika. 73,1% ispitanika sa ovim genotipom je postiglo SVO u odnosu na 4,8%, tj. samo jednog ispitanika sa genotipovima CT/TT koji je postigao SVO. U našoj studiji, najučestaliji genotip gena *IL28B* je bio genotip CC (55% ispitanika), što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima na populaciji evropskog porekla (Shi i sar., 2012; Provazzi i sar., 2019). Osim toga, ispitanici sa genotipom CC gena *IL28B* su bili značajno mlađi od onih sa genotipovima CT/TT, što je u skladu sa prethodnim rezultatima naše grupe ispitanika (Jovanovic-Cupic i sar., 2019), međutim, druge studije nisu pokazale ovu povezanost (Kitson i sar., 2014; Taheri i sar., 2015; Fedorchenko i sar., 2019).

Prethodna istraživanja su pokazala da infekcija HCV-om igra važnu ulogu u pokretanju procesa metilacije promotora gena koji su uključeni u progresiju bolesti jetre, nastanak HCK i odgovor na antivirusnu terapiju (N Zekri i sar., 2014; Zekri i sar., 2014). Kako se promene metilacije DNK javljaju u ranoj fazi infekcije HCV-om i postepeno se akumuliraju tokom progresije bolesti jetre, one takođe mogu predvideti rizik od nastanka HCK. Takođe, nedavna istraživanja su pokazala da postizanje SVO ne eliminiše rizik od pojave HCK i da epigenetičke promene indukovane HCV-om mogu da opstanu čak i nakon tretmana antivirusnom terapijom i eliminacije virusa (Hamdane i sar., 2019; Rinaldi i sar., 2020; Domovitz i Gal-Tanamy, 2021). Tumor suprsorski geni *RASSF1A* i *p16INK4a* su često metilovani u različitim stadijumima fibroze, ciroze i HCK, ali ne i u zdravoj jetri (Rocco i Sidransky, 2001; Kaneto i sar., 2001; Zang i sar., 2011; Mohamed i sar., 2012; N Zekri i sar., 2014; El-Sabakawy i sar., 2015; Zhang i sar., 2016b; Araujo i sar., 2016; Dubois i sar., 2019; Mostafa i sar., 2020; Peng i sar., 2020; El-shaarawy i sar., 2022; Nomeir i sar., 2022). Iako je metilacija ova dva gena ispitivana u različitim stadijumima bolesti jetre, njen klinički značaj nije u potpunosti razjašnjen. Stoga smo analizirali njihov metilacioni status u grupi pacijenata sa hroničnim hepatitisom C genotipa 1b i moguću vezu sa karakteristikama domaćina i virusa, kao i odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV.

Aberantna metilacija gena *RASSF1A* i *p16INK4a* detektovana je u 32,6% i 28,6% slučajeva, respektivno. Zabeležene učestalosti metilacije su u saglasnosti sa onima prijavljenim u prethodnim

studijama, koji se kreću od 16,2% do 68,4% za gen *RASSF1A* (Mohamed i sar., 2012; El-Sabakawy i sar., 2015; Mostafa i sar., 2020) i od 23,5% do 62% za gen *p16INK4a* (Kaneto i sar., 2001; Mostafa i sar., 2020), u zavisnosti od stadijuma bolesti. Postojeći literaturni podaci ukazuju na to da se metilacija gena *RASSF1A* i *p16INK4a* postepeno povećava sa progresijom bolesti, dostižući najviši stepen u HCK (N Zekri i sar., 2014; El-Sabakawy i sar., 2015; Zhang i sar., 2016b; Araujo i sar., 2016; Dubois i sar., 2019; Mostafa i sar., 2020; Peng i sar., 2020; El-shaarawy i sar., 2022; Nomeir i sar., 2022). Hronična infekcija HCV-om može delovati kao moćan epi-mutagen koji indukuje metilaciju i ubrzava sam proces metilacije tokom hepatokarcinogeneze, tako što povećava nivo ekspresije enzima DNMT1, DNMT3A i DNMT3B i reguliše aktivnost enzima histon metiltransferaze SMID3 (Guo i sar., 2011; N Zekri i sar., 2014; Jang, 2020). Metilacija gena *RASSF1A*, dovodi do njegovog transkripcionog utišavanja, utičući na njegovu tumor supresorsku funkciju, što potencijalno dovodi do formiranja tumora (Wang i sar., 2011). Tako, metilacija gena *RASSF1A* može biti uključena u nastanak HCK, jer inaktivacija ovog gena omogućava oštećenim hepatocitima progresiju ćelijskog ciklusa, inhibiranjem ciklina D1 i izbegavanjem zaustavljanja ćelije u G1 fazi ćelijskog ciklusa (Um i sar., 2011; García-Gutiérrez i sar., 2020). Takođe, inaktivacija *RASSF1A* sprečava pokretanje procesa apoptoze, onemogućavajući aktivaciju proteina MOAP-1 i kinaza MST1/2, i dovodi do nastanka metastaza tako što omogućava izostanak degradacije proteina RhoA (Matallanas i sar., 2007; García-Gutiérrez i sar., 2020). Aberantna metilacija i inaktivacija gena *p16INK4a* dovodi do prekomerne proliferacije ćelija, ubrzanog ćelijskog ciklusa i prevremenog ulaska u S fazu ćelijske deobe, pre potpune popravke oštećenja na molekulu DNK, što rezultira tumorogenezom (Qu i sar., 2015). Sve navedeno ukazuje da hipermetilacija gena *RASSF1A* i *p16INK4a* može da bude značajan događaj prilikom nastanka i progresije HCK.

U našoj studiji, metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a* nije bio povezan sa karakteristikama domaćina, kao što su fibroza, starost i pol pacijenata. Mostafa i sar. (2020) su pokazali da je metilacija gena *RASSF1A* i *p16INK4a* povezana sa blagom fibrozom, dok je u drugoj studiji takva povezanost primećena samo za metilaciju promotora gena *RASSF1A* (N Zekri i sar., 2014). Neslaganja u našim i rezultatima ove dve grupe autora mogu se pripisati malom broju uzoraka u našoj studiji i različitim analiziranim genotipovima HCV-a, pošto su obe istraživačke grupe analizirale genotip 4. Asocijacija metilacionog statusa ispitivanih gena i starosti ispitanika nije detektovana u našoj studiji što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjem koje su sveli El-shaarawy i sar. (2022). Međutim, prethodne studije su ustanovile da je metilacija gena *RASSF1A* i *p16INK4a* bila češća kod starijih pacijenata sa HCK (Li i sar., 2012; Pasha i sar., 2019). Kako u našu studiju nisu bili uključeni pacijenti sa HCK, razlike u dobijenim rezultatima bi se delom mogle objasniti time što je metilacija gena ispitivana u različitim stadijumima bolesti. Kako je pokazano da je incidencija nastanka HCK veća kod starijih pacijenata (Shaker i sar., 2013; El-shaarawy i sar., 2022), kao i da učestalost metilacije gena *RASSF1A* i *p16INK4a* raste sa progresijom bolesti (El-Sabakawy i sar., 2015; Zhang i sar., 2016b; Mostafa i sar., 2020; El-shaarawy i sar., 2022; Nomeir i sar., 2022), ne iznenađuje da je grupa koja je ispitivala metilaciju ovih gena kod pacijenata sa HCK ustanovila da je metilacija povezana sa starijom dobi. Bilo bi korisno ispitati metilacioni status ovih gena kod pacijenata sa HCK u srpskoj populaciji, kako bi se ustanovila razlika u metilaciji u različitim fazama bolesti na nivou Srbije, što bi doprinelo potencijalnoj primeni metilacionog statusa ovih gena kao prognostičkih i dijagnostičkih markera bolesti jetre.

Rezultati naše studije su pokazali da je metilacija gena *RASSF1A* bila značajno češća kod pacijenata sa genotipom CC gena *IL28B*, nego kod pacijenata sa druga dva genotipa. Koliko nam je poznato, prvi smo analizirali vezu između SNP rs12979860 i metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a*. U svom istraživanju Hou i sar. (2014) su analizirali SNP gena *IL28B* i ekspresiju gena *RASSF1A*, međutim nisu utvrdili njihovu asocijaciju. Podaci iz literature sugerišu da bi *RASSF1A* i *IL28B* mogli biti delimično povezani preko regulacije ekspresije gena za interleukin-6 (*IL-6*). *IL-6* je multifunkcionalni citokin uključen u regulaciju širokog spektra aktivnosti, uključujući inflamaciju, hematopoezu i karcinogenezu (Taga i Kishimoto, 1997). Povećana ekspresija *IL-6*

povezana je sa nepovoljnim kliničkim ishodima kod pacijenata sa HCV i takođe je implicirana u progresiji različitih tipova tumora, uključujući HCC (Nishikawa i sar., 2017; Lu i sar., 2018). Pokazano je da pacijenti sa hroničnim hepatitisom C koji su nosioci genotipa CC gena *IL28B* imaju značajno povećanu koncentraciju IL-6 (Pavón-Castillero i sar., 2013), kao i da *RASSF1A* indukuje ekspresiju *IL-6* u A375 ćelijama melanoma (Yi i sar., 2018). Sa druge strane, IL-6 može regulisati ekspresiju određenih gena kao što su geni *RASSF1A* i *p16INK4a* putem miRNK-zavisne regulacije DNMT1. Prekomerna ekspresija *IL-6* u ćelijama holangiokarcinoma povezana je sa povećanom ekspresijom *DNMT1*, kao i sa smanjenom ekspresijom tumor supresorskih gena kao što su *RASSF1A* i *p16INK4a* (Braconi i sar., 2010). Ekspresija *DNMT1* se povećava ukoliko određene miRNK, kao što su miR-148 i miR-152, prestanu da se ekspremiraju ili se smanjeno ekspimiraju. IL-6 je jedan od proteina čija povećana koncentracija smanjuje ekspresiju ovih miRNK (Braconi i sar., 2010). Dakle, možemo spekulirati da bi odsustvo ili smanjena ekspresija *RASSF1A* zbog metilacije njegovog promotora takođe mogla dovesti do smanjene ekspresije *IL-6*. Sa druge strane smanjena ekspresija *IL-6* bi mogla da dovede do smanjenja ekspresije *DNMT1* i posledično do povećane ekspresije *RASSF1A*. Međutim, ove pretpostavke treba proveriti imajući u vidu da je veza između *RASSF1A* i IL-6 kompleksna. Rezultati koje smo dobili u ovoj studiji su pokazali da je kod pacijenata sa uznapredovalom fibrozom koji su bili nosioci genotipova CT/TT gena *IL28B*, *RASSF1A* bio isključivo nemetilovan, dok je distribucija metilacije *RASSF1A* među pacijentima sa genotipom CC *IL28B* bila slična, bez obzira na stadijum fibroze. Ovaj rezultat podržava našu hipotezu da bi mogla postojati povezanost između genotipa *IL28B* i metilacije *RASSF1A*. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja na većem broju uzoraka da bi se to i potvrdilo.

U našoj studiji je utvrđena asocijacija metilacije gena *RASSF1A* sa koncentracijom RNK HCV-a većom od 400 000 IU/mL. Za sada ne postoje druga istraživanja koja su ustanovila ovu povezanost, stoga je potrebno dodatno potvrditi naše rezultate. U početnim istraživanjima, koncentracija od 800 000 IU/mL predstavljala je granicu između niske i visoke koncentracije RNK HCV-a (Pawlotsky, 2000). Međutim, kasnija istraživanja su utvrdila da je početna koncentracija RNK HCV-a od 400 000 IU/mL granična tačka između niske i visoke viremije kod genotipa 1b, koja je takođe povezana sa odgovorom na terapiju (Fried i Hadziyannis, 2004; Berg i sar., 2006). Prethodno je ustanovljeno da pacijenti sa manjom koncentracijom RNK HCV-a češće postižu SVO, međutim u našoj grupi ispitanika nije uočena veza između koncentracije RNK HCV-a i odgovora na terapiju, a jedan od mogućih razloga je mali broj ispitanika (Manns i sar., 2006). Moguće je da je veća koncentracija RNK HCV-a dovela do povećane metilacije preko narušene regulacije mašinerije za metilaciju i indirektno, preko proliferativnih stimulusa povezanih sa upalom (El-Sabakawy i sar., 2015).

Metilacioni status gena *RASSF1A*, kao ni *p16INK4a* nije bio povezan sa odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV u našoj studiji, dok su Mostafa i sar. (2020) u svojim istraživanjima na genotipu 4, uočili asocijaciju metilacije istih gena sa izostankom odgovora na kombinovanu terapiju. Razlozi neslaganja dobijenih rezultata mogu biti mala veličina uzorka u našoj studiji, ali i razlika u analiziranim genotipovima virusa hepatitisa C. Prema našim saznanjima, ne postoje druga istraživanja metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* kod genotipa 1b.

U daljim analizama, kada smo uporedili grupe ispitanika sa oba metilovana i oba nemetilovana gena, primetili smo da su svi ispitanici kod kojih nije došlo do odgovora na terapiju imali nemetilovane promotore i *RASSF1A* i *p16INK4a* gena (15/15), dok su sva tri ispitanika (3/3) sa metilovanim promotorima oba ispitivana gena postigli SVO. Potrebno je istraživanje većeg broja ispitanika kako bi se utvrdilo da li istovremena analiza metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* može da predvidi odgovor na kombinovanu antivirusnu terapiju. Kada je u analizu uključen i polimorfizam rs12979860 gena *IL28B*, pokazano je da su istovremena metilacija ili *RASSF1A* ili *p16INK4a* i prisustvo genotipa CC gena *IL28B* bili povezani sa SVO. Međutim, samo je rezultat za *RASSF1A* ostao značajan nakon primene korekcije za višestruka poređenja. Stoga, ulogu *p16INK4a* treba dalje ispitati na većem broju uzoraka. Prediktivna uloga metilacionog profila DNK specifičnih gena kod pacijenata sa hroničnom infekcijom nije dovoljno proučavana, za sada

samo u nekoliko studija (N Zekri i sar., 2014; Zekri i sar., 2014; Huang i sar., 2018; Mostafa i sar., 2020). Postojeći literaturni podaci sugerišu da je metilacija gena *RASSF1A* i *p16INK4a* značajno povezana sa BO grupom pacijenata (N Zekri i sar., 2014; Mostafa i sar., 2020). Ovo neslaganje rezultata moglo bi se delimično objasniti činjenicom da su obe grupe autora ispitivale pacijente sa HCV genotipom 4, a poznato je da genotip virusa može uticati na odgovor na antivirusnu terapiju (Webster i sar., 2000; Keikha i sar., 2020). Pored toga, pokazane su geografske varijacije u obrascu metilacije više gena uključenih u HCK, što takođe treba uzeti u obzir (Shen i sar., 2002).

U ovoj studiji metilacija gena *RASSF1A* i *p16INK4a* je analizirana iz cirkulišuće DNK, izolovane iz plazme obolelih, tzv. „tečne biopsije“. Izmenjeni metilacioni obrasci DNK prisutni u tkivu jetre mogu da se detektuju i u krvi obolelih, u cirkulišućoj DNK i to na stupnju prekancerogenih promena (N Zekri i sar., 2014). Biopsija jetre ostaje zlatni standard za dijagnozu različitih hroničnih oboljenja jetre, kao i za određivanje težine oštećenja jetre, upale i stadijuma fibroze. Međutim, biopsija jetre je invazivna i podložna je greškama prilikom uzorkovanja (Shabangu i sar., 2020). Štaviše, uprkos intenzivnim istraživanjima, trenutno dostupni neinvazivni testovi krvi nisu dovoljno osetljivi ili specifični i stoga imaju ograničenu upotrebu. Različiti modaliteti snimanja, uključujući MRI i elastografiju zasnovanu na ultrazvuku, koriste se za procenu steatoze i fibroze jetre, međutim postoji potreba za poboljšanjem dijagnostičke tačnosti, posebno u ranim fazama fibroze (Horowitz i sar., 2017). Takođe, široko korišćeni biomarker za skrining HCK, povišeni nivo alfa-fetoproteina (AFP), je biomarker ograničene specifičnosti i osetljivosti, jer njegov nivo može biti povišen ne samo kod pacijenata sa HCK, već i kod pacijenata sa upalom i cirozom jetre. Biomarkeri koji bi mogli da nadomeste ove nedostatke pružili bi značajan napredak u dijagnozi i praćenju progresije bolesti u kliničkim uslovima. Tečna biopsija kao manje invazivna alternativa biopsiji tkiva ima potencijal da nadomesti nezadovoljene kliničke potrebe, uključujući osetljivost, specifičnost, određivanje prognoze i predviđanje odgovora na terapiju (Fu i sar., 2023).

Metilacija DNK bi potencijalno mogla da se koristi za otkrivanje tumora, skrining ili praćenje bolesti. Nekoliko studija je pokazalo da se promene metilacije mogu otkriti u tkivu, na nivou genomske DNK, kao i u krvi, na nivou cirkulišuće DNK (Wong i sar., 1999; Fiegl i sar., 2005; Zekri i sar., 2014). Pošto se genomska DNK može izolovati iz cirkulišućih tumorskih ćelija, razvijeni su dijagnostički testovi koji otkrivaju njene aberantne metilacione obrasce (Locke i sar., 2019). U slučaju metilacije gena *RASSF1A*, ona je implementirana u dijagnostički test ConfirmMDk koji otkriva povećanu metilaciju gena *GSTP1*, *RASSF1A* i *APC* u tkivu tumora prostate (Mikeska i Craig, 2014). Hipermetilacija gena *RASSF1A* u cirkulišućoj DNK pacijenata sa HCK pokazala je visoku specifičnost u diskriminaciji obolelih sa HCK od zdravih kontrola (Okajima i sar., 2017), kao i između obolelih sa HCK i onih sa hroničnim hepatitisom C (Mohamed i sar., 2012). Integracija *RASSF1A* u metilacioni panel sa različitim genima povećala je njihov dijagnostički potencijal za HCK (Huang i sar., 2011; Dong i sar., 2017; Okajima i sar., 2017). Zbog velike heterogenosti tumora, obična biopsija tkiva daje samo deo subpopulacije malignih ćelija, što stvara pogrešnu sliku o pravom ćelijskom sastavu tumora. Nasuprot tome, svi tipovi tumorskih ćelija doprinose ukupnom pulu cirkulišuće DNK, pružajući preciznije informacije o tumoru. Potencijalni izazov u vezi sa cirkulišućom DNK mogli bi predstavljati retki podtipovi tumora i tumori u ranoj fazi nastanka, u kojima koncentracija cirkulišuće DNK može biti preniska za detekciju dijagnostičkim testom. Takođe, postoji mogućnost da je gen *RASSF1A* metilovan u genomskoj DNK jetre, ali ne i u cirkulišućoj DNK. Ovo se može objasniti činjenicom da se metilacija u cirkulišućoj DNK može detektovati nakon nekroze malignih ćelija. Nasuprot tome, metilacija genomske DNK se može detektovati kada je maligna ćelija još živa. Dakle, nemogućnost detekcije metilacije gena *RASSF1A* u cirkulišućoj DNK ne isključuje mogućnost prisustva tumora (Raos i sar., 2021). Procena nivoa ekspresije metilovanog gena *p16INK4a* u serumu, kao potencijalnog neinvazivnog biomarkera za dijagnozu HCK, može biti ograničena na slučajeve koji imaju normalni nivo AFP-a, posebno kod pacijenata sa cirozom kod kojih su biopsija jetre i/ili radiološko snimanje kontraindikovani (Elsewify i sar., 2020). Uprkos svim ovim izazovima, razvijeni su i integrisani u kliničku praksu različiti testovi za otkrivanje aberantno metilovanih gena u cirkulišućoj DNK kod

obolelih od kolorektalnog karcinoma, ciroze, glioblastoma i tumora pluća (Locke i sar., 2019). Jedno od ograničenja naše studije je nemogućnost analize metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* u tkivu jetre i njena korelacija sa analizom metilacionog statusa ovih gena u cirkulišućoj DNK.

Danas se mnogo ulaže u razvoj različitih epigenetičkih terapijskih pristupa zbog reverzibilnosti epigenetičkih promena (Herath i sar., 2006). Epigenetički lekovi dovode do ponovnog eksprimiranja utišanih gena, bilo demetilacijom metilovanih promotorskih regiona (demetilacioni agensi) ili acetilacijom histona (Ganesan i sar., 2019). Nekoliko jedinjenja kao što su 5-azacitidin (Vidaza), 5-aza-dC (decitabin), MS-275 i valproična kiselina je pretklinički testirano i pokazalo obećavajuće rezultate u HCK i drugim tumorima (Herceg i Paliwal, 2011). Zbog toga je izuzetno važno da se pacijenti sa visokim rizikom u različitim stadijumima bolesti pažljivo prate, kako bi se na vreme identifikovali oni sa povećanim rizikom od razvoja HCK. Ovo je ključno kako za rano otkrivanje bolesti, tako i za istraživanja potencijalnih epigenetičkih terapijskih intervencija.

Prve studije o prisustvu specifičnih polimorfizama u genomu HCV i njihovom uticaju na razvoj HCK objavljene su početkom 2000-ih (Nagayama i sar., 2000; Takahashi i sar., 2001). Nakon toga je pokazano da amino-kiselinske izmene unutar proteina C HCV-a, kod pacijenata sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C, imaju uticaj na odgovor na kombinovanu antivirusnu terapiju PEG-IFN/RBV (El-Shamy i sar., 2012; Campos i sar., 2023). Protein C može da inaktivira različite gene u genomu domaćina utičući na metilaciju njihovih promotora, što dovodi do oštećenja jetre i karcinogeneze (Lim i sar., 2012; Devi i sar., 2021; Wang i sar., 2022; Campos i sar., 2023). Dva gena na čiji metilacioni status utiče protein C HCV-a su i tumor supresorski geni *RASSF1A* i *p16INK4a* (Guo i sar., 2011; Park i sar., 2011; Lim i sar., 2012). Zbog toga je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio istražiti moguću povezanost najčešćih amino-kiselinskih izmena u proteinu C i odgovora na kombinovanu terapiju, kako pojedinačnih, tako i u kombinaciji sa polimorfizmom gena *IL28B* i metilacionim statusom gena *RASSF1A* i *p16INK4a*.

U našem istraživanju, amino-kiselinske izmene na poziciji 70 HCV proteina C su detektovane kod 41,4% ispitanika, na poziciji 75 kod 44,8% ispitanika, na poziciji 91 kod 34,5% ispitanika, na poziciji 110 kod 13,8% ispitanika, dok su kod 13 ispitanika detektovane dve ili više amino-kiselinske izmene istovremeno, što je u skladu sa rezultatima većine prethodnih studija (Fukuhara i sar., 2010; Tachi i sar., 2010; Miura i sar., 2013; Dehghani i sar., 2020; Khan i sar., 2022;). Razlog postojanja razlika u rezultatima učestalosti amino-kiselinskih izmena može biti ispitivanje različitog genotipa HCV-a, kao u slučaju istraživanja Khan i sar. (2022), koji su ispitivali genotip 3a ili razlike u geografskom poreklu, kao u slučaju istraživanja Dehghani i sar. (2020), u čije ispitivanje su bili uključeni pacijenti iranskog porekla. Po učestalosti različitih tipova amino-kiselinskih izmena, najčešće smo detektovali izmenu R70Q (31%), a zatim izmene T75A (24%) i M91C (24%), što je u velikoj meri u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Fukuhara i sar., 2010; Tachi i sar., 2010; Alestig i sar., 2011; Miura i sar., 2013; Dehghani i sar., 2020; Khan i sar., 2022; Campos i sar., 2023). U našoj studiji najčešća amino-kiselinska izmena u proteinu C na poziciji 70 je bila izmena R70Q (75%) što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Alestig i sar., 2011; Dehghani i sar., 2020; Campos i sar., 2023). Izmjena R70P je detektovana kod jednog ispitanika. Ova izmena je prethodno detektovana samo kod argentinskih, švedskih i brazilskih pacijenata (Alestig i sar., 2011; Parra i sar., 2017; Campos i sar., 2023). Meta-analiza koju su sproveli Alestig i sar. (2011) pokazala je da je učestalost R70P bila 3% kod genotipa 3, i 13% kod genotipa 6. Učestalost ove varijacije je izuzetno niska, posebno za genotip 1. Najčešća amino-kiselinska izmena u protein C na poziciji 75 je bila izmena T75A (54%), koja je takođe bila najčešća i u japanskoj populaciji (Miura i sar., 2013). U našem istraživanju najčešća amino-kiselinska izmena na poziciji 91 je bila izmena M91C (70%). U istraživanju Campos i sar. (2023), najčešća amino-kiselinska izmena na poziciji 91 za genotip 1b je bila L91M, a za genotip 1a C91M. Prisustvo cisteina na poziciji 91 u proteinu C HCV-a genotipa 1a sugerise molekularni potpis jedinstven za ovaj

podgenotip, pošto je samo jedna studija pokazala prisustvo izmene C91M u proteinu C HCV genotipa 1a (Korba i sar., 2015).

U pogledu varijabilnosti sekvence regiona C HCV-a, nismo pronašli povezanost amino-kiselinskih izmena u proteinu C virusa na pozicijama 70, 75, 91 i 110 i osnovnih kliničko-patoloških karakteristika ispitanika, kao što su starost i pol, genotip gena *IL28B* i metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a*. Međutim, uočen je trend ka češćoj pojavi genotipa CC gena *IL28B* kod ispitanika sa prisustvom amino-kiselinske izmene na poziciji 91 u proteinu C ($p=0,055$), što je u skladu sa istraživanjem koje su sprovedeli Sultana i sar. (2016) u kome su ustanovili povezanost prisustva amino-kiselinske izmene na poziciji 91 i/ili poziciji 70 i genotipa CC gena *IL28B*. Potrebno je izvršiti analizu na većem broju uzoraka, kako bi se potvrdio ovaj rezultat. Miura i sar. (2012) su takođe pokazali značajnu povezanost polimorfizma rs8099917 *IL28B* i amino-kiselinske izmene na poziciji 70 proteina C, što je potvrdilo postojanje kompleksne interakcije između domaćina i virusa u hroničnoj infekciji HCV-om, iako molekularni mehanizmi njihove interakcije ostaju nepoznati. U našoj studiji u kojoj smo ispitivali SNP rs12979860 *IL28B*, nije pronađena povezanost ovog polimorfizma i amino-kiselinskih izmena proteina C HCV-a.

Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali povezanost amino-kiselinskih izmena proteina C HCV-a i metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a*. Epigenetičke promene u ćelijskim linijama hilarnog holangiokarcinoma sugerišu da protein C HCV-a povećava rizik od hilarnog holangiokarcinoma promovišući metilaciju promotora gena *RASSF1A* posredno, preko regulacije histon metiltransferaze SMID3 (Guo i sar., 2011). S druge strane, trebalo bi ispitati da li protein C na sličan način utiče na metilacioni status gena *RASSF1A* i kod HCK, ali i u različitim stadijumima fibroze i ciroze jetre. Pokazano je da protein C HCV-a indukuje hipermetilaciju gena *p16INK4a* u humanim hepatocitima (Park i sar., 2011; Lim i sar., 2012). Stoga je tretman ćelija sa eksprimiranim genom C HCV-a, univerzalnim inhibitorom DNMT, 5-Aza-2'dC, efikasno reaktivirao ekspresiju gena *p16INK4a*, što je dovelo do inhibicije proliferacije ćelija (Park i sar., 2011). Cha i sar. (2021) su pokazali da postoji i alternativni mehanizam, posredovan proteinom PA28 γ , kojim protein C inaktivira protein p16INK4a. Uticaj proteina C na p16INK4a se može inhibirati kako 5-Aza-2'dC, univerzalnim inhibitorom DNMT, tako i MG132, univerzalnim inhibitorom proteazoma.

Tokom istraživanja nismo uočili povezanost amino-kiselinskih izmena na poziciji 70 u proteinu C HCV-a i stadijuma fibroze jetre, što je u saglasnosti sa rezultatima nekih od prethodnih istraživanja (Fukuhara i sar., 2010; Campos i sar., 2023). Nasuprot tome, druge grupe istraživača su pokazale vezu amino-kiselinske izmene R70Q/H sa progresijom bolesti, nastankom ciroze i HCK (Nakamoto i sar., 2010; Miura i sar., 2012; Araujo i sar., 2014). Tako je istraživanje Araujo i sar. (2014) pokazalo da je u brazilskoj populaciji amino-kiselinska izmena R70Q značajno češća kod pacijenata sa cirozom i HCK nego kod ispitanika bez ciroze i HCK. Takođe, Miura i sar. (2012) su pokazali da su amino-kiselinske izmene na poziciji 70 proteina C povezane sa progresijom bolesti i razvojem HCK kod pacijenata sa infekcijom HCV-om genotipa 1b. Amino-kiseline 70Q/H proteina C su povezane sa progresijom bolesti i razvojem HCK, konkretno, amino-kiselinska izmena R70Q je povezana sa progresivnom bolešću, a amino-kiselinska izmena Q70R je povezana sa stabilnom bolešću (Nakamoto i sar., 2010; Kobayashi i sar., 2010; Miura i sar., 2012). Ako bi amino-kiseline u proteinu C bile "fiksirane" tokom progresije bolesti, HCV sa amino-kiselinom 70Q mogao bi biti „onkogeni“ virus, dok bi HCV sa amino-kiselinom 70R mogao biti „neonkogeni“, a početna virusna sekvenca bi mogla predvideti progresiju bolesti. Međutim, Miura i sar. (2012) su pokazali da je kod određenog broja pacijenata došlo do promene sekvenci proteina C tokom perioda posmatranja od oko 10 godina. Među ovim promenama, R70Q je bila češća od Q70R. Ovi rezultati pokazuju da amino-kiselina na poziciji 70 nije fiksirana, već da postoji mogućnost da dođe do njene izmene tokom bolesti što je u bliskoj vezi sa progresijom bolesti i razvojem HCK. Nažalost, zbog nedostupnih uzoraka pacijenata sa cirozom i HCK, nije bilo moguće utvrditi razliku u učestalosti ove izmene u srpskoj populaciji kod pacijenata sa i bez ciroze i HCK. Mogući razlog neslaganja dobijenih rezultata može biti mali broj uzoraka u našoj studiji, različite ispitivane populacije kao i

različiti genotip virusa. Takođe, nismo uočili povezanost amino-kiselinskih izmena na poziciji 75 i stadijuma fibroze jetre, što je u skladu sa istraživanjem Fukuhara i sar. (2010). Uticaj ove amino-kiselinske izmene na progresiju bolesti još uvek nije dovoljno ispitan (Tachi i sar., 2010; Miura i sar., 2013). Isto tako u našoj studiji nije primećena povezanost amino-kiselinske izmene na poziciji 91 u proteinu C HCV-a i stadijuma fibroze jetre, što se podudara sa rezultatima prethodnih studija (Fukuhara i sar., 2010; Araujo i sar., 2014; Campos i sar., 2023).

Uticaj amino-kiselinskih izmena na različitim pozicijama proteina C HCV-a na odgovor na kombinovanu terapiju i progresiju fibroze još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Amino-kiselinska izmena na poziciji 70 u proteinu C HCV-a, zajedno sa polimorfizmom gena *IL28B*, je jedan od najvažnijih faktora odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV (Alestig i sar., 2011). Stoga smo u daljem toku istraživanja ispitivali uticaj amino-kiselinskih izmena u proteinu C HCV-a na odgovor na kombinovanu terapiju. U našoj studiji nismo pronašli povezanost amino-kiselinskih izmena na poziciji 70 u proteinu C HCV-a sa odgovorom na terapiju. Dosadašnja istraživanja su prijavljivala različite rezultate. Određene studije nisu pronašle ovu povezanost, što se slaže sa našim rezultatima (Nakamoto i sar., 2010; Campos i sar., 2023), dok su druge studije uočile povezanost amino-kiselinskih izmena na poziciji 70 sa odgovorom na terapiju (Akuta i sar., 2005; Okanoue i sar., 2009; Alestig i sar., 2011; Hayashi i sar., 2011; El-Shamy i sar., 2012; Sultana i sar., 2016). Tako su El-Shami i sar. (2012), Alestig i sar. (2011) i Akuta i sar. (2005) pokazali da je amino-kiselinska izmena na poziciji 70 proteina C povezana sa lošijim odgovorom na terapiju kod pacijenata sa genotipom 1b, dok su Okanoue i sar. (2009) i Hayashi i sar. (2011) primetili da je odsustvo amino-kiselinske izmene na poziciji 70 u proteinu C povezano sa postizanjem SVO kod HCV-a genotipa 1b. Pored toga, Sultana i sar. (2016) su otkrili da je odsustvo amino-kiselinskih izmena na poziciji 70 proteina C povezano sa postizanjem SVO kod ispitanika inficiranih genotipom 1b HCV-a, dok druga grupa autora nije pronašla povezanost između amino-kiselinske izmene na poziciji 70 u proteinu C i odgovora na terapiju kod genotipa 1a i 3a HCV (Hashempour i sar., 2020). Takođe, nismo uočili povezanost amino-kiselinske izmene na poziciji 75 sa odgovorom na terapiju. Uticaj amino-kiselinske izmene na ovoj poziciji na odgovor na terapiju nije dovoljno ispitan, i samo je par studija prijavilo ovu izmenu (Fukuhara i sar., 2010; Tachi i sar., 2010; Miura i sar., 2013). Rezultati naše studije nisu pokazali povezanost amino-kiselinskih izmena na poziciji 91 sa odgovorom na terapiju što se podudara sa rezultatima većine prethodnih studija (Okanoue i sar., 2009; Nakamoto i sar., 2010; Alestig i sar., 2011; El-Shamy i sar., 2012). Međutim, određene studije su pronašle povezanost ove izmene sa odgovorom na terapiju (Akuta i sar., 2005; Sultana i sar., 2016). Tako su Akuta i sar. (2005) ustanovili da je prisustvo amino-kiselinskih izmena na poziciji 91 povezano sa lošijim odgovorom na terapiju, dok su Sultana i sar. (2016) pokazali da je njihovo odsustvo povezano sa postizanjem SVO. Oprečni rezultati različitih studija mogu biti posledica malog broja ispitanika, kao u našoj studiji, ali i različite ispitivane populacije, kao i različit genotip virusa.

Mehanizam potencijalnog uticaja amino-kiselinskih izmena u proteinu C na odgovor na terapiju je nepoznat, a moguće je da je amino-kiselinska izmena na poziciji 70 samo indirektno povezana sa odgovorom. Ovo potkrepljuje činjenica da se tipična amino-kiselina na poziciji 70 proteina C razlikuje između genotipova bez ikakvog uočenog uticaja na odgovor na terapiju. Tako je varijanta R70, koja je povezana sa postizanjem SVO kod pacijenata sa HCV genotipom 1b, primećena u 98% sekvenci genotipa 1a iz GenBank-a (Alestig i sar., 2011). Suprotno tome, Q70, varijanta koja je povezana sa lošijim odgovorom na terapiju kod pacijenata koji nose genotip 1b, je dominantna u genotipovima 5 i 6, uprkos činjenici da pacijenti koji nose ove genotipove reaguju jednako dobro ili bolje od pacijenata inficiranih genotipom 1 (Nguyen i Keefe, 2005). Ova zapažanja ne isključuju direktan efekat amino-kiseline na poziciji 70 na odgovor na terapiju, jer glutamin na poziciji 70 može drugačije da utiče na konformaciju i funkciju proteina C kod HCV-a genotipa 1b nego kod HCV-a genotipa 1a ili drugih genotipova. Zaista, uočeno je da genotipovi 1a i 1b pokazuju različite obrasce povezanosti genetičke varijabilnosti i odgovora na terapiju (Donlin i sar., 2007). Moguće je da takve razlike mogu doprineti objašnjenju za navodno veće stope postizanja SVO kod pacijenata genotipom 1b nego kod pacijenata sa genotipom 1a (Martinez i sar., 2020).

U svojoj studiji, Funaoka i sar. (2011) su ispitivali efekat IFN- α na HCV sa amino-kiselinskim izmenama R70Q/H i L91M u proteinu C, u smislu replikacije virusa i odgovora na terapiju i otkrili su značajno veći stepen otpornosti na IFN u poređenju sa *wild-type* virusom, povezan sa smanjenom ekspresijom interferonom stimulisanih gena. Predloženo je da je interferonska rezistencija HCV sa navedenim izmenama povezana sa inhibicijom interferonskog signalnog puta, koji potencijalno uključuje SOCS3 (eng. *suppressor of cytokine signaling*). Ovi proteini su stimulisani različitim citokinima uključujući IL-6, čija je ekspresija povećana u ćelijama transfekovanim HCV-om sa izmenjenim proteinom C. Ovaj mehanizam je uočen i *in vivo*, jer pacijenti sa hroničnim hepatitisom C imaju povećan nivo inflamatornih citokina, uključujući IL-6 i TNF- α (Sekiguchi i sar., 2012). Još jedan mehanizam koji bi mogao objasniti ulogu amino-kiselinskih izmena proteina C u rezistenciji na interferon je njihov potencijalni uticaj na nastanak *minicore* proteina - izoformi normalnog proteina C, kojima nedostaje amino-kraj (Eng i sar., 2009). Dva važna *minicore* proteina se završavaju u blizini aminokiselina 70 i 91; shodno tome, bilo kakve promene ovih amino-kiselina mogu izmeniti funkcije proteina *minicore* i posledično funkcionisanje HCV-a i osetljivost na IFN (El-Shamy i sar., 2014).

U našem radu nije uočena asocijacija između amino-kiselinskih izmena na poziciji 70 proteina C HCV-a i genotipova gena *IL28B*, kao ni između amino-kiselinskih izmena na poziciji 70 proteina C HCV-a i metilacionog statusa gena *RASSF1A*. Međutim, ustanovili smo da je čak 85,7% ispitanika sa amino-kiselinskom izmenom na poziciji 70 proteina C i genotipovima CT/TT gena *IL28B* nije odgovorilo na terapiju. Pored toga, kod svih ispitanika sa amino-kiselinskim izmenama na poziciji 70 proteina C i genotipovima CT/TT gena *IL28B* detektovan je nemetilovani gen *RASSF1A*. Zatim smo ustanovili da je podgrupa pacijenata sa amino-kiselinskim izmenama na poziciji 75 i genotipovima CT/TT gena *IL28B* imala lošiji odgovor na terapiju, što je bilo statistički značajno, kao i da je ova podgrupa imala nemetilovani gen *RASSF1A*. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Alestig i sar. (2011), koji su utvrdili da su amino-kiselinske izmene proteina C na poziciji 70 povezane sa lošijim odgovorom na terapiju kod pacijenata sa genotipom CT gena *IL28B*. Sa druge strane, podgrupa pacijenata sa amino-kiselinskim izmenama na poziciji 91 i genotipom CC gena *IL28B* je češće postizala SVO, što je bilo statistički značajno.

Poznato je da je SNP rs12979860 gena *IL28B* u direktnoj korelaciji sa odgovorom na terapiju PEG-IFN/RBV kod pacijenata sa hroničnom infekcijom i genotipom 1 (Sugiyama i sar., 2011). U našem istraživanju je uočeno da su ispitanici sa genotipom CC gena *IL28B* bili značajno češći u SVO nego u BO grupi ispitanika, međutim nije uočena veza ovog polimorfizma i amino-kiselinskih izmena u proteinu C, kao ni veza ovih amino-kiselinskih izmena i odgovora na terapiju. Alestig i sar. (2011) su pokazali da ovaj SNP ima snažan uticaj na odgovor na terapiju jer je većina pacijenata sa genotipom CC, za razliku od pacijenata sa genotipom TT, postigla SVO. U istoj studiji je pokazano da su amino-kiselinske izmene na poziciji 70 proteina C povezane sa lošijim odgovorom na interferonsku terapiju. Ovi rezultati sugerišu da bi snažan uticaj genotipa gena *IL28B* na odgovor na terapiju, mogao maskirati efekat koji amino-kiselinske izmene proteina C imaju na odgovor na terapiju. Rizik od maskiranja efekta je verovatno manji u Japanu, gde većina pacijenata ima povoljan CC genotip, nego u evropskoj populaciji, u kojoj su takođe česti genotipovi CT/TT (Akuta i sar., 2005). Međutim, Alestig i sar. (2011) nisu pronašli značajnu povezanost genotipa rs12979860 gena *IL28B* i amino-kiselinskih izmena na poziciji 70 proteina C, dok su uticaj ovih amino-kiselinskih izmena na odgovor na terapiju utvrdili i unutar grupe sa genotipom CT, te su stoga zaključili da efekat amino-kiselinskih izmena proteina C ne zavisi samo od genotipa *IL28B*, i da bi analiza amino-kiselinskih izmena proteina C mogla biti klinički relevantna, prvenstveno kod pacijenata sa genotipom CT. Njihovi rezultati podržavaju rezultate dobijene u našem istraživanju.

Iako u našem radu nije pronađena asocijacija genotipa gena *IL28B*, metilacionog statusa gena *RASSF1A* i progresije fibroze jetre, prethodni podaci ukazuju na moguću povezanost *RASSF1A* i *IL28B*, delom preko regulacije ekspresije gena *IL6* (Pavón-Castillero i sar., 2013; Yi i sar., 2018). Pokazano je da *RASSF1A* indukuje ekspresiju *IL-6* u ćelijama melanoma A375 (Yi i sar., 2018) i

da je povećana ekspresija *IL-6* povezana sa nepovoljnim kliničkim ishodima kod pacijenata sa HCV i progresijom u HCK (Nishikawa i sar., 2017; Lu i sar., 2018). S druge strane, amino-kiselinska izmena R70Q proteina C HCV-a je povezana sa povećanom ekspresijom *IL-6*, koja može izazvati insulinsku rezistenciju, steatozu i HCK i inhibirati interferonsku signalizaciju, povezanu sa lošijim terapijskim ishodom (Uraki i sar., 2015). Dakle, možemo pretpostaviti da nemetilovani gen *RASSF1A* i amino-kiselinska izmena R70Q mogu dovesti do lošijeg odgovora na terapiju zbog povećane ekspresije *IL-6*, ali to zahteva dalje istraživanje. Prethodne studije su pokazale da se amino-kiselinske izmene na poziciji 70 proteina C mogu koristiti kao prediktori ishoda lečenja, kao i prediktori nastanka HCK nakon DAA terapije (Ogata i sar., 2018; Akuta i sar., 2019). Na osnovu prethodnih istraživanja, kao i rezultata naše studije, varijabilnost u genu C HCV-a mogla bi biti prediktivni faktor ishoda kombinovane terapije PEG-IFN/RBV ili DAA terapije. Kontradiktorni rezultati bi takođe mogli biti posledica male veličine uzorka u našoj studiji.

Kod ispitanika sa uznapredovalim stadijumom oštećenja jetre izazvanih hroničnom infekcijom HCV-a, inflamatorni procesi mogu nastaviti da predstavljaju važan rizik za napredovanje fibroznog stanja i razvoj HCK, čak i nakon uklanjanja virusne infekcije, pogotovo kod pacijenata sa cirozom, kao i kod pacijenata sa pridruženim komorbiditetima (konzumiranje alkohola, metabolički sindrom, HIV itd.) (Macek Jilkova i sar., 2021; Milosevic i sar., 2023; Syyam i sar., 2023). SVO može smanjiti rizik od nastanka HCK kod većine pacijenata sa cirozom jetre povezanom sa HCV; međutim, danas se zna da postizanje SVO nakon IFN ili DAA terapije ne dovodi uvek do zaustavljanja progresije bolesti ili regresije fibroze (Syyam i sar., 2023). Određene publikacije sugerišu da je rizik od HCK nakon tretmana DAA veći u poređenju sa tretmanom zasnovanim na IFN (Nagata i sar., 2017; Janjua i sar., 2020). Druge publikacije, međutim, nisu pokazale značajne razlike u riziku od razvoja HCK između ova dva tretmana (Waziry i sar., 2017; Ioannou i sar., 2018a; Ioannou i sar., 2018b). Neke studije su uočile povećanu i rekurentnu stopu HCK kod pacijenata sa cirozom, koji su lečeni DAA terapijom (Grandhe i sar., 2017; El Kassas i sar., 2018; Sasaki i sar., 2018). Sa druge strane, pokazana je korelacija između nižeg rizika od nastanka HCK nakon DAA terapije kod pacijenata bez fibroze u odnosu na pacijene sa prisutnom fibrozom i cirozom pre terapije (Ioanno i sar., 2018; Kulik i El-Serag, 2019). Pored toga, ciroza je u korelaciji sa većom stopom mortaliteta kod pacijenata lečenih sa DAA terapijom. Mortalitet ovih pacijenata se povećava u korelaciji sa stadijumom fibroze (Kulik i El-Serag, 2019; Dash i sar., 2020). Bitan problem je i cena DAA terapije, koja je značajno skuplja u odnosu na PEG-IFN/RBV terapiju (Henry, 2018), kao i pojava varijanti virusa koje sadrže amino-kiselinske izmene sposobne da dovedu do rezistencije na jedan ili više DAA (Sorbo i sar., 2018). Na osnovu svega navedenog možemo zaključiti da primenu terapije PEG-IFN/RBV još uvek ne bi trebalo u potpunosti isključiti.

Pokazano je da je amino-kiselinska izmena na poziciji 70 proteina C kod pacijenata sa HCV genotipom 1b na početku DAA terapije je važan prediktor hepatokarcinogeneze nakon eradikacije RNK HCV-a (Akuta i sar., 2019). Zbog toga je važno utvrditi amino-kiselinske izmene na poziciji 70 proteina C HCV pre početka antivirusne terapije, čak i u slučajevima primanja DAA terapije nakon terapije zasnovane na IFN. Pored toga, epigenetičke promene su postale interesantne mete za terapiju tumora. Štaviše, ove promene su takođe prepoznate kao jedan od mehanizama stečene rezistencije na lekove (Milosevic i sar., 2023). Pa bi tako hipermetilacija promotora gena *RASSF1A* mogla biti biomarker za ranu dijagnozu HCK i potencijalna molekularna meta za epigenetičku terapiju (Araujo i sar., 2016). U studiji koju su sproveli Liu i sar., (2017) ustanovljeno je da je metilacija gena *RASSF1A* u cirkulišućoj DNK u pozitivnoj korelaciji sa veličinom tumora, kao i da je hipometilacija LINE-1 elemenata povezana sa progresijom tumora i lošom prognozom. Kombinacija analize metilacije LINE-1 i *RASSF1A* u cirkulišućoj DNK je predvidela ponovnu pojavu bolesti nakon resekcije HCK (Liu i sar., 2017). Potreban je veći broj studija da bi se potvrdio potencijalni klinički značaj amino-kiselinskih izmena na poziciji 70 u proteinu C HCV-a, polimorfizma rs12979860 gena *IL28B* i metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a* kao prediktivnih faktora odgovora na terapiju, posebno DAA terapiju, gde postoji mogućnost da pacijenti koji su postigli SVO imaju veću verovatnoću razvoja HCK. Definisane pouzdanih

molekularnih markera koji će efikasno predvideti odgovor na terapiju zasnovanu na IFN-u i rizik od razvoja HCK bi bilo od velikog kliničkog interesa za pacijente koji su hronično inficirani HCV-om genotipom 1b. Razvoj i upotreba metodologija koje omogućavaju rano otkrivanje genetičkih polimorfizama virusa, kao i stalno praćenje pacijenata nakon terapije, predstavljaju kritične prognostičke alate za smanjenje verovatnoće progresije inflamacije jetre i poboljšanje kliničkog stanja pacijenata.

Dobijeni rezultati u našoj studiji ukazuju na potrebu za daljim istraživanjem u koje bi bile uključene analize metilacionog statusa dodatnih gena uključenih u odgovor domaćina na hroničnu infekciju HCV-om, kao i analize amino-kiselinskih izmena drugih proteina HCV-a. Takođe, značajno bi bilo analizirati navedene parametre u različitim stadijumima bolesti, od fibroze, preko ciroze jetre do HCK, kao i u odnosu na DAA terapiju.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Uočena je statistički značajna asocijacija između genotipa CC gena *IL28B* i postizanja SVO, dok su genotipovi CT/TT u asocijaciji sa izostankom odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV kod obolelih sa hroničnom infekcijom virusom HCV genotipa 1b.
2. Metilacija promotorskog regiona gena *RASSF1A* i *p16INK4a* je detektovana kod trećine ispitanika sa hroničnom infekcijom HCV-om, što sugerise da je metilacija ovih gena važna, ali potencijalno nije ključna za progresiju bolesti.
3. Nije detektovana statistički značajna asocijacija metilacije gena *RASSF1A* i *p16INK4a* i ispitivanih kliničko-patoloških parametara kod ispitanika sa hroničnom infekcijom HCV-om, osim u slučaju metilacionog statusa gena *RASSF1A*, kod koga je utvrđena statistički značajna asocijacija metilacije promotora gena *RASSF1A* i veće koncentracije ukupne HCV RNK ($\geq 400\ 000$ IU/ml).
4. Utvrđeno je da se metilacija promotora gena *RASSF1A* statistički značajno češće javlja kod ispitanika sa genotipom CC gena *IL28B*, nego kod preostala dva genotipa *IL28B*.
5. Najčešće detektovane amino-kiselinske izmene u proteinu C virusa su bile izmene na pozicijama 70, 75, 91 i 110. Na poziciji 70 najčešća je bila zamena arginina u glutamin (R70Q), dok je na poziciji 75 bila zamena treonina u alanin (T75A), na poziciji 91 zamena metionina u cistein (M91C), a na poziciji 110 zamena treonina u serin (T110S).
6. Nije pronađena asocijacija amino-kiselinskih izmena proteina C na pozicijama 70, 75, 91 i 110 sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa hroničnom infekcijom HCV genotipa 1b, kao ni sa genotipom gena *IL28B*.
7. Utvrđena je asocijacija između amino-kiselinske izmene R70Q i nemetilovanog gena *RASSF1A*.
8. Pojedinačno gledano ispitivani metilacioni status gena *RASSF1A* i *p16INK4a* nije značajan biomarker odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV i progresiju bolesti, međutim, kombinovana analiza metilacionog statusa ovih gena sa genotipom gena *IL28B* je pokazala da je istovremena metilacija gena *RASSF1A*, odnosno *p16INK4a* i genotipa CC gena *IL28B* statistički značajno povezana sa postizanjem SVO.
9. Nije detektovana asocijacija pojedinačnih amino-kiselinskih izmena proteina C HCV-a sa odgovorom na terapiju, kao ni sa progresijom bolesti.
10. Istovremeno prisustvo amino-kiselinske izmene na poziciji 75 proteina C i genotipova CT/TT gena *IL28B* je statistički značajno povezano sa izostankom odgovora na terapiju PEG-IFN/RBV.
11. Istovremeno prisustvo amino-kiselinske izmene na poziciji 91 proteina C i genotipa CC gena *IL28B* je statistički značajno povezano sa postizanjem SVO.
12. Istovremena analiza metilacionog statusa gena *RASSF1A* i *p16INK4a*, amino-kiselinske promene proteina C HCV-a i polimorfizma rs12979860 gena *IL28B* može biti potencijalni biomarker odgovora na kombinovanu terapiju i progresiju bolesti kod obolelih sa hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C genotipa 1b.

7. LITERATURA

- Aapola U, Shibuya K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, Shintani A, Kawasaki K, Minoshima S, Krohn K, Antonarakis SE. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22. 3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*. 2000;65(3):293-8.
- Afdhal N, Reddy KR, Nelson DR, Lawitz E, Gordon SC, Schiff E, Nahass R, Ghalib R, Gitlin N, Herring R, Lalezari J. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(16):1483-93.
- Ahmed-Choudhury J, Agathangelou A, Fenton SL, Ricketts C, Clark GJ, Maher ER, Latif F. Transcriptional regulation of cyclin A2 by RASSF1A through the enhanced binding of p120E4F to the cyclin A2 promoter. *Cancer research*. 2005;65(7):2690-7.
- Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Kobayashi M, Fujiyama S, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Arase Y. Complex association of virus-and host-related factors with hepatocellular carcinoma rate following hepatitis C virus clearance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019;57(1):e01463-18.
- Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Watahiki S, Sato J, Matsuda M. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology*. 2005;48(6):372-80.
- Alberti A. What are the comorbidities influencing the management of patients and the response to therapy in chronic hepatitis C?. *Liver International*. 2009;29:15-8.
- Alestig E, Arnholm B, Eilard A, Lagging M, Nilsson S, Norkrans G, Wahlberg T, Wejstål R, Westin J, Lindh M. Core mutations, IL28B polymorphisms and response to peginterferon/ribavirin treatment in Swedish patients with hepatitis C virus genotype 1 infection. *BMC Infectious Diseases*. 2011;11:1-7.
- Al-Khalaf HH, Mohideen P, Nallar SC, Kalvakolanu DV, Aboussekhra A. The cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a physically interacts with transcription factor Sp1 and cyclin-dependent kinase 4 to transactivate microRNA-141 and microRNA-146b-5p spontaneously and in response to ultraviolet light-induced DNA damage. *J Biol Chem*. 2013;288(35511–35525).
- Alkhatib M, Di Maio VC, De Murtas V, Polilli E, Milana M, Teti E, Fiorentino G, Calvaruso V, Barbaliscia S, Bertoli A, Scutari R. Genetic Determinants in a Critical Domain of NS5A Correlate with Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients Infected with HCV Genotype 1b. *Viruses*. 2021;13(5):743.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990;215(3):403-10.
- Alves Pedrosa ML, Boldt AB, Pereira-Ferrari L, Steffensen R, Strauss E, Jensenius JC, Ioshii SO, Messias-Reason I. Mannan-binding lectin MBL2 gene polymorphism in chronic hepatitis C: association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. *Clinical & Experimental Immunology*. 2008;152(2):258-64.

Anwar MI, Li N, Zhou Q, Chen M, Hu C, Wu T, Chen H, Li YP, Zhou Y. PPP2R5D promotes hepatitis C virus infection by binding to viral NS5B and enhancing viral RNA replication. *Virology Journal*. 2022;19(1):1-2.

Araujo OC, Barros JJ, do O KM, Nabuco LC, Luz CA, Perez RM, Niel C, Villela-Nogueira CA, Araujo NM. Genetic variability of hepatitis B and C viruses in Brazilian patients with and without hepatocellular carcinoma. *Journal of Medical Virology*. 2014;86(2):217-23.

Araujo OC, Rosa AS, Fernandes A, Niel C, Villela-Nogueira CA, Pannain V, Araujo NM. RASSF1A and DOK1 promoter methylation levels in hepatocellular carcinoma, cirrhotic and non-cirrhotic liver, and correlation with liver cancer in Brazilian patients. *PloS one*. 2016;11(4):e0153796.

Arora P, Kim EO, Jung JK, Jang KL. Hepatitis C virus core protein downregulates E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1 and 3b. *Cancer letters*. 2008;261(2):244-52.

Ausubel FM. In: Wiley J and sons, editors. *Current Protocols in Molecular Biology* (New York). 1987;211-223.

Babić JS, Bojović K, Fabri M, Cvejić T, Svorcan P, Nožić D, Jovanović M, Škrbić R, Stojiljković MP, Mijailović Ž. Real-Life Data on the Efficacy and Safety of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir+ Dasabuvir+Ribavirin in the Patients with Genotype 1 Chronic Hepatitis C Virus Infection in Serbia. *Vojnosanitetski pregled*. 2019;76(5):531-6.

Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1865-76.

Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Hérault Y, Guillou F, Bourc'his D. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*. 2016;354(6314):909-12.

Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 2004;63:71-180.

Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2009;51:810-820.

Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24:289-293.

Belachew B, Gao J, Byrd AK, Raney KD. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 unfolds viral G-quadruplex RNA structures. *Journal of Biological Chemistry*. 2022;298(11).

Bennecke M, Kriegl L, Bajbouj M, Retzlaff K, Robine S, Jung A, Arkan MC, Kirchner T, Greten FR. Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer cell*. 2010;18(2):135-46.

Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T, Buggisch P, Goeser T, Rasenack J, Pape GR, Schmidt WE, Kallinowski B, Klinker H, Spengler U, Martus P, Alshuth U, Zeuzem S. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology*. 2006;130:1086-97.

Bernard BJ, Nigam N, Burkitt K, Saloura V. SMYD3: a regulator of epigenetic and signaling pathways in cancer. *Clinical Epigenetics*. 2021;13:1-9.

- Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic acids research*. 1980;8(7):1499-504.
- Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974.
- Bojovic K, Simonovic-Babic J, Mijailovic Z, Milosevic I, Jovanovic M, Ruzic M, Pasic TC, Svorcan P, Petrovic M, Jordovic J. Micro-elimination of HCV as a possible therapeutic strategy: our experience and a review of literature. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2020;14(02):117-24.
- Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, Subramanian MG, McHutchison JG, Mo H, Svarovskaia E, Shafran SD. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *The Journal of infectious diseases*. 2018;218(11):1722-9.
- Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scan J Clin Lab Invest*. 1968;21:77, suppl. 97.
- Braconi C, Huang N, Patel T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology*. 2010;51(3):881-90.
- Brass V, Bieck E, Montserret R, Wölk B, Hellings JA, Blum HE, Penin F, Moradpour D. An amino-terminal amphipathic α -helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(10):8130-9.
- Bruix J, Sherman M; American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-2.
- Buj R, Aird KM. p16: cycling off the beaten path. *Molecular & cellular oncology*. 2019;6(6):e1677140.
- Campos LB, de Almeida NA, de Santana CG, Barbosa EN, Horta MA, Amendola Pires M, Brandão Mello CE, de Paula VS, de Barros JJ. Before Direct-Acting Antivirals for Hepatitis C Virus: Evaluation of Core Protein R70Q and L/C91M Substitutions in Chronically Infected Brazilian Patients Unresponsive to IFN and/or RBV. *Viruses*. 2023;15(1):187.1.
- Cha S, Park I, Jang KL. Hepatitis C virus core protein activates proteasomal activator 28 gamma to downregulate p16 levels via ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Heliyon*. 2021;7(1).
- Chen C, Pan D, Deng AM, Huang F, Sun BL, Yang RG. DNA methyltransferases 1 and 3B are required for hepatitis C virus infection in cell culture. *Virology*. 2013;441(1):57-65.
- Chen PJ, Lin MH, Tai KF, Liu PC, Lin CJ, Chen DS. The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA. *Virology*. 1992;188(1):102-13.
- Chen S, Harris M. NS5A domain I antagonises PKR to facilitate the assembly of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens*. 2023;19(2):e1010812.
- Chi X, Wang S, Huang Y, Stamnes M, Chen JL. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(4):7089-108.

Choi BY, Choi HS, Ko K, Cho -Y-Y, Zhu F, Kang BS, Ermakova SP, Ma W-Y, Bode AM, Dong Z. The tumor suppressor p16(INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2005a;12(699–707).

Choi JD, Underkoffler LA, Wood AJ, Collins JN, Williams PT, Golden JA, Schuster Jr EF, Loomes KM, Oakey RJ. A novel variant of Inpp5f is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal CpG island. *Molecular and cellular biology*. 2005b;25(13):5514-22.

Cummins N, Badley A. The TRAIL to viral pathogenesis: the good, the bad and the ugly. *Current molecular medicine*. 2009;9(4):495-505.

Cuypers L, Li G, Libin P, Piampongsant S, Vandamme A-M, Theys K. Genetic diversity and selective pressure in hepatitis C virus genotypes 1—6: significance for direct-acting antiviral treatment and drug resistance. *Viruses* 2015;7:5018—39.

Dahlet T, Argüeso Lleida A, Al Adhami H, Dumas M, Bender A, Ngondo RP, Tanguy M, Vallet J, Auclair G, Bardet AF, Weber M. Genome-wide analysis in the mouse embryo reveals the importance of DNA methylation for transcription integrity. *Nature communications*. 2020;11(1):3153.

Dallol A, Cooper WN, Al-Mulla F, Agathangelou A, Maher ER, Latif F. Depletion of the Ras Association Domain Family 1, Isoform A—Associated Novel Microtubule-Associated Protein, C19ORF5/MAP1S, Causes Mitotic Abnormalities. *Cancer research*. 2007;67(2):492-500.

Dash S, Aydin Y, Widmer KE, Nayak L. Hepatocellular carcinoma mechanisms associated with chronic HCV infection and the impact of direct-acting antiviral treatment. *Journal of hepatocellular carcinoma*. 2020 Apr 15:45-76.

Daw MA, El-Bouzedi AA, Ahmed MO, Dau AA, Agnan MM, Drah AM. Geographic integration of hepatitis C virus: a global threat. *World journal of virology*. 2016;5(4):170.

de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*. 2020;8:e180-e90.

Dehghani B, Hashempour T, Hasanshahi Z, Moayedi J. Bioinformatics analysis of domain 1 of HCV-core protein: Iran. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2020;26(1):303-20.

Deng L, Yin Y, Xu Z, Li F, Zhao J, Deng H, Jian Z, Lai S, Sun X, Zhu L. Antiviral Activity of Porcine IFN- λ 3 and IFN- α against Porcine Rotavirus In Vitro. *Molecules*. 2022;27(14):4575.

Deng Q, Liao R, Wu BL, Sun P. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(2):1050-9.

Devi P, Ota S, Punga T, Bergqvist A. Hepatitis C Virus Core Protein Down-Regulates Expression of Src-Homology 2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase by Modulating Promoter DNA Methylation. *Viruses*. 2021;13(12):2514.

Domovitz T, Gal-Tanamy M. Tracking down the epigenetic footprint of HCV-induced hepatocarcinogenesis. *Journal of clinical medicine*. 2021;10(3):551.

- Dong X, Hou Q, Chen Y, Wang X. Diagnostic value of the methylation of multiple gene promoters in serum in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Disease Markers*. 2017;2017(1):2929381.
- Donlin MJ, Cannon NA, Yao E, Li J, Wahed A, Taylor MW, Belle SH, Di Bisceglie AM, Aurora R, Tavis JE. Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy. *Journal of virology*. 2007;81(15):8211-24.
- Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of cell science*. 2007;120(18):3163-72.
- Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *The Lancet*. 2018;392(10149):777-86.
- D'souza S, Lau KC, Coffin CS, Patel TR. Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*. 2020;26(38):5759.
- Dubois F, Bergot E, Zalcmann G, Levallet G. RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis-an updated review. *Cell Death Dis*. 2019;10: 928.
- Einav S, Sklan EH, Moon HM, Gehrig E, Liu P, Hao Y, Lowe AW, Glenn JS. The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology*. 2008;47(3):827-35.
- El Kassas M, Funk AL, Salaheldin M, Shimakawa Y, Eltabbakh M, Jean K, El Tahan A, Sweedy AT, Afify S, Youssef NF, Esmat G. Increased recurrence rates of hepatocellular carcinoma after DAA therapy in a hepatitis C-infected Egyptian cohort: a comparative analysis. *Journal of viral hepatitis*. 2018;25(6):623-30.
- El-Bendary M, Neamatallah M, Elalfy H, Besheer T, El-Setouhy M, Youssef MM, Zein M, Elhammady D, Hegazy A, Esmat G. Association of genetic polymorphisms of chemokines and their receptors with clearance or persistence of hepatitis C virus infection. *British journal of biomedical science*. 2019;76(1):11-6.
- El-Bendary M, Neamatallah M, Elalfy H, Besheer T, Elkholi A, El-Diasty M, Elsareef M, Zahran M, El-Aarag B, Gomaa A, Elhammady D. The association of single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 3, Toll-like receptor 7 and Toll-like receptor 8 genes with the susceptibility to HCV infection. *British Journal of Biomedical Science*. 2018;75(4):175-81.
- El-Sabakawy K, Assaf R, Arafa L, Shiha O, El-Beeh S. Evaluation of hypermethylation of ras association domain family-1a and glutathione s-transferase protein-1 genes as diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *ZUMJ*. 2015;21:1-13.
- Elsewify WA, Hassan EA, Mekky MA, Abd El-Rehim AS, Sayed ZE, Abdel Malek MO, ElMelegy TT, Sabry A. Usefulness of circulating methylated p16 as a noninvasive molecular biomarker for hepatitis C-related hepatocellular carcinoma with normal serum alpha-fetoprotein levels. *International Journal of General Medicine*. 2020:147-55.
- El-shaarawy F, Abo ElAzm MM, Mohamed RH, Radwan MI, Abo-Elmatty DM, Mehanna ET. Relation of the methylation state of RUNX3 and p16 gene promoters with hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2022;23(1):48.
- El-Shamy A, Hotta H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: an overview. *World J Gastroenterol* 2014;20:7555-7569.

- El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus non-structural protein 5A and core protein and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Intervirology*. 2012;55(1):1-1.
- Eng FJ, Walewski JL, Klepper AL, Fishman SL, Desai SM, McMullan LK, Evans MJ, Rice CM, Branch AD. Internal initiation stimulates production of p8 minicore, a member of a newly discovered family of hepatitis C virus core protein isoforms. *J Virol* 2009;83:3104-3114.
- Fedorchenko SV, Klimenko A, Martynovich T, Liashok O, Yanchenko V. IL-28B genetic variation, gender, age, jaundice, hepatitis C virus genotype, and hepatitis B virus and HIV co-infection in spontaneous clearance of hepatitis C virus. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2019;30(5):436.
- Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, Klocker H, Goebel G, Widschwendter M. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res*. 2005;65:1141-1145.
- Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(1):169-81.
- Forbes SA, Tang G, Bindal N, Bamford S, Dawson E, Cole C, Kok CY, Jia M, Ewing R, Menzies A, Teague JW. COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic acids research*. 2010;38(suppl_1):D652-7.
- Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Ikeda M, Lemon SM, Gale M. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300:1145-1148.
- Franck N, Le Seyec J, Guguen-Guillouzo C, Erdtmann L. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol* 2005;79:2700-2708.
- Fried MW, Hadziyannis SJ. Treatment of chronic hepatitis C infection with peginterferons plus ribavirin. *Semin Liver Dis*. 2004;2:47-54.
- Fu S, Debes JD, Boonstra A. DNA methylation markers in the detection of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer*. 2023:112960.
- Fukuhara T, Takeishi K, Toshima T, Morita K, Ueda S, Iguchi T, Nagata S, Sugimachi K, Ikegami T, Gion T, Soejima Y. Impact of amino acid substitutions in the core region of HCV on multistep hepatocarcinogenesis. *Hepatology Research*. 2010;40(2):171-8.
- Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Mishima K, Ueyama M, Onozuka I, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* 2011;85:5986-5994.
- Fung J, Lai CL, Hung I, Young J, Cheng C, Wong D, Yuen MF. Chronic hepatitis C virus genotype 6 infection: response to pegylated interferon and ribavirin. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(6):808-12.

- Gad HH, Dellgren C, Hamming OJ, Vends S, Paludan SR, Hartmann R. Interferon- λ is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(31):20869-75.
- Ganesan A, Arimondo PB, Rots MG, Jeronimo C, Berdasco M. The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. *Clin Epigenetics*. 2019;11:174.
- García-Gutiérrez L, McKenna S, Kolch W, Matallanas D. RASSF1A tumour suppressor: Target the network for effective cancer therapy. *Cancers*. 2020;12(1):229.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*. 1987;196(2):261-82.
- Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, Chisari FV. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *Journal of virology*. 2010;84(21):10999-1009.
- Gawlik K, Gallay PA. HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. *Immunologic research*. 2014;60:1-0.
- Genno PA, Gaidatzis D, Feldmann A, Hoerner L, Imanci D, Burger L, Zilbermann F, Peters AH, Edenhofer F, Smallwood SA, Krebs AR. A genome-scale map of DNA methylation turnover identifies site-specific dependencies of DNMT and TET activity. *Nature communications*. 2020;11(1):2680.
- Glaser JA. Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios. *Biotechniques*. 1995;18:62-63.
- Grandhe S, Frenette CT. Occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma after successful direct-acting antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology & hepatology*. 2017;13(7):421.
- Grawenda AM, O'Neill E. Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. *British journal of cancer*. 2015;113(3):372-81.
- Guo N, Chen R, Li Z, Liu Y, Cheng D, Zhou Q, Zhou J, Lin Q. Hepatitis C virus core upregulates the methylation status of the RASSF1A promoter through regulation of SMYD3 in hilar cholangiocarcinoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011;43(5):354-61.
- Haggerty C, Kretzmer H, Riemenschneider C, Kumar AS, Mattei AL, Bailly N, Gottfreund J, Giesselmann P, Weigert R, Brändl B, Giehr P. Dnmt1 has de novo activity targeted to transposable elements. *Nature structural & molecular biology*. 2021;28(7):594-603.
- Hamano K, Sakamoto N, Enomoto N, Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Ueda E, Tanabe Y, Maekawa S, Itakura J, Watanabe H. Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2005;20(9):1401-9.
- Hamdane N, Jühling F, Crouchet E, El Saghire H, Thumann C, Oudot MA, Bandiera S, Saviano A, Ponsolles C, Roca Suarez AA, Li S, Fujiwara N, Ono A, Davidson I, Bardeesy N, Schmidl C, Bock C, Schuster C, Lupberger J, Habersetzer F, Doffoël M, Piardi T, Sommacale D, Imamura M, Uchida T, Ohdan H, Aikata H, Chayama K, Boldanova T, Pessaux P, Fuchs BC, Hoshida Y, Zeisel MB, Duong FHT, Baumert TF. HCV-Induced Epigenetic Changes Associated with Liver Cancer Risk Persist After Sustained Virologic Response. *Gastroenterology*. 2019;156:2313-29.

- Hashempour T, Dehghani B, Musavi Z, Moayedi J, Hasanshahi Z, Sarvari J, Hosseini SY, Hosseini E, Moeini M, Merat S. Impact of IL28 genotypes and modeling the interactions of HCV core protein on treatment of hepatitis C. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. 2020;12(4):424-37.
- Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T. Association of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. *Liver international*. 2011;31(9):1359-65.
- Hayes CN, Imamura M, Tanaka J, Chayama K. Road to elimination of HCV: Clinical challenges in HCV management. *Liver international*. 2022;42(9):1935-44.
- Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal*. 2008;27(24):3300-10.
- Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21:15–21.
- Herceg Z, Paliwal A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res*. 2011;727(3):55–61.
- Heredia-Torres TG, Rincón-Sánchez AR, Lozano-Sepúlveda SA, Galan-Huerta K, Arellanos-Soto D, García-Hernández M, Garza-Juarez AD, Rivas-Estilla AM. Unraveling the molecular mechanisms involved in HCV-induced carcinogenesis. *Viruses*. 2022;14(12):2762.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9821-9826.
- Hickman IJ, Powell EE, Prins JB, Clouston AD, Ash S, Purdie DM, Jonsson JR. In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: implications for therapy. *Journal of hepatology*. 2003;39(6):1042-8.
- Hiort O, Wodtke A, Struve D, Zollner A, Sinnecker GH. Detection of point mutations in the androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mol Genet*. 1994;3:1163-1166.
- Horowitz JM, Venkatesh SK, Ehman RL, Jhaveri K, Kamath P, Ohliger MA, Samir AE, Silva AC, Taouli B, Torbenson MS, Wells ML. Evaluation of hepatic fibrosis: a review from the society of abdominal radiology disease focus panel. *Abdominal Radiology*. 2017;42:2037-53.
- Hoshida Y, Fuchs BC, Bardeesy N, Baumert TF, Chung RT. Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2014;61:S79-S90.
- Hou J, van Oord G, Groothuisink ZM, Claassen MA, Kreeft K, Zaaraoui-Boutahar F, van IJcken WF, Osterhaus AD, Janssen HL, Andeweg AC, de Knegt RJ. Gene expression profiling to predict and assess the consequences of therapy-induced virus eradication in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of virology*. 2014;88(21):12254-64.
- Huang TC, Fischer WB. Sequence–function correlation of the transmembrane domains in NS4B of HCV using a computational approach. *Aims Biophysics*. 2021;8(2):165-81.

Huang Y, Wei L, Zhao RC, Liang WB, Zhang J, Ding XQ, Li ZL, Sun CJ, Li B, Liu QY, He JY, Yu XQ, Gao B, Chen MM, Sun AM, Qin Y. Predicting hepatocellular carcinoma development for cirrhosis patients via methylation detection of heparocarcinogenesis-related genes. *J Cancer*. 2018;9:2203-10.

Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, Tong X, Tang G, Howell CD, Rosen HR, Thio CL. A functional SNP of interferon- γ gene is important for interferon- α -induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(3):985-90.

Huang ZH, Hu Y, Hua D, Wu YY, Song MX, Cheng ZH. Quantitative analysis of multiple methylated genes in plasma for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2011;91(3):702-7.

Hwang E, Ryu KS, Pääkkönen K, Güntert P, Cheong HK, Lim DS, Lee JO, Jeon YH, Cheong C. Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(22):9236-41.

Ioannou GN, Green PK, Berry K. HCV eradication induced by direct-acting antiviral agents reduces the risk of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 2018a;68(1):25-32.

Ioannou GN, Green PK, Beste LA, Mun EJ, Kerr KF, Berry K. Development of models estimating the risk of hepatocellular carcinoma after antiviral treatment for hepatitis C. *Journal of hepatology*. 2018b;69(5):1088-98.

Isken O, Pham MT, Schwanke H, Schlotthauer F, Bartenschlager R, Tautz N. Characterization of a multipurpose NS3 surface patch coordinating HCV replicase assembly and virion morphogenesis. *PLoS Pathogens*. 2022b;18(10):e1010895.

Isken O, Walther T, Wong-Dilworth L, Rehders D, Redecke L, Tautz N. Identification of NS2 determinants stimulating intrinsic HCV NS2 protease activity. *PLoS Pathogens*. 2022a;18(6):e1010644.

Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*. 2004;5:1-0.

Ito T, Teo YV, Evans SA, Neretti N, Sedivy JM. Regulation of cellular senescence by polycomb chromatin modifiers through distinct DNA damage-and histone methylation-dependent pathways. *Cell reports*. 2018;22(13):3480-92.

Ivashkina N, Wölk B, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Penin F, Moradpour D. The hepatitis C virus RNA- dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* 2002;76:13088-13093.

Jang KL. Hepatitis B Virus X Protein and Hepatitis C Virus Core Protein Cooperate to Inhibit P16 Expression Via DNA Methylation. *Japanese Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2020;5(8):1-7.

Janjua NZ, Wong S, Darvishian M, Butt ZA, Yu A, Binka M, Alvarez M, Woods R, Yoshida EM, Ramji A, Feld J. The impact of SVR from direct-acting antiviral-and interferon-based treatments for HCV on hepatocellular carcinoma risk. *Journal of viral hepatitis*. 2020;27(8):781-93.

- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*. 2007;449(7159):248-51.
- Jiang P, Chan CW, Chan KA, Cheng SH, Wong J, Wong VW, Wong GL, Chan SL, Mok TS, Chan HL, Lai PB. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(11):E1317-25.
- Jiménez-Sousa MA, Fernández-Rodríguez A, Guzmán-Fulgencio M, García-Álvarez M, Resino S. Meta-analysis: implications of interleukin-28B polymorphisms in spontaneous and treatment-related clearance for patients with hepatitis C. *BMC medicine*. 2013;11:1-8.
- Johnson P, Zhou Q, Dao DY, Lo YD. Circulating biomarkers in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2022;19(10):670-81.
- Jovanovic-Cupic S, Glisic S, Stanojevic M, Nozic D, Petrovic N, Mandusic V, Krajinovic M. The influence of host factors and sequence variability of the p7 region on the response to pegylated interferon/ribavirin therapy for chronic hepatitis C genotype 1b in patients from Serbia. *Archives of virology*. 2016;161:1189-98.
- Jovanovic-Cupic S, Petrovic N, Krajinovic M, Bundalo M, Kokanov N, Bozovic A, Stamenkovic G. Role of host and viral factors and genetic variation of IL28B on therapy outcome in patients with chronic hepatitis C genotype 1b from Serbia. *Genetics & Applications*. 2019;3:36-41.
- Kaneto H, Sasaki S, Yamamoto H, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Ozeki I, Iwata N, Ohmura T, Satoh T, Karino Y, Satoh T, Toyota J, Satoh M, Endo T, Omata M, Imai K. Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut*. 2001;48:372-7.
- Kanwal F, Kramer JR, Asch SM, Cao Y, Li L, El-Serag HB. Long-term risk of hepatocellular carcinoma in HCV patients treated with direct acting antiviral agents. *Hepatology*. 2020;71(1):44-55.
- Kanwal S, Mahmood T. Occurrence of genetic modifications in core, 5' UTR and NS5b of HCV associated with viral response to treatment. *Virology journal*. 2014;11:1-20.
- Kaplun D, Starshin A, Sharko F, Gainova K, Filonova G, Zhigalova N, Mazur A, Prokhortchouk E, Zhenilo S. Kaiso regulates DNA methylation homeostasis. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(14):7587.
- Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Mori S, Hijikata M, Shimotohno K. Distribution of plural HCV types in Japan. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;181(1):279-85.
- Katsuno Y, Meyer DS, Zhang Z, Shokat KM, Akhurst RJ, Miyazono K, Derynck R. Chronic TGF- β exposure drives stabilized EMT, tumor stemness, and cancer drug resistance with vulnerability to bitopic mTOR inhibition. *Science signaling*. 2019;12(570):eaau8544.
- Keikha M, Eslami M, Yousefi B, Ali-Hassanzadeh M, Kamali A, Yousefi M, Karbalaeei M. HCV genotypes and their determinative role in hepatitis C treatment. *Virusdisease*. 2020;31:235-40.

Keller M, Dubois F, Teulier S, Martin AP, Levallet J, Maille E, Brosseau S, Elie N, Hergovich A, Bergot E, Camonis J. NDR2 kinase contributes to cell invasion and cytokinesis defects induced by the inactivation of RASSF1A tumor-suppressor gene in lung cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019;38:1-6.

Khan A, Nawaz M, Ullah S, Rehman IU, Khan A, Saleem S, Zaman N, Shinwari ZK, Ali M, Wei DQ. Core amino acid substitutions in HCV-3a isolates from Pakistan and opportunities for multi-epitopic vaccines. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2022;40(8):3753-68.

Kim SU, Song KJ, Chang HY, Shin EC, Park JY, Kim DY, Han KH, Chon CY, Ahn SH. Association between IL28B polymorphisms and spontaneous clearance of hepatitis B virus infection. *PloS one*. 2013;8(7):e69166.

Kitson MT, George J, Dore GJ, Leung R, Button P, McCaughan GW, Crawford DH, Sievert W, Weltman MD, Cheng WS, Roberts SK. Interleukin-28 B rs12979860 C allele: Protective against advanced fibrosis in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014;29(7):1458-62.

Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Hosaka T, Sezaki H, Kobayashi M, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Watahiki S, Mineta R. Influence of amino-acid polymorphism in the core protein on progression of liver disease in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *Journal of medical virology*. 2010;82(1):41-8.

Kohara M, Tanaka T, Tsukiyama-Kohara K, Tanaka S, Mizokami M, Lau JY, Hattori N. Hepatitis C virus genotypes 1 and 2 respond to interferon- α with different virologic kinetics. *The Journal of infectious diseases*. 1995:934-8.

Kohlway A, Pirakitikulr N, Barrera FN, Potapova O, Engelman DM, Pyle AM, Lindenbach BD. Hepatitis C virus RNA replication and virus particle assembly require specific dimerization of the NS4A protein transmembrane domain. *Journal of virology*. 2014;88(1):628-42.

Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of virology*. 1996;70(6):3363-71.

Korba B, Shetty K, Medvedev A, Viswanathan P, Varghese R, Zhou B, Roy R, Makambi K, Resson H, Loffredo CA. Hepatitis C virus Genotype 1a core gene nucleotide patterns associated with hepatocellular carcinoma risk. *Journal of General Virology*. 2015;96(9):2928-37.

Kotake Y, Naemura M, Murasaki C, Inoue Y, Okamoto H. Transcriptional regulation of the p16 tumor suppressor gene. *Anticancer research*. 2015;35(8):4397-401.

Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2019;156(2):477-91.

Kumar A, Rajput M, Paliwal D, Yadav A, Chhabra R, Singh S. Genotyping & diagnostic methods for hepatitis C virus: A need of low-resource countries. *Indian J Med Res* 2018;147:445.

Kumthip K, Maneekarn N. The role of HCV proteins on treatment outcomes. *Virology journal*. 2015;12:1-2.

- Kwak J, Choi JH, Jang KL. Hepatitis C virus Core overcomes all-trans retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma cells by inhibiting p14 expression via DNA methylation. *Oncotarget*. 2017;8(49):85584.
- Lashgarian HE, Valibeik A, Marzban A, Karkhane M, Shahzamani K. The Relationship Between HCV-NS5A Gene Mutations and Resistance to Combination Therapy in Patients with HCV-Genotype 1-B. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*. 2021;10(2):233.
- Lee HR, Lee GY, You DG, Kim HK, Yoo YD. Hepatitis C virus p7 induces membrane permeabilization by interacting with phosphatidylserine. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(3):897.
- Lee MG, Jeong SI, Ko KP, Park SK, Ryu BK, Kim IY, Kim JK, Chi SG. RASSF1A directly antagonizes RhoA activity through the assembly of a Smurf1-mediated destruction complex to suppress tumorigenesis. *Cancer Research*. 2016;76(7):1847-59.
- Lee MH, Darehshouri A, Anderson KL, Page C, Lidke DS, Volkmann N, Hanein D, Wilson BS. Tumor suppressor p16 (INK4a) inhibits cancer cell growth by downregulating eEF1A2 through a direct interaction. *J Cell Sci*. 2013;126(1744–1752)
- Leon KE, Tangudu NK, Aird KM, Buj R. Loss of p16: a bouncer of the immunological surveillance?. *Life*. 2021;11(4):309.
- Li Z, Zhang H, Yang J, Hao T, Li S. Promoter hypermethylation of DNA damage response genes in hepatocellular carcinoma. *Cell biology international*. 2012;36(5):427-32.
- Lim JS, Park SH, Jang KL. Hepatitis C virus Core protein overcomes stress-induced premature senescence by down-regulating p16 expression via DNA methylation. *Cancer letters*. 2012;321(2):154-61.
- Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005;436:933-938.
- Liu K, Xu C, Lei M, Yang A, Loppnau P, Hughes TR, Min J. Structural basis for the ability of MBD domains to bind methyl-CG and TG sites in DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(19):7344-54.
- Liu L, Vo A, McKeenan WL. Specificity of the methylation-suppressed A isoform of candidate tumor suppressor RASSF1 for microtubule hyperstabilization is determined by cell death inducer C19ORF5. *Cancer research*. 2005;65(5):1830-8.
- Liu ZJ, Huang Y, Wei L, He JY, Liu QY, Yu XQ, Li ZL, Zhang J, Li B, Sun CJ, Liang WB. Combination of LINE-1 hypomethylation and RASSF1A promoter hypermethylation in serum DNA is a non-invasion prognostic biomarker for early recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Neoplasma*. 2017;64(5):795-802.
- Locke WJ, Guanzon D, Ma C, Liew YJ, Duesing KR, Fung KY, Ross JP. DNA methylation cancer biomarkers: translation to the clinic. *Frontiers in genetics*. 2019;10:1150.
- Lohmann V, Bartenschlager R. Indelibly stamped by hepatitis C virus infection: persistent epigenetic signatures increasing liver cancer risk. *Gastroenterology*. 2019;156(8):2130-3.
- Loua A, Nikiema JB, Sougou A, Kasilo OJM. Transfusion in the WHO african region. *Transfus Clin Biol* 2019;26(3):155—9.

Lu H, Han M, Yuan X, Tursun K, Zhang Y, Li Y, Li Z, Feng S, Zhou L, Pan Z, Wang Q, Han K, Liu S, Cheng J. Role of IL-6-mediated expression of NS5ATP9 in autophagy of liver cancer cells. *J Cell Physiol.* 2018;233:9312-9.

Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers HA, Groothuis GM, Olinga P, Boersema M. Targeting oxidative stress for the treatment of liver fibrosis. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 175. 2018:71-102.

Macek Jilkova Z, Saleem K, Afzal S, Decaens T. Predictive Factors for Hepatocellular Carcinoma Development after Direct-Acting Antiviral Treatment of HCV. *Livers.* 2021;1(4):313-21.

Mahmoudvand S, Shokri S, Taherkhani R, Farshadpour F. Hepatitis C virus core protein modulates several signaling pathways involved in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology.* 2019;25(1):42.

Mani H, Yen JH, Hsu HJ, Chang CC, Liou JW. Hepatitis C virus core protein: Not just a nucleocapsid building block, but an immunity and inflammation modulator. *Tzu-Chi Medical Journal.* 2022;34(2):139.

Mann J, Reeves HL, Feldstein AE. Liquid biopsy for liver diseases. *Gut.* 2018;67:2204-2212.

Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* 2006;55(9):1350-9.

Manohar K, Suneetha PV, Sukriti, Pati NT, Gupta AC, Hissar S, Sakhuja P, Sarin SK. Association of IL-18 promoter polymorphism with liver disease severity in HCV-infected patients. *Hepatology international.* 2009;3:371-7.

Martinez MA, Franco S. Therapy implications of hepatitis C virus genetic diversity. *Viruses.* 2020;13(1):41.

Matallanas D, Romano D, Al-Mulla F, O'Neill E, Al-Ali W, Crespo P, Doyle B, Nixon C, Sansom O, Drosten M, Barbacid M. Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras. *Molecular cell.* 2011;44(6):893-906.

Matallanas D, Romano D, Yee K, Meissl K, Kucerova L, Piazzolla D, Baccarini M, Vass JK, Kolch W, O'Neill E. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Molecular cell.* 2007;27(6):962-75.

Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends in Genetics.* 2022;38(7):676-707.

Matthaei A, Joecks S, Frauenstein A, Bruening J, Bankwitz D, Friesland M, Gerold G, Vieyres G, Kaderali L, Meissner F, Pietschmann T. Landscape of protein-protein interactions during hepatitis C virus assembly and release. *Microbiology Spectrum.* 2024;12(2):e02562-22.

McGivern DR, Lemon SM. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene* 2011;30:1969-1983.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015;61(1):77-87.

Mihm U, Grigorian N, Welsch C, Herrmann E, Kronenberger B, Teuber G, von Wagner M, Hofmann WP, Albrecht M, Lengauer T, Zeuzem S. Amino acid variations in hepatitis C virus p7 and sensitivity to antiviral combination therapy with amantadine in chronic hepatitis C. *Antiviral therapy*. 2006;11(4):507-19.

Mikeska T, Craig JM. DNA methylation biomarkers: Cancer and beyond. *Genes (Basel)*. 2014;5(3):821–64.

Milosevic I, Todorovic N, Filipovic A, Simic J, Markovic M, Stevanovic O, Malinic J, Katanic N, Mitrovic N, Nikolic N. HCV and HCC Tango—Deciphering the Intricate Dance of Disease: A Review Article. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(22):16048.

Minosse C, Gruber CE, Rueca M, Taibi C, Zaccarelli M, Grilli E, Montalbano M, Capobianchi MR, Antinori A, D’Offizi G, McPhee F. Late relapse and reinfection in HCV patients treated with direct-acting antiviral (DAA) drugs. *Viruses*. 2021;13(6):1151.

Miri HH, Fazeli P, Ali-Hassanzadeh M, Bemani P, Kabelitz D, Kalantar K. Correlation between IL-28 polymorphism and spontaneous clearance in HCV patients: systematic review and meta-analysis. *Archives of Virology*. 2021;166(9):2469-78.

Mitrovic N, Delic D, Denic LM, Nikolic N, Bojovic K, Babic JS, Brmbolic B, Milosevic I, Katanic N, Barac A. The prevalence and the risk factors for hepatitis C virus infection in Serbia. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2018;12(03):171-7.

Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology international*. 2012;6:386-96.

Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M. Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression. *Journal of virology*. 2013;87(23):12541-51.

Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature cell biology*. 2007;9(9):1089-97.

Mizokami M. Discovery of critical host factor, IL-28B, associated with response to hepatitis C virus treatment. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012;27(3):425-9.

Mohamad S, Yoursry A, Dalia AO, Olfat G, EL Neklawi S. Impact of IL28B Polymorphism on the Response to Treatment of Hepatitis C with Interferon Based Therapy or Direct Acting Antivirals. *The Medical Journal of Cairo University*. 2021;89(June):1333-40.

Mohamed NA, Swify EM, Amin NF, Soliman MM, Tag-Eldin LM, Elsherbiny NM. Is serum level of methylated RASSF1A valuable in diagnosing hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis C? *Arab J Gastroenterol*. 2012;13:111-115.

Montserret R, Saint N, Vanbelle C, Salvay AG, Simorre JP, Ebel C, Sapay N, Renisio JG, Böckmann A, Steinmann E, Pietschmann T. NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(41):31446-61.

Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(25):8905-9.

Mostafa WSEM, Al-Dahr MHS, Omran DAH, Abdullah ZF, Elmasry SH, Ibrahim MN. Influence of some methylated hepatocarcinogenesis-related genes on the response to antiviral therapy and development of fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26:60-9.

Munakata T, Nakamura M, Liang Y, Li K, Lemon SM. Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18159-18164.

Murphy DG, Sablon E, Chamberland J, Fournier E, Dan-davino R, Tremblay CL. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from Central Africa. *J Clin Microbiol* 2015;53:967—72.

N Zekri AR, Raafat AM, Elmasry S, Bahnassy AA, Saad Y, Dabaon HA, El-Kassas M, Shousha HI, Nassar AA, El-Dosouky MA, Hussein N. Promotor methylation: does it affect response to therapy in chronic hepatitis C (G4) or fibrosis? *Ann Hepatol*. 2014;13:518-524.

Nagata H, Nakagawa M, Asahina Y, Sato A, Asano YU, Tsunoda T, Miyoshi M, Kaneko S, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M. Effect of interferon-based and-free therapy on early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*. 2017;67(5):933-9.

Nagayama K, Kurosaki M, Enomoto N, Miyasaka Y, Marumo F, Sato C. Characteristics of hepatitis C viral genome associated with disease progression. *Hepatology* 2000;31:745 – 50.

Naito M, Matsui A, Inao M, Nagoshi S, Nagano M, Ito N, Egashira T, Hashimoto M, Mishihiro S, Mochida S, Fujiwara K. SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *Journal of gastroenterology*. 2005;40:381-8.

Nakade K, Pan J, Yamasaki T, Murata T, Wasyluk B, Yokoyama KK. JDP2 (Jun Dimerization Protein 2)-deficient mouse embryonic fibroblasts are resistant to replicative senescence. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(16):10808-17.

Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *Journal of hepatology*. 2010;52(1):72-8.

Nattermann J, Vogel M, Nischalke HD, Danta M, Ahlenstiel G, Michalk M, Sauerbruch T, Rockstroh JK, Spengler U. The transforming growth factor- β high-producer genotype is associated with response to hepatitis C virus-specific therapy in HIV-positive patients with acute hepatitis C. *Aids*. 2008;22(11):1287-92.

Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, Cabrera R, Liu C, Davis GL. Long-Term Interleukin 10 Therapy in Chronic Hepatitis C Patients Has A Proviral and Anti-Inflammatory Effect. *Hepatology*. 2003;38(4):859-68.

Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2005;3:S97-101.

- Nguyen NH, VuTien P, Garcia RT, Trinh H, Nguyen H, Nguyen K, Levitt B, Nguyen MH. Response to pegylated interferon and ribavirin in Asian American patients with chronic hepatitis C genotypes 1 vs 2/3 vs 6. *Journal of viral hepatitis*. 2010;17(10):691-7.
- Nishikawa Y, Kajiura Y, Lew JH, Kido JI, Nagata T, Naruishi K. Calprotectin Induces IL-6 and MCP-1 Production via Toll-Like Receptor 4 Signaling in Human Gingival Fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2017;232:1862-1871.
- Nomeir H, Elsheredy H, Nomeir A, Mostafa NR, El-Hamshary S. Diagnostic performance of RASSF1A and CDKN2A gene methylation versus α -fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Clinical and Experimental Hepatology*. 2022;8(3):243.
- O'Brien TR, Yang HI, Groover S, Jeng WJ. Genetic factors that affect spontaneous clearance of hepatitis C or B virus, response to treatment, and disease progression. *Gastroenterology*. 2019;156(2):400-17.
- Ogata F, Akuta N, Kobayashi M, Fujiyama S, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Suzuki F. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by all-oral direct-acting antiviral regimens. *Journal of Medical Virology*. 2018;90(6):1087-93.
- Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2009;85(7):217-28.
- Okajima W, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Ohashi T, Imamura T, Kiuchi J, Nishibeppu K, Arita T, Konishi H, Shiozaki A. Liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World Journal of Gastroenterology*. 2017;23(31):5650.
- Okanoue T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, Takehara T, Tanaka E, Onji M, Toyota J, Chayama K, Yoshioka K, Izumi N, Akuta N, Kumada H. Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study. *J Gastroenterol* 2009;44:952-963.
- Orito E, Mizokami M, Mizoguchi N, Ohba K, Tohnai M. Hepatitis C virus serotype II responds more favorably to interferon-alpha therapy. *J Hepatol* 1994;21(1):130—2.
- Ortiz V, Berenguer M, Rayón JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Official journal of the American College of Gastroenterology|ACG*. 2002;97(9):2408-14.
- Pan ZG, Kashuba VI, Liu XQ, Shao JY, Zhang RH, Jiang JH, Guo C, Zabarovsky ER, Ernberg I, Zeng YX. High frequency somatic mutations in RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer biology & therapy*. 2005;4(10):1116-22.
- Park SH, Lim JS, Lim SY, Tiwari I, Jang KL. Hepatitis C virus Core protein stimulates cell growth by down-regulating p16 expression via DNA methylation. *Cancer Lett*. 2011;310(1):61-8.
- Parra M, Laufer N, Manrique JM, Jones LR, Quarleri J. Phylogenetic Diversity in Core Region of Hepatitis C Virus Genotype 1a as a Factor Associated with Fibrosis Severity in HIV-1-Coinfected Patients. *BioMed Research International*. 2017;2017(1):1728456.

- Pascut D, Hoang M, Nguyen NN, Pratama MY, Tiribelli C. HCV Proteins modulate the host cell miRNA expression contributing to Hepatitis C pathogenesis and Hepatocellular Carcinoma Development. *Cancers*. 2021;13(10):2485.
- Pasha HF, Mohamed RH, Radwan MI. RASSF1A and SOCS1 genes methylation status as a noninvasive marker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomarkers*. 2019;24(2):241-7.
- Paul D, Madan V, Ramirez O, Bencun M, Stoeck IK, Jirasko V, Bartenschlager R. Glycine zipper motifs in hepatitis C virus nonstructural protein 4B are required for the establishment of viral replication organelles. *Journal of virology*. 2018;92(4):10-128.
- Pavlović D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(10):6104-8.
- Pavón-Castillero EJ, Muñoz-de-Rueda P, López-Segura R, Gila A, Quiles R, Muñoz-Gámez JA, Carazo A, Martínez P, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. Importance of IL-10 and IL-6 during chronic hepatitis C genotype-1 treatment and their relation with IL28B. *Cytokine*. 2013;61:595-601.
- Pawlotsky JM, Negro F, Aghemo A, Berenguer M, Dalgard O, Dusheiko G, Marra F, Puoti M, Wedemeyer H, European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: final update of the series☆. *Journal of hepatology*. 2020;73(5):1170-218.
- Pawlotsky JM. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology*. 2000;32(5):889-96.
- Pawlotsky JM. What are the pros and cons of the use of host-targeted agents against hepatitis C? *Antiviral Res*. 2014;105:22–25.
- Peng JL, Wu JZ, Li GJ, Wu JL, Xi YM, Li XQ, Wang L. Association of RASSF1A hypermethylation with risk of HBV/HCV-induced hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Pathology-Research and Practice*. 2020;216(10):153099.
- Perez S, Gal-Tanamy M. Studying the hepatitis C virus-induced epigenetic signature after cure with direct-acting antivirals. *Hepatitis C Virus Protocols*. 2019:191-207.
- Perrin-Cocon L, Kundlacz C, Jacquemin C, Hanouille X, Aublin-Gex A, Figl M, Manteca J, André P, Vidalain PO, Lotteau V, Diaz O. Domain 2 of hepatitis c virus protein ns5a activates glucokinase and induces lipogenesis in hepatocytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(2):919.
- Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(34):7824.
- Petryk N, Bultmann S, Bartke T, Defossez PA. Staying true to yourself: mechanisms of DNA methylation maintenance in mammals. *Nucleic acids research*. 2021;49(6):3020-32.
- Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70:576-83.
- Pietschmann T, Brown RJ. Hepatitis C virus. *Trends in microbiology*. 2019;27(4):379-80.

- Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochemical Journal*. 2004;381(2):453-62.
- Provazzi PJ, Rossi LM, Carneiro BM, Miura VC, Rosa PC, de Carvalho LR, de Andrade ST, Fachini RM, Grotto RM, Silva GF, Valêncio CR. Hierarchical assessment of host factors influencing the spontaneous resolution of hepatitis C infection. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2019;50:147-55.
- Qu Z, Jiang Y, Li H, Yu DC, Ding YT. Detecting abnormal methylation of tumor suppressor genes GSTP1, P16, RIZ1, and RASSF1A in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Oncology letters*. 2015;10(4):2553-8.
- Quan H, Zhou F, Nie D, Chen Q, Cai X, Shan X, Zhou Z, Chen K, Huang A, Li S, Tang N. Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 2014;33:2826-2835.
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995;83:993-1000.
- Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Bazzi AM, Alfouzan WA, Alsuliman SA, Aldrazi FA, Haque S. Overview of hepatitis C infection, molecular biology, and new treatment. *Journal of infection and public health*. 2020;13(5):773-83.
- Raos D, Ulamec M, Bojanac AK, Bulic-Jakus F, Jezek D, Sincic N. Epigenetically inactivated RASSF1A as a tumor biomarker. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2021;21(4):386.
- Reddy KR, Messinger D, Popescu M, Hadziyannis SJ. Peginterferon alfa-2a (40kDa) and ribavirin: comparable rates of sustained virological response in sub-sets of older and younger HCV genotype 1 patients. *Journal of Viral Hepatitis*. 2009;16(10):724-31.
- Rinaldi L, Nevola R, Franci G, Perrella A, Corvino G, Marrone A, Berretta M, Morone MV, Galdiero M, Giordano M, Adinolfi LE, Sasso FC. Risk of Hepatocellular Carcinoma after HCV Clearance by Direct-Acting Antivirals Treatment Predictive Factors and Role of Epigenetics. *Cancers (Basel)*. 2020;12:1351.
- Rocco J, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001;264:42-55.
- Roger S, Ducancelle A, Le Guillou-Guillemette H, Gaudy C, Lunel F. HCV virology and diagnosis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2021;45(3):101626.
- Rojas JM, Alejo A, Martín V, Sevilla N. Viral pathogen-induced mechanisms to antagonize mammalian interferon (IFN) signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021;78:1423-44.
- Roth WK. History and future of nucleic acid amplification technology blood donor testing. *Transfus Med Hemother* 2019;46:67—75.
- Sanger F, Nicken S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997;74:5463-5467.

- Sasaki R, Kanda T, Kato N, Yokosuka O, Moriyama M. Hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma after sustained virologic response. *World Journal of Hepatology*. 2018;10(12):898.
- Sato K, Uraoka T. Challenge to overcome: nonstructural protein 5A– P32 deletion in direct-acting antiviral- based therapy for hepatitis C virus. *World J Gastroenterol*. 2018;24(38):4304-4310.
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(5):1412-7.
- Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer*. 2006:211-50.
- Seeff LB, Hoofnagle JH. National Institutes of Health consensus development conference: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology*. 2002;36:S1-2.
- Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS One* 2012;7:e51656.
- Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997;237:7-13.
- Serre SB, Krarup HB, Bukh J, Gottwein JM. Identification of alpha interferon- induced envelope mutations of hepatitis C virus in vitro associated with increased viral fitness and interferon resistance. *J Virol*. 2013;87:12776–93.
- Shabangu CS, Huang JF, Hsiao HH, Yu ML, Chuang WL, Wang SC. Liquid biopsy for the diagnosis of viral hepatitis, fatty liver steatosis, and alcoholic liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(10):3732.
- Shaker MK, Abdella HM, Khalifa MO, Dorry AK. Epidemiological characteristics of hepatocellular carcinoma in Egypt: a retrospective analysis of 1313 cases. *Liver International*. 2013;33(10):1601-6.
- Sharma SA, Kowgier M, Hansen BE, Brouwer WP, Maan R, Wong D, Shah H, Khalili K, Yim C, Heathcote EJ, Janssen HL. Toronto HCC risk index: a validated scoring system to predict 10-year risk of HCC in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2018;68(1):92-9.
- Shen C, Hu T, Shen L, Gao L, Xie W, Zhang J. Mutations in ISDR of NS5A gene influence interferon efficacy in Chinese patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1898—903.
- Shen L, Ahuja N, Shen Y, Habib NA, Toyota M, Rashid A, Issa JP. DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:755-61.
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster

- D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol.* 2003;4(1):63-8.
- Shi X, Pan Y, Wang M, Wang D, Li W, Jiang T, Zhang P, Chi X, Jiang Y, Gao Y, Zhong J. IL28B genetic variation is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus, treatment response, serum IL-28B levels in Chinese population. *PloS one.* 2012;7(5):e37054.
- Shimakami T, Hijikata M, Luo H, Ma YY, Kaneko S, Shimotohno K, Murakami S. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *Journal of virology.* 2004;78(6):2738-48.
- Siddiqui NN, ul Haq A, Siddiqui OA, Khan R. DNA methyltransferase 1, 3a, and 3b expression in hepatitis C associated human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological association. *Tumor Biology.* 2016;37:10487-97.
- Silva AM, Alvarado-Arnez LE, Azamor T, Batista-Silva LR, Leal-Calvo T, Bezerra OC, Ribeiro-Alves M, Kehdy FD, Neves PC, Bayma C, Silva JD. Interferon-lambda 3 and 4 Polymorphisms Increase Sustained Virological Responses and Regulate Innate Immunity in Antiviral Therapy With Pegylated Interferon-Alpha. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2021;11:656393.
- Simmons B, Saleem J, Hill A, Riley RD, Cooke GS. Risk of late relapse or reinfection with hepatitis C virus after achieving a sustained virological response: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases.* 2016;62(6):683-94.
- Simonović-Babić J, Bojović K, Fabri M, Cvejić T, Svorcan P, Nožić D, Jovanović M, Škrbić R, Stojiljković MP, Mijailović Ž. Real-life data on the efficacy and safety of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir + dasabuvir + ribavirin in the patients with genotype 1 chronic hepatitis C virus infection in Serbia. *Vojnosanitetski preglod.* 2019;76(5):531-536.
- Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014;59(1):318-27.
- Song MS, Chang JS, Song SJ, Yang TH, Lee H, Lim DS. The centrosomal protein RAS association domain family protein 1A (RASSF1A)-binding protein 1 regulates mitotic progression by recruiting RASSF1A to spindle poles. *Journal of Biological Chemistry.* 2005;280(5):3920-7.
- Song MS, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, Lee JH, Hong HK, Lee H, Choi N, Kim J, Kim H, Kim JW. The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nature cell biology.* 2004;6(2):129-37.
- Song Y, Friebe P, Tzima E, Jünemann C, Bartenschlager R, Niepmann M. The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *Journal of virology.* 2006;80(23):11579-88.
- Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC, Howe AY, Garcia F, Perno CF, Ceccherini-Silberstein F. Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resistance Updates.* 2018;37:17-39.
- Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Genetic variation in IL-28B is associated with response to the therapy for chronic hepatitis C. *J Pharmacol Sci.* 2011;115:263-269.

- Sultana C, Oprişan G, Teleman MD, Dinu S, Oprea C, Voiculescu M, Ruta S, HepGen 88/2012 Project Team. Impact of hepatitis C virus core mutations on the response to interferon-based treatment in chronic hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(37):8406.
- Sun B, Karin M. NF-kappaB signaling, liver disease and hepato-protective agents. *Oncogene* 2008;27:6228-6244.
- Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *Journal of virology*. 2005;79(2):1271-81.
- Syyam A, Akbar HR, Jilkova ZM, Afzal S. Role of Genetic and Epigenetic Modifications in the Progression of Hepatocellular Carcinoma in Chronic HCV Patients. *Livers*. 2023;3(1):82-92.
- Tabata K, Neufeldt CJ, Bartenschlager R. Hepatitis C virus replication. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2020;10(3).
- Tachi Y, Katano Y, Honda T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Samejima Y, Goto H. Impact of amino acid substitutions in the hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and hepatic oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Liver International*. 2010;30(4):554-9.
- Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:797-819.
- Tahata Y, Sakamori R, Takehara T. Treatment progress and expansion in Japan: From interferon to direct-acting antiviral. *Global Health & Medicine*. 2021;3(5):321-34.
- Taheri S, CANATAN H, AYGEM B, Yildiz O, KORKMAZ K, ZARARSIZ G. Characterization of the interleukin-28B gene rs12979860 C/T polymorphism in Turkish chronic hepatitis C patients and healthy individuals. *Balkan Medical Journal*. 2015;32(2):147-55.
- Taherkhani R, Farshadpour F. Global elimination of hepatitis C virus infection: Progresses and the remaining challenges. *World J Hepatol* 2017;9:1239-1252.
- Takahashi K, Iwata K, Matsumoto M, Matsumoto H, Nakao K, Hatahara T, Ohta Y, Kanai K, Maruo H, Baba K, Hijikata M. Hepatitis C virus (HCV) genotype 1b sequences from fifteen patients with hepatocellular carcinoma: the 'progression score' revisited. *Hepatology research*. 2001;20(2):161-7.
- Te HS, Randall G, Jensen DM. Mechanism of action of ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology & hepatology*. 2007;3(3):218.
- Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway JC, Rice CM. Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *Journal of virology*. 2008;82(3):1073-83.
- Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 2005;435:374-379.
- Toh TB, Lim JJ, Chow EK. Epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Clinical and translational medicine*. 2019;8(1):13.

Torrents de la Peña A, Sliopen K, Eshun-Wilson L, Newby ML, Allen JD, Zon I, Koekkoek S, Chumbe A, Crispin M, Schinkel J, Lander GC. Structure of the hepatitis C virus E1E2 glycoprotein complex. *Science*. 2022;378(6617):263-9.

Tsai CL, Li HP, Lu YJ, Hsueh C, Liang Y, Chen CL, Tsao SW, Tse KP, Yu JS, Chang YS. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 involves C-Jun NH2-terminal kinase signaling. *Cancer research*. 2006;66(24):11668-76.

Tyagi E, Liu B, Li C, Liu T, Rutter J, Grossman D. Loss of p16INK4A stimulates aberrant mitochondrial biogenesis through a CDK4/Rb-independent pathway. *Oncotarget*. 2017;8(55848– 55862).

Um TH, Kim H, Oh BK, Kim MS, Kim KS, Jung G, Park YN. Aberrant CpG island hypermethylation in dysplastic nodules and early HCC of hepatitis B virus-related human multistep hepatocarcinogenesis. *Journal of hepatology*. 2011;54(5):939-47.

Uraki S, Tameda M, Sugimoto K, Shiraki K, Takei Y, Nobori T, Ito M. Substitution in amino acid 70 of hepatitis C virus core protein changes the adipokine profile via toll-like receptor 2/4 signaling. *PloS one*. 2015;10(6):e0131346.

Virzì A, Suarez AA, Baumert TF, Lupberger J. Rewiring host signaling: hepatitis C virus in liver pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2020;10(1).

Waheed Y. Effect of interferon plus ribavirin therapy on hepatitis C virus genotype 3 patients from Pakistan: treatment response, side effects and future prospective. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2015;8(2):85-9.

Wang J, Wang B, Chen X, Bi J. The prognostic value of RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2011;32(3):411-6.

Wang Q, Yu G, Ming X, Xia W, Xu X, Zhang Y, Zhang W, Li Y, Huang C, Xie H, Zhu B. Imprecise DNMT1 activity coupled with neighbor-guided correction enables robust yet flexible epigenetic inheritance. *Nature genetics*. 2020;52(8):828-39.

Wang X, Zhou Y, Wang C, Zhao Y, Cheng Y, Yu S, Li X, Zhang W, Zhang Y, Quan H. HCV Core protein represses DKK3 expression via epigenetic silencing and activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway during the progression of HCC. *Clinical and Translational Oncology*. 2022;24(10):1998-2009.

Wang YC, Yu ZH, Liu C, Xu LZ, Yu W, Lu J, Zhu RM, Li GL, Xia XY, Wei XW, Ji HZ, Lu H, Gao Y, Gao WM, Chen LB. Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in serum from gastric and colorectal adenocarcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2008;14:3074-3080.

Watson ER, Brown NG, Peters JM, Stark H, Schulman BA. Posing the APC/C E3 ubiquitin ligase to orchestrate cell division. *Trends in cell biology*. 2019;29(2):117-34.

Waziry R, Hajarizadeh B, Grebely J, Amin J, Law M, Danta M, George J, Dore GJ. Hepatocellular carcinoma risk following direct-acting antiviral HCV therapy: a systematic review, meta-analyses, and meta-regression. *Journal of hepatology*. 2017;67(6):1204-12.

Webster G, Barnes E, Brown D, Dusheiko G. HCV genotypes—role in pathogenesis of disease and response to therapy. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2000;14(2):229-40.

Weiner AJ, Christopherson C, Hall JE, Bonino F, Saracco G, Brunetto MR, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, Venkatakrishna S, Miyamura T. Sequence variation in hepatitis C viral isolates. *Journal of hepatology*. 1991;13:S6-14.

What Is Epigenetics. DNA Methylation, 2013. Dostupno na URL: <https://www.whatisepigenetics.com/dna-methylation/>.

Wodak A. An overview of Hepatitis C; Clinical Management in Opiate Pharmacotherapy Settings Australian Society for HIV Medicine Inc (ASHM). National Viral Hepatitis Education Program. Sep 2009:1-4.

Wolff B, Naumann M. INK4 cell cycle inhibitors direct transcriptional inactivation of NF-kappaB. *Oncogene*. 1999;18(2663–2666).

Wong IH, Dennis Lo YM, Zhang J, Liew CT, Ng MH, Wong N, Lai PB, Lau WY, Hjelm NM, Johnson PJ. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer research*. 1999;59(1):71-3.

World Health Organization. Fact sheets, 2024. Dostupno na URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.

World Health Organization. Global hepatitis report, 2017. Dostupno na URL: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1082595/retrieve>.

World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections: accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact. Geneva, 2021. Dostupno na URL: (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>).

World Health Organization. Updated recommendations on treatment of adolescents and children with chronic HCV infection, and HCV simplified service delivery and diagnostics, 2022. Dostupno na URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240052734>.

Xie J, Xie L, Wei H, Li XJ, Lin L. Dynamic regulation of DNA methylation and brain functions. *Biology*. 2023;12(2):152.

Xie Z, Xiao Z, Wang F. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein (HCV-NS5A) inhibits hepatocyte apoptosis through the NF- κ B/miR-503/bcl-2 pathway. *Molecules and cells*. 2017;40(3):202-10.

Yagi M, Kabata M, Tanaka A, Ukai T, Ohta S, Nakabayashi K, Shimizu M, Hata K, Meissner A, Yamamoto T, Yamada Y. Identification of distinct loci for de novo DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B during mammalian development. *Nature communications*. 2020;11(1):3199.

Yi M, Wang W, Chen S, Peng Y, Li J, Cai J, Zhou Y, Peng Q, Ban Y, Zeng Z, Li X, Xiong W, Li G, Xiang B. Dual-functionality of RASSF1A overexpression in A375 cells is mediated by activation of IL-6/STAT3 regulatory loop. *Mol Biol Rep*. 2018;45:1277-87.

Yoo YA, Na AR, Lee MS, Yoon S, Kim JS. RASSF1A suppresses oncogenic H-Ras-induced c-Jun N-terminal kinase activation. *International journal of oncology*. 2006;29(6):1541-7.

Yuen MF, Lai CL: Response to combined interferon and ribavirin is better in patients infected with hepatitis C virus genotype 6 than genotype 1 in Hong Kong. *Intervirology* 2006;49:96–98.

Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res* 2013;35:6-16.

Zang JJ, Xie F, Xu JF, Qin YY, Shen RX, Yang JM, He J. P16 gene hypermethylation and hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2011;17(25):3043.

Zeisel MB, Crouchet E, Baumert TF, Schuster C. Host-targeting agents to prevent and cure hepatitis C virus infection. *Viruses*. 2015;7(11): 5659–5685.

Zekri Ael-R, Nassar AA, El-Din El-Rouby MN, Shousha HI, Barakat AB, El-Desouky ED, Zayed NA, Ahmed OS, El-Din Youssef AS, Kaseb AO, Abd El-Aziz AO, Bahnassy AA. Disease progression from chronic hepatitis C to cirrhosis and hepatocellular carcinoma is associated with increasing DNA promoter methylation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;14(11):6721-6.

Zeng Y, Li W, Li J, Wang J, Zhou B, Zhang J, Liu S, Wu Y, Hou J, Zhou Y. Hepatitis C virus amino acid sequence diversity correlates with the outcome of combined interferon/ribavirin therapy in Chinese patients with chronic hepatitis C. *Archives of virology*. 2012;157:1113-21.

Zhang C, Li J, Huang T, Duan S, Dai D, Jiang D, Sui X, Li D, Chen Y, Ding F, Huang C. Meta-analysis of DNA methylation biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016b;7(49):81255.

Zhang F, Pomerantz JH, Sen G, Palermo AT, Blau HM. Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(11):4395-400.

Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016a;2016.

Zhao P, Malik S, Xing S. Epigenetic mechanisms involved in HCV-induced hepatocellular carcinoma (HCC). *Frontiers in Oncology*. 2021;11:677926.

Zhou H, Qian Q, Shu T, Xu J, Kong J, Mu J, Qiu Y, Zhou X. Hepatitis C virus NS2 protein suppresses RNA interference in cells. *Virologica Sinica*. 2020;35:436-44.

Zou C, Tan H, Zeng J, Liu M, Zhang G, Zheng Y, Zhang Z. Hepatitis C virus nonstructural protein 4B induces lipogenesis via the Hippo pathway. *Archives of Virology*. 2023;168(4):113.

STRUČNA BIOGRAFIJA

Nikola Kokanov je rođen 18.10.1990. godine u Novom Sadu. Diplomirao je 25.6.2014. godine, na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, (studijska grupa-Molekularna biologija i fiziologija). Master diplomu je stekao 23.10.2015. na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu (modul-Humana molekularna biologija) odbranom master rada pod naslovom „*Analiza metilacije gena p14ARF u lokalno uznapredovalim karcinomima rektuma čoveka*”, pod mentorstvom dr Milene Krajnović, višeg naučnog saradnika Univerziteta u Beogradu - Institut za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i komentorstvom dr Gorana Brajuškovića, redovnog profesora Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta.

Školske 2015/2016 godine je upisao doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, modul-Molekularna biologija eukariota. U periodu od 4.2.2019. do 25.1.2022. godine angažovan kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju u Beogradu. Od 6.2.2019. je zaposlen u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik je izabran 25.1.2022. godine.

Do sada je publikovao 5 radova iz uže naučne oblasti i 8 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova, kao i jedno poglavlje u monografiji. Trenutno je angažovan na temi „Molekularne determinante za dizajn tumor markera“ (0802503).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Никола Коканов _____

Број индекса _____ М3010/2015 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Епигенетичке промене као потенцијални биомаркери у болестима јетре индукованим хроничном инфекцијом вирусом хепатитиса Це генотипа 1бe“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Никола Коканов

Број индекса М3010/2015

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада „Епигенетичке промене као потенцијални биомаркери у болестима јетре индукованим хроничном инфекцијом вирусом хепатитиса Це генотипа 1бс“

Ментор др Милена Крајновић, виши научни сарадник Универзитета у Београду –

Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Епигенетичке промене као потенцијални биомаркери у болестима јетре индукованим хроничном инфекцијом вирусом хепатитиса Це генотипа 1бс“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.