

# Mehanizmi imunološkog nadzora citomegalovirusne infekcije jetre

---

Štimac, Davor

Doctoral thesis / Disertacija

1997

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:213508>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Davor Štimac

MEHANIZMI IMUNOLOŠKOG NADZORA  
CITOMEGALOVIRUSNE INFEKCIJE JETRE

SVEUCILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA



930040839

Doktorska disertacija

Rijeka, srpanj 1997.

AUTOR

Ime i prezime	DAVOR STIMAC
Datum i mjesto rođenja	27. rujna 1962. Rijeka
Naziv fakulteta, odnosno organizacije za postdiplomski studij i datum završene nastave II i III stupnja	Medicinski fakultet Rijeka 1987. Medicinski fakultet Rijeka 1991.
Sadašnje zaposlenje	asistent Medicinski fakultet Rijeka

II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA  
MEHANIZMI IMUNOLOŠKOG NADZORA CITOME-  
GALOVIRUSNE INFEKCIJE JETRE

Naslov rada

Broj stranica, slika, tabela, bibliografskih podataka	113 str., 2. tab., 19 sl.
Ustanova i mjesto gdje je disertacija izrađena	Medicinski fakultet Rijeka K.B.c. Rijeka
Znanstvena disciplina	BIOMEDICINA i zdravstvo
Mentori	Prof.dr.sc. Stipan Jonjic
Fakultet na kojem je disertacija obranjena	Medicinski fakultet u Rijeci

III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme	22. ožujka 1984.
Datum predaje rada	1. lipnja 1987.
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen	15. srpnja 1987.
Sastav povjerenstva koje disertaciju ocijenilo	Prof.dr.sc. Franjo Čohar, prof. dr.sc. Krešimir Pavelić, prof. dr.sc. Milivoj Rubinić i prof. dr.sc. Stipan Jonjic
Datum obrane disertacije	31. srpnja 1987.
Sastav povjerenstva pred kojim je disertacija obranjena	I s t i
Datum promocije	

Rad je izrađen na Zavodu za histologiju i embriologiju i Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci te Internoj klinici Kliničkog bolničkog centra u Rijeci.

Voditelj: Prof. dr. Stipan Jonjić

Rad sadrži 113 stranica, 19 slika i 2 tablice.

## ZAHVALA

Izrada ovakvog rada, zahtijeva mnogo više od intelektualne i fizičke energije njegova potpisnika. Zahtijeva, zapravo, mnogo dobre volje onih, s čijim se trudom najčešće neće povezivati ovaj rukopis, kada ga slučajni ili možda, namjerni čitalac izvuče s police. Mislim tu prvenstveno na osoblje Zavoda za histologiju i embriologiju i Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci te Centralnog laboratorija KBC Rijeka, kojima sam zahvalan što su, uz svoje svakodnevne radne obaveze, nalazili vremena da mi pomognu i omoguće da se u njihovoj sredini ne osjećam kao gost. Svima im stoga, bez nabiranja imena, zahvaljujem.

Ipak, postoje osobe čiji je doprinos ovome radu toliko velik, da ih moram izdvojiti. To je prvenstveno moj mentor, prof.dr. Stipan Jonjić, koji me još kao studenta zarazio virusom eksperimentalnog rada i pred otprilike četiri godine, kada sam već duboko zašao u kliničku medicinu, uspio potaknuti na povratak temeljnim medicinskim istraživanjima. Zahvalan sam mu za sve što je učinio u mojem prihvaćanju i shvaćanju znanosti, kao i htijenjima da ovaj rad bude bolji. Njegova zasluga je i što me povezoao s Joanne Trgovcich, Amerikankom hrvatskog porijekla, koja je godinu dana kao gostujućí znanstvenik radila na njegovim projektima. Pomažući mi pri eksperimentima koji su dio ove disertacije, Joanne me svojim znanstvenim iskustvom i nadasve neiscrpnom energijom i upornošću poticala na uvijek nova traženja. Osoba kojoj dugujem veliku zahvalnost je i dr.sc. Bojan Polić koji mi je svojim velikim znanjem i staloženošću uspijevao sve moje propuste objasniti kao očekivane.

Na kraju, zahvalio bih se i svojim učiteljima i profesorima s Interne klinike koji su moju želju da doktorsku disertaciju izradim iz područja temeljnih medicinskih znanosti shvatili razumno.

Davor Štimac

Rijeka, srpanj 1997.

## SAŽETAK

Hepatitis je vodeća klinička komplikacija u bolesnika s citomegalovirusnom (CMV) infekcijom. U radu smo ispitivali patogenezu hepatitisa izazvanog mišjim CMV nakon infekcije izazvane letalnom i subletalnom dozom virusa. Iako virus replicira u mnogim organima i tkivima, najviši titar i najznačajnije morfološke promjene uočili smo u jetri i slezeni. Infekcija s letalnom dozom virusa dovela je do konfluentne nekroze u jetri i oštećenja jetrene funkcije, što je bilo praćeno visokim stupnjem replikacije virusa u tom organu. U miševa koji su inficirani subletalnom dozom virusa, mehanizmi imunološke kontrole uspjeli su zaustaviti replikaciju virusa u jetri petog dana nakon infekcije, što je dovelo do oporavka jetrene funkcije. Deplecija limfocita T uzrokovala je u miševa koji su primili subletalnu dozu virusa teško oštećenje jetrene funkcije i smrt životinja. Virusna infekcija uzrokovala je i izrazitu, o dozi ovisnu, depleciju T i B limfocita u slezeni. Osim toga dovela je i do supresije odgovora kasnog tipa preosjetljivosti, ukazujući na imunosupresiju izazvanu virusom, kao važanog čimbenika u patogenezi CMV hepatitisa. Utvrdili smo, također, da uz direktno oštećenje jetre izazvano virusom i drugi čimbenici kao što su citokini ( $TNF\alpha$  i  $IFN\gamma$ ), imaju utjecaja na jetrenu bolest. Značaj pojedinih limfocitnih T subpopulacija u progresiji bolesti, ispitivali smo u eksperimentima s adoptivnim prijenosom stanica. Subpopulacija  $CD8^+$  limfocita T pokazala se ključnom u kontroli virusne replikacije u jetri te oporavku jetrene funkcije i histopatoloških promjena, dok su  $CD4^+$  limfociti T samo djelomično utjecali na povratak jetrene funkcije i umanjenje histopatoloških promjena. Iz navedenog proizlazi da virusom izazvana supresija imunog odgovora ima središnju ulogu u etiologiji CMV izazvanog hepatitisa.

## SUMMARY

Hepatitis is a major clinical complication of human cytomegalovirus (CMV) infection. We have investigated the pathogenesis of murine CMV-induced hepatitis during lethal and sublethal infection. While numerous organs and tissues were capable of supporting virus replication, the highest virus titers and most significant morphological changes occurred in liver and spleen. Lethal dose infection resulted in confluent necrosis of the liver and loss of liver function, which correlated with high levels of virus replication in this organ. In mice given a sublethal dose, immune control mechanisms could limit virus replication in the liver by the fifth postinfection day and liver function recovered. Depletion of T cells led severe loss of liver function and death in mice given an otherwise sublethal dose. Virus infection also resulted in a profound, dose dependent depletion of T and B spleen cell populations. Furthermore, virus infection led to suppression of delayed-type hypersensitivity responses, indicating that virus induced immunosuppression is an important aspect of CMV pathogenesis. We have found also that an effect due to cytokines (TNF  $\alpha$  and IFN $\gamma$ ) in addition to direct damage due to virus replication, contribute to liver disease. An adoptive transfer protocol was employed to investigate the selective role of T cell subsets in disease progression. The CD8<sup>+</sup> subset of T cells were essential to control of virus replication in liver, recovery of liver function, and resolution of histopathological changes, whereas the CD4<sup>+</sup> subset could only partially restore liver function and rescue tissue damage. Taken together, we propose that virus induced suppression of immune responses play a crucial role in the etiology of CMV-induced hepatitis.

## POPIS KRATICA

- ADCC-antibody dependent cell cytotoxicity (citotoksičnost ovisna o protutijelima)
- ALP - alkalna fosfataza
- ALT - alanin aminotransferaza
- AST - aspartat aminotransferaza
- BSA - bovine serum albumin (goveđi serumski albumin)
- CMV - citomegalovirus
- DNFB - dinitrofluorbenzen
- EBV - Epstein-Barr virus
- ELISA - enzyme linked immunosorbent assay (enzimatski imunisorbentni test)
- FCS - fetal calf serum (fetalni teleći serum)
- FITC - fluorescein izotiocijanat
- GGT - gama glutamil transpeptidaza
- GM-CSF - granulocyte-macrophage colony stimulating factor
- HAV - hepatitis A virus
- HB<sub>c</sub>Ag - hepatitis B core antigen
- HB<sub>e</sub>Ag - hepatitis B envelope antigen
- HBLV - limfotropni virus za stanice B
- HB<sub>s</sub>Ag - hepatitis B surface antigen
- HBV - hepatitis B virus
- HCMV - humani citomegalovirus
- HCV - hepatitis C virus
- HDV - hepatitis D virus
- HEV - hepatitis E virus
- HHV - humani herpes virus
- HSV - herpes simplex virus
- IE - immediate early (najranije razdoblje ciklusa umnažanja virusa)
- IFCC - International Federation of Clinical Chemistry
- IFN - interferon
- IL - interleukin
- LDH - laktat dehidrogenaza
- MCMV - mišji citomegalovirus
- MEF - mišji embrionalni fibroblasti
- MHC - major histocompatibility complex (glavni kompleks tkivne podudarnosti)
- mIFN - mišji interferon
- NK - natural killer
- PCR - polymerase chain reaction (lančana reakcija DNA polimeraze)
- PE - phycoerithrin (fikoeritrin)
- PFU - plaque forming unit (jedinica virusa koja uzrokuje čistinu citopatogenim učinkom)
- RIA - radioimmunoassay
- SŽS - središnji živčani sustav
- SGV - salivary gland virus (izolat virusa iz žlijezda slinovnica)
- TNF - tumour necrosis factor (tumor nekrotizirajući faktor)
- VZV - varicella zoster virus



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME</b>	1
<b>2. OPĆI DIO</b>	4
<b>2.1. HEPATITIS</b>	4
2.1.1. Povijest	4
2.1.2. Etiologija	4
2.1.3. Epidemiologija	6
2.1.4. Patologija	6
2.1.5. Patogeneza	7
2.1.6. Klinička slika	9
2.1.7. Dijagnoza	10
2.1.8. Terapija	12
<b>2.2. CITOMEGALOVIRUS</b>	13
2.2.1. Opće karakteristike	13
2.2.2. Epidemiologija	14
2.2.3. Patologija	15
2.2.4. Klinički oblici bolesti	16
2.2.4.1. Kongenitalna infekcija	16
2.2.4.2. Perinatalna infekcija	16
2.2.4.3. Mononukleoza	16
2.2.4.4. Infekcija u imunoneosdatnih osoba	17
2.2.5. Dijagnoza	17
2.2.6. Terapija i profilaksa	18
<b>2.3. CITOMEGALOVIRUSNI HEPATITIS</b>	19
2.3.1. CMV hepatitis u novorođenčadi	19
2.3.2. CMV hepatitis u imunokompetentnih osoba	20
2.3.3. CMV hepatitis u imunoneosdatnih bolesnika	21
2.3.4. Dijagnoza i terapija	22
<b>2.4. IMUNOLOŠKI MEHANIZMI U VIRUSNIM INFEKCIJAMA</b>	22
<b>2.5. IMUNOLOŠKI NADZOR CMV INFEKCIJE</b>	25
2.5.1. Uloga limfocita T u nadzoru CMV infekcije	26

2.5.2. Uloga stanica NK u nadzoru CMV infekcije -----	27
2.5.3. Uloga citokina u nadzoru CMV infekcije -----	27
2.5.4. Uloga protutijela u nadzoru CMV infekcije -----	28
<b>2.6. MIŠJI MODEL CMV INFEKCIJE -----</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE -----</b>	<b>30</b>
<b>3.1. MATERIJAL -----</b>	<b>30</b>
3.1.1. Mediji -----	30
3.1.2. Puferi -----	31
3.1.3. Kemikalije -----	31
3.1.4. Plastično laboratorijsko posuđe -----	32
3.1.5. Reagencije za protočnu citometriju -----	33
3.1.6. Laboratorijske životinje -----	33
3.1.7. Virusi -----	33
<b>3.2. METODE -----</b>	<b>34</b>
3.2.1. Deplecija limfocitnih T subpopulacija -----	34
3.2.2. Priprema suspenzije splenocita -----	35
3.2.3. Priprema mišjih embrionalnih fibroblasta -----	35
3.2.4. Određivanje virusa u organima -----	36
3.2.5. Imunosupresija i prijenos imunih stanica (adoptivni T prijenos) -----	37
3.2.6. Dokazivanje limfocitnih podvrsta protočnom citometrijom -----	38
3.2.7. Vađenje krvi i pohranjivanje seruma -----	38
3.2.8. Određivanje biokemijskih parametara u serumu -----	39
3.2.9. Testiranje staničnog imunološkog odgovora reakcijom kasnog tipa preosjetljivosti -----	39
3.2.10. Određivanje mišjeg IFN $\gamma$ u serumu -----	40
3.2.11. Određivanje mišjeg TNF $\alpha$ u serumu -----	41
3.2.12. Patohistologija -----	41
3.2.13. Imunohistokemijske metode -----	41
3.2.14. Statističke metode -----	42

<b>4. REZULTATI</b> .....	43
<b>4.1. INFEKCIJA S MCMV IZOLIRANIM IZ ŽLIJEZDA SLINOVNICA (SGV)</b> .....	43
4.1.1. Virulentnost SGV ovisna je o dozi virusa i imunološkom statusu domaćina.....	43
4.1.2. Hepatitis kao najznačajnija karakteristika SGV infekcije .....	44
4.1.3. Odnos replikacije virusa u tkivu i stupnja oštećenja jetre .....	48
4.1.4. Biokemijski parametri kao pokazatelji oštećenja jetre .....	50
4.1.5. Uloga limfocita T u kontroli SGV infekcije .....	54
4.1.6. Reakcija kasnog tipa preosjetljivosti u SGV inficiranih životinja.....	57
4.1.7. Deplecija stanica slezene miševa inficiranih sa SGV .....	58
4.1.8. Glikemija u SGV infekciji .....	63
4.1.9. Značaj $IFN\gamma$ i $TNF\alpha$ u SGV infekciji.....	64
<b>4.2. INFEKCIJA S MCMV IZOLIRANIM IZ KULTURE TKIVA</b> .....	66
4.2.1. Značaj $CD8^+$ limfocita T u nadzoru MCMV hepatitisa.....	66
4.2.2. Adoptivni prijenos u terapiji MCMV izazvanog hepatitisa .....	75
<b>5. RASPRAVA</b> .....	77
<b>6. ZAKLJUČNI PREGLED</b> .....	83
<b>7. LITERATURA</b> .....	85

## 1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Citomegalovirus (CMV) pripada beta podskupini obitelji herpes virusa. To je DNA virus široko rasprostranjen među jedinkama i specifičan za vrstu. Odlikuju ga dug reproduktivni ciklus, spor razvoj u kulturi, replikacija određena samo na neke vrste stanica te uvećanje inficiranih stanica (citomegalija) uz stvaranje inkluzija u jezgri i citoplazmi (126,143).

CMV je ubikvitaran virus i većina ljudi (40-100%) je njime inficirana do rane odrasle dobi (77). Primarna infekcija je najčešće asimptomatska ili se manifestira kao blago febrilno oboljenje, no virus ostaje latentno prisutan u domaćinu. Za razliku od perzistentne virusne infekcije, koja je kronična produktivna infekcija i ovisna je o virusnim mehanizmima ometanja imunološkog nadzora, tipu inficiranih stanica, te širenju virusa među populacijom, latentna infekcija je potpuni izostanak produktivne infekcije u tkivima, pri čemu virusni genom ostaje trajno prisutan u pojedinim stanicama (126,141,193). O stanju imunog sustava domaćina ovisi da li će infekcija proći nezapaženo ili će rezultirati klinički izraženom bolešću. Imunokompetentan domaćin uspješno kontrolira infekciju pa nakon početne replikacije u tkivima virus ostaje u latentnoj fazi. Reaktivacija latentnog virusnog genoma dovodi, u uvjetima stečenih nedostatnosti imunološkog sustava, do rekurentnih infekcija koje često uzrokuju bolest s teškom kliničkom slikom (101).

CMV infekcija je od posebnog kliničkog značaja u novorođene djece i imunosuprimiranih osoba (83,105). Kako je broj imunone dostatnih bolesnika u porastu uslijed agresivnih imunosupresivnih postupaka u suvremenoj medicini, sve većeg broja transplantiranih bolesnika i porasta oboljelih od AIDS-a, značaj razumijevanja patogenetskih mehanizama u ovoj infekciji je predmet brojnih kliničkih i bazičnih medicinskih istraživanja. Klinička praksa pokazuje upravo oštećenje jetre kao najizraženiju komplikaciju CMV infekcije u čovjeka. Posebno su osjetljivi bolesnici s jetrenim transplantatom od kojih 17 do 50% razvija klinički manifestan hepatitis (90). Težina i tijek bolesti u imunodeficijentnih

bolesnika razlikuju se ovisno o prirodi infekcije (primarna, superinfekcija, reaktivacija iz stanja latencije), kao i imunološkom i serološkom statusu bolesnika. Primjetno je da posljednjih nekoliko godina, posebno od kada je potvrđeno postojanje virusa hepatitisa C, virusno oštećenje jetre postaje predmet središnjeg značenja u hepatologiji.

U otkrivanje mehanizama imunološkog nadzora, kao i bioloških osobitosti virusa, posljednjih su desetljeća uloženi veliki naponi, a često je korišten model infekcije mišjim CMV (MCMV), koji ima slične biološke osobine i odnos prema imunološkom sustavu domaćina kao humani CMV (HCMV) (94, 99). Nakon infekcije imunokompetentnog domaćina s CMV dolazi do aktivacije humoralnog i celularnog specifičnog imunog odgovora, kao i nespecifičnih obrambenih mehanizama (20). Humoralni imunološki odgovor nije od većeg značaja u kontroli primarne CMV infekcije. Inficirani miševi kojima su depletirani  $CD4^+$  limfociti T, čija je pomoć neophodna u nastanku i sazrijevanju specifičnog humoralnog odgovora, dobro kontroliraju virusnu infekciju u svim tkivima osim žlijezdama slinovnicama u kojima se razvija perzistencija. To ukazuje na celularnu kontrolu CMV infekcije  $CD8^+$  limfocitima T (85, 101), a potvrđeno je i u eksperimentima na miševima koji ne proizvode protutijela. Pokazano je da protutijela nemaju značaja u nadzoru primarne CMV infekcije, no da ograničavaju širenje virusa u rekurentnoj infekciji (87). Iako klinički rezultati ne pokazuju povezanost remisije bolesti i titra protutijela specifičnih za CMV, profilaktičko intravensko injiciranje CMV hiperimunoglobulina smanjuje pojavu i težinu bolesti tijekom primarne infekcije, a injiciranjem monoklonskog protutijela na strukturne proteine MCMV 24 sata prije infekcije značajno se smanjuje nivo replikacije MCMV u jetri miševa tijekom akutne CMV infekcije i pruža zaštitu protiv letalne infekcije (190). Nezavisnost funkcije i indukcije  $CD8^+$  limfocita T od učinka  $CD4^+$  limfocita T razlikuje se kod pojedinih virusnih infekcija. Međutim, uklanjanjem  $CD8^+$  limfocita T u miševa inficiranih MCMV,  $CD4^+$  limfociti T preuzimaju kontrolu infekcije i to ne samo u slinovnicama, već i u drugim tkivima (86,164). Spomenuti kompenzacijski učinak  $CD4^+$  limfocita T, može se objasniti djelovanjem ovih stanica preko citokina kao što su tumor

nekrotizirajući faktor alfa ( $TNF\alpha$ ) i interferon gama ( $IFN\gamma$ ), indukcijom aktivnosti drugih stanica ("natural killer" /NK/ stanice, makrofagi) ili podržavanjem citotoksičnosti ovisne o protutijelima. U prvim danima infekcije NK stanice imaju značajnu ulogu u antivirusnom odgovoru domaćina, a krivulja njihove aktivnosti usporedna je krivulji koncentracije  $IFN\gamma$  kojeg u početku infekcije one uglavnom i luče (7,75). Protuvirusni učinak NK stanica se ostvaruje neposrednim citolitičkim djelovanjem (116) i posredno preko citokina ili protuvirusnih protutijela (38,123). Neutralizacija  $TNF\alpha$  i  $IFN\gamma$  monoklonskim protutijelima umanjuje antivirusne učinke ne samo  $CD4^+$ , već i  $CD8^+$  stanica, što ukazuje na njihovu funkcijsku povezanost (114).  $TNF\alpha$  i  $IFN\gamma$  pokazuju sinergizam u inhibiciji replikacije CMV (113).

U okviru eksperimenata učinjenih u ovom radu željeli smo pojasniti patogenezu CMV infekcije jetre, a posebno mehanizme njenog imunološkog nadzora. U tu svrhu koristili smo model infekcije miša s MCMV, a promjene u funkciji i morfologiji jetre pratili smo biokemijskim laboratorijskim parametrima, određivanjem titra virusa u organima, patohistologijom i imunohistokemijom.

U istraživanjima smo pratili MCMV infekciju u imunokompetentnih i imunosuprimiranih BALB/c životinja. Naglasak istraživanja bio je na promjenama u jetri, no obzirom da su manifestacije bolesti bile sistemske, pratili smo i oštećenje jetre u odnosu prema drugim organima. Osobitu pažnju posvetili smo značaju subpopulacija limfocita T u imunom odgovoru pri CMV infekciji, a posebno hepatitisu, kao njenoj najznačajnijoj manifestaciji. Uočili smo i brojne patološke promjene u slezeni koje prati deplecija limfocita T i B, čime smo objasnili snažnu imunosupresiju tijekom infekcije. Analizom vrijednosti citokina ( $TNF\alpha$  i  $IFN\gamma$ ), uvidjeli smo njihov značaj u kontroli CMV infekcije, a modelima adoptivnog prijenosa dokazali smo učinkovitost profilaktičkog i terapijskog učinka senzibiliziranih limfocita T.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. HEPATITIS

#### 2.1.1. Povijest

Epidemijska žutica spominje se u babilonskom Talmudu, antičkoj kineskoj literaturi i Hipokratovim spisima, a prvi opis bolesti datira iz pisma kojim papa Zaharija 781. godine opisuje bolest među vojnicima. U Napoleonovim ratovima ili za rata Sjever-Jug u Americi, opisane su epidemije koje su zahvatile preko pedeset tisuća ljudi, a u prvom svjetskom ratu broj oboljelih izražavao se u milijunima (181). Četrdesetih godina ovog stoljeća uočava se da su fekalno oralni put i transfuzije krvi i plazme odgovorne za najveći dio epidemija. Pojmovi hepatitis A, odnosno B uvode se 1947., a 1955. otkrivanje testa za određivanje transaminaza u serumu omogućava jasnije dijagnosticiranje jetrenog oštećenja (219). Blumberg otkriva tzv. Australia antigen 1964. godine, povezuje ga s hepatitisom B i na taj način otvara eru serologije u dijagnosticiranju hepatitisa (11). Nije se moglo dokazati da su svi slučajevi hepatitisa uzrokovani virusima A ili B, pa je uveden pojam non A, non B hepatitisa. Daljnjim napretkom serologije i drugih sofisticiranijih dijagnostičkih testova otkrivaju se i drugi hepatotropni virusi. Iako se danas u većini slučajeva hepatitisa može dijagnosticirati uzročnik, mogućnosti da se prevenira bolest, spriječi njezino širenje i posebno kronične posljedice, još uvijek su vrlo ograničene te stoga predstavljaju jedan od najintragantnijih problema suvremene medicine.

#### 2.1.2. Etiologija

Etiološke uzroke svih hepatitisa možemo podijeliti u infektivne i neinfektivne. Infektivni uzročnici su najčešće virusi, no mogu biti i bakterije,

mikobakterije, rikecije, mikoplazme i protozoi. Od neinfektivnih uzročnika najčešći su lijekovi i ekstrahepatična oštećenja (109).

Posebno mjesto u hepatologiji zauzimaju tzv. primarni virusi hepatitisa, koji bez obzira što ne pripadaju istoj porodici, imaju sposobnost umnožavanja u jetri i to u asimptomatskom (s jedinim dokazom o infekciji na temelju serološke dijagnostike specifičnih protutijela), odnosno simptomatskom obliku sa žuticom kao najkarakterističnijim simptomom, ali i temperaturom, malaksalošću, gastroenteričkim tegobama i drugim nespecifičnim simptomima (120). U primarne viruse ubrajamo virus hepatitisa A (71, 82, 122), B (78, 175), C (36, 43, 128, 218), D (155, 215), E (103, 104, 131) i posljednji otkriveni virus hepatitisa G (92, 112, 120, 183, 184). Brojni drugi virusi tzv. sekundarni virusi hepatitisa: Epstein-Barr (EBV), CMV, herpes simplex virus (HSV), varicella zoster virus (VZV), virus morbilla, parotitisa, adenovirusi, coxsackie B virusi mogu se uz simptome generalizirane bolesti pronaći i u jetri (118). Jetra je zahvaćena i u infekcijama egzotičnim virusima, kao što su virus žute groznice, groznice Lassa, Ebole, hemoragijske groznice (80). Uz viruse u infektivne uzročnike ubrajamo uzročnike sifilisa, tularemije, legioneloze, salmoneloze, leptospiroze, bruceloze i gram negativnih sepsi te mikobakterije, rikecije i protozoe (toksoplazmoza, malarija) (181).

Neinfektivni uzroci hepatitisa su najčešće lijekovi i to analgetici (paracetamol, aspirin), anestetici (halotan, metoksifloran), antineoplastici (6-merkaptopurin), antituberkulotici (isoniasid, rifampicin), kardiovaskularni (metildopa), psihofarmaci (fenitoin), blage droge kao što je "ecstasy" (50). Hepatitis mogu uzrokovati i kardiopulmonalni arrest, teško zatajenje srca, akutno toksično alkoholno oštećenje, metabolički poremećaji i patološka stanja hepatobilijarnog sustava koja dovode do akutne bilijarne opstrukcije (109, 127).

Akutno zatajenje jetre, odnosno fulminantni hepatitis je rijetka bolest s često fatalnim ishodom (52), a definira se pojavom encefalopatije unutar osam tjedana od početka bolesti, u bolesnika bez ranije poznatog jetrenog oštećenja (79, 138). Potrebno je napomenuti da fulminantni hepatitis nastaje najčešće kao posljedica B hepatitisa, osobito pri koinfekciji s virusom D. Javlja se i u oboljelih



od hepatitisa A i E (119), a vrlo je rijedak u hepatitisa C (206). Može se javiti i u okviru HSV, EBV i CMV hepatitisa. Lijekovi ga uzrokuju u oko 5% slučajeva, a posebno je opasan oblik nakon trovanja gljivom *Amanita phalloides* (47, 52).

### **2.1.3. Epidemiologija**

S epidemiološkog stanovišta razlikujemo viruse hepatitisa A i E kod kojih je put prijenosa uglavnom fekalno oralni te viruse B, C, D i novootkriveni G koji se u najvećoj mjeri prenose krvlju. Analiza studija koje prate epidemiološke karakteristike ovih infekcija kao i hepatitisa uzrokovanih drugim uzročnicima uveliko nadilazi potrebe ovog rada (54, 120).

### **2.1.4. Patologija**

Morfološke promjene, uočljive pri oštećenju jetre, bez obzira na uzrok mogu se podijeliti u pet temeljnih reakcija jetrenog tkiva: nekrozu, degeneraciju, upalu, regeneraciju i fibrozu. Hepatitis se definira pojavom akutnih ili kroničnih upalnih stanica u jetri. Iako upala može uslijediti nakon hepatocelularne nekroze, limfocitni atak na jetrene stanice s eksprimiranim antigenima je najčešći uzrok jetrenog oštećenja. Upalne stanice mogu biti ograničene na mjestu ulaska (portalni prostori) ili razasute po parenhimu (37).

Nekroza jetrenih stanica povezana je s leukocitnom i histiocitnom reakcijom i infiltracijom. Nekroza se jasnije vidi u području terminalnih jetrenih venula, dok je u portalnom području vidljivija stanična infiltracija. Sinusoide pokazuju infiltraciju mononuklearima, polimorfonuklearima i eozinofilima. Jetrene stanice u području terminalne jetrene venule često imaju acidofilna tjelešca, balonirane su i imaju veću mitotičku aktivnost. Prisutna je i proliferacija žučnih vodova. U kasnijoj fazi bolesti upalne stanice se postupno povlače, a retikulinska mreža koja je uglavnom dobro sačuvana, predstavlja okvir pri

regeneraciji (111). Patološke promjene u jetri kod oboljelih od različitih oblika akutnog virusnog hepatitisa su slične. Jetra bolesnika s hepatitisom A, ima manje izražene parenhimne promjene (fokalna nekroza, proliferacija Kupferovih stanica, acidofilna tjelešca), no jetra bolesnika s hepatitisom C, ali je nekroza i infiltracija mononukleara u periportalnim područjima jače izražena, no u bolesnika s B hepatitisom (199).

U masivnoj fulminantnoj nekrozi, promijenjen je čitav acinus. Jetra je makroskopski reducirane veličine, a nodularna regeneracija vidi se samo u onih koji prežive dulje od 2 tjedna (72).

### **2.1.5. Patogeneza**

Etiološki faktori koji mogu dovesti do hepatitisa su različiti i ne postoji jedinstven patogenetski mehanizam. Mehanizmi nastanka hepatitisa uzrokovani hepatotoksičnim lijekovima, srčanim zatajenjem, alkoholom ili virusnom infekcijom su različiti, kao što su i patogenetski mehanizmi kojima pojedini virusi akutno ili kronično oštećuju jetreno tkivo (31, 102, 151). Niti jedan od primarnih virusa hepatitisa nije tipično citopatogen pa se smatra da je oštećenje hepatocita bar dijelom uzrokovano imunološkim mehanizmima. Primarno mjesto replikacije hepatitis A virusa (HAV) su hepatociti, no priroda staničnih receptora odgovornih za taj tropizam nije razjašnjena. Oštećenje hepatocita uzrokovano ovim virusom tumačilo se direktnom citopatogenošću virusa, no pokazano je *in vitro* da virus može replicirati u kulturi stanica bez da ih ošteti. To je ukazalo na mogućnost da je u HAV infekciji jetreno oštećenje uzrokovano imunim mehanizmima. Studije *in vitro* pokazale su lizu HAV inficiranih stanica, stanicama NK i CD8<sup>+</sup> limfocitima T, a cirkulirajući interferon bio je prisutan u bolesnika s akutnom infekcijom. Tropizam hepatitis B virusa (HBV) za jetru ovisi o vezanju HBV proteina ovojnice za specifične receptore na hepatocitima, ali precizan mehanizam vezanja i penetracije virusa nije razjašnjen (76, 110, 134). U ranom stadiju HBV

infekcije, prije nego je imuni sustav mobiliziran u cijelosti, prvu crtu obrane čini interferon  $\alpha$  (152). Uništavanje virusa i oštećenje hepatocita u akutnoj bolesti povezano je s  $CD8^+$  limfocitima T koji su usmjereni protiv HBV proteina ovojnice ( $HB_cAg$  i  $HB_eAg$ ). U HBV inficiranih nailazimo i na povećanu aktivnost NK stanica, povećanu produkciju  $IFN\gamma$  u mononuklearnim stanicama i povećanu aktivnost IL-2. Pokazano je da se celularni odgovor pri HBV infekciji javlja ranije od humoralnog, a da formiranje kompleksa antigena i protutijela može aktiviranjem komplementa dovesti do ekstrahepatičkih komplikacija (42). Čimbenici koji utječu na razvoj perzistentne infekcije ostaju nejasni, a jedan od mogućih mehanizama je relativni manjak  $IFN\gamma$  što dovodi do smanjene MHC ekspresije inficiranih hepatocita umanjujući time njihovu šansu da budu oštećene citotoksičnim stanicama. Visok stupanj kroniciteta nakon neonatalne infekcije vjerovatno je povezan s fiziološkom manjkom citokina, deficitom koji je uočen i u drugih grupa podložnih razvoju kronične infekcije kao što su osobe s Down sindromom ili odrasli s deficijencijom limfocita T (130,212).

Patogenetski mehanizam nastanka hepatitisa C je nejasan i pretpostavlja se da ulogu u oštećenju jetrenog tkiva imaju uz virus i drugi čimbenici koji određuju stupanj jetrenog oštećenja (18). Virusna RNA može se naći u hepatocitima već drugog dana nakon infekcije (132), a pokazano je da hepatitis C virus (HCV) replicira i u mononuklearima i T stanicama (182). Oblik imunog odgovora koji će se aktivirati tijekom HCV infekcije određuje i ishod infekcije. Limfocitni T odgovor nalazi se u zdravih antiHCV pozitivnih osoba, dok je aktivacija B limfocitnog odgovora udružena s razvojem kroničnog C hepatitisa (108).

Virus hepatitisa D (HDV) je u prirodi pronađen jedino u ljudi, gdje je njegova replikacija moguća samo pri koinfekciji s HBV (59). Opisan je citotoksičan učinak infekcije prema hepatocitima, no nejasno je da li je on uzrokovan HDV, HBV ili imunim odgovorom domaćina (60). Za virus hepatitisa E (HEV) se pretpostavlja da primarno replicira u intestinalnom traktu, a potom putem portalne vene dolazi u jetru gdje replicira u citoplazmi hepatocita (104).

Vidi se da patogeneza nije u potpunosti razjašnjena niti u najčešćih uzročnika hepatitisa pa su patogenetski mehanizmi, bez obzira na uzročnika, predmet brojnih istraživanja.

#### **2.1.6. Klinička slika**

Prema kliničkoj slici, bez obzira na uzrok, razlikujemo više oblika bolesti i to od asimptomatskog do fulminantnog hepatitisa. Možemo uočiti klinički blage oblike bolesti bez simptoma i sa samo naznačeno povišenim vrijednostima transaminaza u serumu. Postoje i bolesnici kod kojih se bolest očituje gastrointestinalnim simptomima ili simptomima kao u oboljelih od gripe. Velik dio ovih bolesnika ostaje neprepoznat (77). Ikterični hepatitis je obilježen prodromalnim periodom u trajanju od tri, četiri dana, do nekoliko tjedana za vrijeme kojeg se bolesnik ne osjeća dobro, uz gubitak apetita, mučninu, glavobolju, subfebrilitet i nelagodu pod desnim rebranim lukom. Nakon prodromalnog perioda uočavaju se tamniji urin i svjetlija stolica, na što se nadovezuje žutica, uz palpabilnu jetru mekanog ruba pod desnim rebranim lukom. Nakon ikteričnog razdoblja koje kod odraslih traje od jedan do četiri tjedna, a kod djece i manje, slijedi period oporavka, u kojem se boja stolice i mokraće vraćaju na normalu, slabost i malaksalost gube pa se klinička slika i biokemijski nalazi normaliziraju u roku od oko šest mjeseci. Ukoliko se na bolest nadoveže kronični hepatitis daljnji klinički tijek prati progresija kroničnog jetrenog oštećenja (181).

Fulminantni hepatitis je karakteriziran brzim razvojem jetrenog zatajenja. Ponekad se razvije tako brzo, da se bolest, još prije pojave žutice zamijeni za akutnu psihozu ili meningoencefalitis. Klinička slika se sastoji od teških znakova koagulopatije, hepaticke kome, ascitesa, plućnih komplikacija, bubrežnog zatajenja, cerebralnog edema, sepse, hemoragije i hipoglikemije (139).

### 2.1.7. Dijagnoza

Samo na temelju kliničke slike ne možemo postaviti dijagnozu te su nam od pomoći laboratorijske analize. Pod tim podrazumijevamo pregled urina i stolice, hematološke, imunološke, serološke i imunohistokemijske pretrage, biopsiju jetre, kao i eventualne dopunske radiološke i endoskopske pretrage.

U urinu se bilirubin pojavljuje u preikteričnoj fazi, a nestaje dok je u serumu još pozitivan, dok je urobilinogen pozitivan u urinu u kasnoj preikteričnoj fazi, a gubi se u ikteričnoj fazi, jer tada vrlo malo bilirubina dopijeva u crijevo. Javljanjem žutice stolica postaje svjetlija. Žuticu prati porast bilirubina u serumu, a porast konjugiranog bilirubina može se uočiti dok je ukupni još normalan.

Aspartat aminotransferaza (AST) je enzim koji katalizira prijenos  $\gamma$ -amino grupe aspartata na  $\gamma$ -keto grupu ketoglutarata u sintezi oksalata. Nalazi se u mitohondrijima i citosolu hepatocita, no i u mnogim drugim tkivima (srce, glatka muskulatura, bubrezi, mozak) te stoga nije hepatospecifičan. Enzim alanin aminotransferaza (ALT) katalizira prijenos  $\gamma$ -amino grupe alanina na  $\gamma$ -keto grupu piruvata, hepatospecifičan je i nalazi se u citosolu hepatocita. Serumske vrijednosti AST i ALT mogu se povećati u ekstrahepatičnim oboljenjima, kao npr. infarktu miokarda i rabdomiolizi, no ipak najviše vrijednosti se nalaze pri nekrozi hepatocita u teškom akutnom virusnom hepatitisu, toksičnom oštećenju jetre i prolongiranom cirkulatornom zatajenju. Apsolutne vrijednosti transaminaza samo ponekad koreliraju s težinom i prognozom bolesti. U masivnoj jetrenoj nekrozi u prvih 24 do 48 sati serumske vrijednosti transaminaza su izrazito povećane, da bi se sljedećih dana vrijednosti smanjile i bile malo do umjereno povećane. Poseban je značaj ovih enzima u ranoj dijagnozi hepatitisa jer se povise prije pojave žutice, a od temeljnog su značaja i u neikteričnom hepatitisu gdje njihove vrijednosti mogu višestruko nadilaziti normalne vrijednosti. Alkalna fosfataza (ALP), enzim je membrane hepatocita, a u hepatitisu obično ne prelazi vrijednosti više od tri puta iznad granice normale. Gama glutamil transpeptidaza (GGT), katalizira prijenos  $\gamma$ -amino peptidne skupine peptida kao što je glutation, na druge aminokiseline. U parenhimnim jetrenim oštećenjima vrijednosti GGT

koreliraju s vrijednostima ALP, a odražavaju kompresiju malih intrahepatalnih žučnih vodova. Laktat dehidrogenaza (LDH) i njeni izoenzimi široko su rasprostranjeni u stanicama tijela tako da njihove vrijednosti imaju značaja jedino u kontekstu ostalih specifičnijih nalaza. Pseudokolinesteraza je enzim koji se velikim dijelom sintetizira u jetri te je koristan u diferenciranju hepatocelularnog od opstruktivnog ikterusa jer u nekomplikiranoj kolestazi ima normalne vrijednosti (181).

Pri hepatitisu nalazimo povišene vrijednosti željeza i feritina. U preikteričkoj fazi mogu se zamijetiti leukopenija, limfopenija i neutropenija koje se normaliziraju pojavom žutila. U težim slučajevima produljeno je protrombinsko vrijeme. Vrijednosti albumina i globulina se kvantitativno ne mijenjaju, dok su serumski imunoglobulini G i M u trećine bolesnika u akutnoj fazi bolesti povećani (159).

Rutinsku serološku obradu pri sumnji na oštećenje jetre izazvano hepatotropnim virusima, treba započeti određivanjem četiri parametra i to antiHAV, HBsAg, IgM antiHBc i antiHCV. Tek nakon te prvotne orijentacije u serumu se određuju drugi viralni antigeni, odnosno antitijela.

Jetrena biopsija rijetko je indicirana u akutnoj fazi bolesti pa se izvodi najmanje šest mjeseci kasnije radi patohistološkog razlikovanja ozdravljenog tkiva od onog u kojem se razvija kronični hepatitis. Imunohistokemijska obrada služi za dokazivanje određenih antigena u stanicama i tkivima. Antigeni prisutni u tkivima mogu se vizualizirati direktno i indirektno, ako se njihova protutijela konjugiraju s fluorescentnim česticama (181).

Radiološke i endoskopske metode mogu se koristiti kako bi se isključila druga patološka stanja koja mogu imati utjecaja na tijek bolesti. U dijagnostici hepatitisa ove metode nemaju značaja.

### 2.1.8. Terapija

Na akutni hepatitis terapijski tretman nema velikog učinka, jer bolest ima svoj tijek, na koji do sada poznatim sredstvima ne možemo značajnije utjecati. Unatoč tome, potrebno je bolesnika podvrgnuti higijensko dijetetskim mjerama. Uobičajeno je cjelodnevno ležanje u krevetu, no nije neophodno u mlađih i ranije zdravih. Period rekonvalescencije trebao bi biti dvostruko duži od vremena provedenog u bolnici ili u krevetu kod kuće. U prehrani nisu preporučljiva posebna ograničenja, iako je poželjno smanjiti unos masti, a povećati unos ugljikohidrata u fazi inapetencije, uz dostatnu opskrbu proteinima. Za vrijeme akutnog hepatitisa treba izbjegavati lijekove, a posebno narkotike, analgetike i trankvilizatore. Upotreba kortikosteroida, koja je ranije bila preporučana nema utjecaja na izliječenje, već je pokazano da može umanjiti prirodan imunološki odgovor. U slučajevima akutnog fulminantnog hepatitisa intenzivna njega je neophodna kako bi se nadoknadila funkcija jetrenih stanica, a najčešće je jedino moguće rješenje za takve bolesnika transplantacija jetre (41, 46).

Virusi hepatitisa B i C mogu dovesti do kroničnog hepatitisa u čijoj se terapiji koristi prvenstveno interferon  $\alpha$  i to s nezadovoljavajućim uspjehom. U novim studijama pokušava se uspješnost liječenja poboljšati antiviralnim lijekovima kao što je lamivudin kod B hepatitisa i ribavirin kod hepatitisa C (120).

## 2.2. CITOMEGALOVIRUS

### 2.2.1. Opće karakteristike

CMV pripada uz HSV (HSV-1 i HSV-2), VZV, EBV i limfotropni virus za stanice B (HBLV) ili humani herpes virus 6 (HHV-6) skupini herpes virusa infektivnih za čovjeka. Svi navedeni herpes virusi su ubikvitarni, a infekcija se češće javlja u populaciji mlađe dobi i nižeg socioekonomskog statusa. S izuzetkom VZV, većina infekcija izazvanih ovom grupom virusa su asimptomatske (20, 126, 209)

HCMV ili herpesvirus 5 (HHV-5) je DNA virus i prototip je grupe  $\beta$  herpes virusa. Odlikuju ga dug replikacijski ciklus i tropizam prema različitim stanicama te ograničeno širenje sa stanice na stanicu *in vitro*. CMV uzrokuje karakteristično povećanje inficiranih stanica s intranuklearnim inkluzijama koje se mogu uočiti i prije no što je virus izoliran. Nakon primarne infekcije, virusi perzistiraju u stanicama neodređeno vrijeme u nereplicirajućem stanju što se naziva latencija (98). U određenim stanjima, virusi mogu započeti s replikacijom što dovodi do sekundarne bolesti ili asimptomatske eliminacije virusa. U imunokompromitiranih može se razviti i potencijalno smrtonosna bolest zbog lokalnog, odnosno difuznog širenja virusa.

Mogu se javiti različiti tipovi interakcije između domaćina i virusa. Primarna infekcija je najčešće asimptomatska, iako transplacentarni prolaz virusa u vrijeme trudnoće može proizvesti bolest s citomegaličkim inkluzijama u fetusu. Mononukleoza je najčešća klinička manifestacija infekcije citomegalovirusom u zdravih odraslih, dok se u imunokompromitiranih pojedinaca najčešće nailazi na intersticijalni pneumonitis, hepatitis, kolitis ili zahvaćenost središnjeg živčanog sustava (SŽS) (77).

Pri kroničnoj perzistentnoj infekciji izlučivanje se virusa asimptomatski odvija putem urina, sline, sjemena i cervikovaginalnog sekreta unatoč



humoralnom i celularnom odgovoru domaćina. Ovaj oblik je značajan zbog širenja bolesti među zdravom populacijom.

Pri latentnoj infekciji virus perzistira u nereplicirajućem obliku u stanicama domaćina. Ipak i takav se virus tijekom transfuzija krvi ili transplantacija organa može prenijeti, a kliničke posljedice su teže ukoliko primalac nije ranije bio inficiran s CMV (157).

Pri reaktivaciji virus se preobraća u aktivnu formu koja se može izraziti kao asimptomatsko izlučivanje virusa ili diseminirana bolest - što je posebno slučaj kod imunokompromitiranih bolesnika (AIDS, transplantirani). Reaktivacija se osim u imunoneodostatnih može zbiti i u trudnica i dojilja. Smatra se da je to najčešći uzrok fetalne infekcije, no simptomatsku bolest razvijaju gotovo isključivo novorođenčad majki koje su tijekom trudnoće primarno inficirane virusom (77).

Humani CMV je specifičan za vrstu tako da se *in vitro* može širiti samo u stanicama humanog porijekla i vjerovatno, stanicama primata. U eksperimentalnim istraživanjima mnogo se koriste CMV miša, štakora i zamorca koji uz određena ograničenja, mogu dati korisne informacije o patogenezi infekcije (99).

### **2.2.2. Epidemiologija**

CMV infekcije su najvećim dijelom subkliničke, a prevalencija je povezana s nižim socioekonomskim statusom i lošim higijenskim uvjetima. Obzirom da je virus termo i higrolabilan, smatra se da je za njegovo horizontalno širenje potreban bliski kontakt, a kao izvori virusa navode se orofaringealni sekreti, krv, mokraća, stolica, suze, sjeme, cervikalni i vaginalni sekreti (88). Vertikalno, odnosno intrauterino prijenos virusa najbolje je istražen pa se zna da je postotak primarne infekcije oko 2-2,5% među seronegativnim ženama. Glavni izvor infekcije su dojenčad i djeca u okruženju trudnice. Postotak inficirane djece u prvih šest mjeseci života kao rezultat infekcije za vrijeme poroda ili tijekom

dojenja doseže od 10-60%, ovisno o sredini, a broj inficirane djece u populaciji prije puberteta varira od 40-80% u razvijenim zemljama, do praktički 100% u slabije razvijenim (210, 217). U adolescenata i odraslih širenje se virusa povezuje sa seksualnim kontaktom putem sjemena, vaginalnog sekreta i sline. Također virus se može širiti i kao posljedica transfuzija krvi i transplantacije organa (133, 185).

### **2.2.3. Patologija**

Oštećenja uzrokovana diseminiranom CMV infekcijom slična su u novorođenčadi i u imunokompromitiranih. Inficirane stanice su značajno uvećane, s velikim inkluzijama okruženim svjetlim obrubom i manjim bazofilnim citoplazmatskim inkluzijama. Diseminirana CMV infekcija uzrokuje žarišnu nekrozu s minimalnom upalom u praktički svim organima, no najizraženiju u žlijezdama slinovnicama, bubrezima, jetri, plućima, crijevu, gušterači, štitnjači, nadbubrežnim žlijezdama i mozgu (8). Citomegalične inkluzije prisutne su u endotelnim i epitelnim stanicama, a najviše u bubrežnom tubularnom epitelu, hepatocitima i stanicama portalnih žučnih vodova (61). U plućima su zahvaćene alveolarne epitelne stanice, makrofagi i endotelne stanice, javlja se intersticijski pneumonitis s intraalveolarnim edemom, eksudatom i fokalnim hijalnim membranama. CMV uzrokuje ulceracije u tankom i debelom crijevu. Encefalitis je najčešći u kongenitalnih infekcija s akutnim žarišnim upalnim promjenama. Korioretinitis se javlja izolirano ili u sklopu generalizirane bolesti (20).

## **2.2.4. Klinički oblici bolesti**

### **2.2.4.1. Kongenitalna infekcija**

Klinički manifestnu bolest sa žuticom, hepatosplenomegalijom, trombocitopenijom, petehijama i različitim neurološkim simptomima razvit će 10 do 15% intrauterino inficiranih fetusa. Opisane su i mikrocefalije, motorni deficiti, korioretinitis, moždane kalcifikacije i epileptičke krize. U preživjelih ostaju najčešće neurološke posljedice, mentalna zaostalost i gluhoća, dok se hepatosplenomegalija, žutica i hemoragični problemi gube (16).

### **2.2.4.2. Perinatalna infekcija**

Nastaje prolaskom ploda kroz inficirani porođajni kanal ili postnatalnim kontaktom s majčinim mlijekom i drugim sekretima (13). Nakon što se hrane mjesec dana mlijekom seropozitivnih majki novorođenčad će u oko 50% slučajeva biti inficirana (44). Infekcija se može razviti i nakon transfuzije krvi. Najveći dio novorođenčadi imat će asimptomatsku infekciju, dok će simptomatsku karakterizirati intersticijski pneumonitis, slabo dobivanje na težini, adenopatija, hepatitis, anemija i atipična limfocitoza (3, 162).

### **2.2.4.3. Mononukleoza**

CMV je odgovoran za oko dvije trećine slučajeva heterofilno negativne infektivne mononukleoze koji odgovaraju konvencionalnim hematološkim i kliničkim kriterijima. Bolest se može javiti 3 do 8 tjedana nakon transfuzije krvi. Manifestira se faringotonzilitisom i limfadenopatijom, a u laboratorijskim nalazima pozitivnim reuma faktorom, krioglobulinemijom, visokim vrijednostima

hladnih aglutinina, pozitivnim antinuklearnim protutijela i lažno pozitivnim testom na sifilis (77). Bolest se može komplicirati Bellovom paralizom, sindromom Guillain Barre, trombocitopenijom, meningoencefalitisom, hemolitičkom anemijom (88).

#### **2.2.4.4. Infekcija u imunoneдостatnih osoba**

Izražena je u oboljelih od hematoloških tumora, bolesnika koji se podvrgavaju transplantaciji organa (2, 4) i osoba inficiranih AIDS-om. U ovih bolesnika, virus može zahvatiti jetru, gušteraču, debelo crijevo, nadbubrežne žlijezde, te strukture oka i SŽS-a (156). Najveću opasnost predstavlja intersticijska pneumonija s progresivnom hipoksemijom koja predstavlja glavni uzrok smrti bolesnika podvrgnutih transplantaciji koštane srži (198). U CMV seronegativnih primatelja organa, poseban je rizik primanje seropozitivnog organa. Infekcija u tom slučaju zahvaća najčešće transplantirani organ, a klinički bolest ovisi o stupnju imunosupresije (17,117,133). CMV infekcija razvija se u kasnom tijeku progresije AIDS-a (168). Početna manifestacija je korioretinitis, a često se nalaze ezofagitis i kolitis. Nalazi autopsija pokazali su kod tih bolesnika i zahvaćenost perifernog i središnjeg živčanog sustava, pneumonitis, hepatitis te nekrozu nadbubrežnih žlijezda.

#### **2.2.5. Dijagnoza**

Za potvrdu dijagnoze potrebno je uz kliničku sliku izolirati virus iz kliničkog materijala i potvrditi najmanje četverostruki porast ili perzistirajuće povišen titrar protutijela (CMV IgM) (194). Različite metode kao što je imuna hemaglutinacija, latex hemaglutinacija, imunofluorescencija, virusna neutralizacija i radioimunoesej (radioimmunoassay /RIA/) upotrebljavaju se u određivanju IgG protutijela. Kultiviranjem na humanim fibroblastima citopatski

se učinak može zamijetiti već za nekoliko dana. Radi ranije dijagnoze uveden je tzv. "shell vial assay" pomoću kojeg se prisustvo HCMV može odrediti u roku od 24 sata, jer se imunološki određuje ekspresija skupine vrlo ranih gena (immediate-early /IE/) (20, 95). Polymerase chain reaction (PCR) metoda je s visokom specifičnošću za određivanje nazočnosti HCMV genoma u tkivima i postaje sve više standard za određivanje HCMV (137, 214). Unatoč tome PCR pozitivni rezultat ne razlikuje subkliničku infekciju od one koja ima izgleda progredirati u klinički značajnu bolest posebno u seropozitivnih primalaca jetrenog transplantata koji imaju visoki stupanj CMV reaktivacije, a nizak stupanj klinički manifestne CMV bolesti (15). Također i u praćenju učinka antiviralne terapije nije sasvim djelotvoran, jer ostaje pozitivan više tjedana nakon izlječenja. CMV DNA "hybrid capture test" podjednako uspješno detektira infekciju, no osjetljiviji je i specifičniji pri postavljanju dijagnoze bolesti i praćenju učinka antiviralne terapije (115). Osim ovih metoda upotrebljavaju se monoklonska protutijela za CMV specifične proteine kao što je detekcija reaktivnih polipeptida (pp65 pozitivne stanice) u cirkulirajućim polimorfonuklearnim leukocitima (20).

#### **2.2.6. Terapija i profilaksa**

Brojni antiviralni preparati (leukocitni interferon, stimulatori interferona, nukleozidi, aciklovir) korišteni su u liječenju CMV bolesti bez većeg uspjeha. U posljednje vrijeme pokazali su se klinički korisni ganciklovir, derivat aciklovira i foscarnet, inhibitor viralne DNA polimeraze (117, 187).

Za prevenciju bolesti važno je pri transfuzijama davati seronegativnu krv, a pri transplantaciji organa upotrebljavati organe seronegativnih davalaca za seronegativne primaocce. U profilaksi viralnih infekcija kod transplantiranih pacijenata i aciklovir i ganciklovir pokazali su određene pozitivne rezultate posebno ako se kombiniraju s imunoglobulinima (12, 14, 48, 73, 133, 189, 205). Posljednja randomizirana studija pokazala je da ganciklovir davan intravenski u

visokim dozama tijekom sto dana dovodi do redukcije CMV serokonverzije tako da se bolest javila samo u 0,8% tako tretiranih bolesnika (213).

Iako su u tijeku studije s atenuiranim CMV, smatra se da ovakav tip vakcina nije dovoljno siguran, posebno radi opasnosti vakciniranja žena u generativnom razdoblju s potencijalno replicirajućim teratogenim virusom. Imunogenost glavnog proteina ovojnice gB usmjerila je novija istraživanja HCMV vakcina najviše prema glavnom proteinu ovojnice gB, ali i pp65 matrix proteinu i gH glikoproteinu ovojnice (40, 137).

## **2.3. CITOMEGALOVIRUSNI HEPATITIS**

Iako mnogi virusi mogu izazvati oštećenje jetre toj se činjenici ne pridaje dovoljna pažnja u kliničkom radu pa je dijagnosticiranje hepatitisa pretežito usmjereno k primarnim hepatotropnim virusima. Porast broja bolesnika s AIDS-om (6), transplantiranih (5) te imunonedostatnih iz drugih razloga doveo je i do porasta prevalencije hepatitisa uzrokovanog različitim neuobičajenijim virusima.

### **2.3.1. CMV hepatitis u novorođenčadi**

U novorođenčadi se CMV hepatitis rijetko uočava, a klinički je posebno impresivna slika koja prati akutni respiratorni distres sindrom. Fulminantan tijek bolesti karakteriziraju žutica, purpura, hepatosplenomegalija i neurološka simptomatologija (zahvaćenost SŽS-a, unutrašnjeg uha, korioretinitis). Oni koji prežive, imaju dug oporavak s perzistirajućom žuticom, hepatomegalijom i oštećenjima žučnih vodova (29, 51, 96).

### 2.3.2. CMV hepatitis u imunokompetentnih osoba

U bolesnika s mononukleozom, uz ostale karakteristične simptome, može se uočiti klinička slika slična onoj uzrokovanoj primarnim hepatotropnim virusima, no bez pada temperature u trenutku pojave žutice. Žutica traje 2 do 3 tjedna, ponekad čak i 3 mjeseca, a praćena je porastom alkalne fosfataze i transaminaza. Rijetko se javlja masivna jetrena nekroza (74, 188).

Asimptomatski hepatitis može predstavljati početak CMV infekcije, dok se simptomatski rijetko susreće. Opisan je slučaj 21-godišnjeg imunokompetentnog muškarca sa suspektnim infektivnim hepatitisom, koji je imao uvećanu, mekanu jetru i izoliran CMV iz urina (27). Posttransfuzijski CMV hepatitis je isto tako nerazjašnjen. Nakon transfuzija može se naći ponekad i u potpuno asimptomatskih bolesnika porast antiCMV titra i/ili povećana ekskrecija virusa urinom (49).

Nedavno publicirana japanska studija, sustavno analizira klinički tijek i laboratorijske podatke u dvadeset ranije zdravih bolesnika (14 muškaraca i 6 žena u dobi od 14 do 59 godina) s CMV hepatitisom. Infekcija je potvrđena visokim titrom IgM protutijela i/ili progresivnim porastom IgG titra u serumu za vrijeme bolesti. Bolest se klinički manifestirala općom slabošću, epigastričnim bolom, povišenom temperaturom u trajanju tri do pet dana, grloboljom, kašljem, glavoboljom, osipom i hepatosplenomegalijom (209). U laboratorijskim nalazima uočeno je da su vrijednosti ALT dosezale vrhunac oko 15. dana nakon javljanja prvih simptoma i bile praćene vrškom vrijednosti atipičnih perifernih mononukleara ( $8,1 \pm 5,8\%$ ) u diferencijalnoj krvnoj slici. Praćena su također i povišenja vrijednosti AST, LDH, GGT, ALP, a uočena je i korelacija CMV IgM s ukupnim serumskim IgM. Zamijećen je niski broj  $CD4^+$  i visoki broj  $CD8^+$  stanica te posljedično niski  $CD4^+/CD8^+$  perifernih limfocita. Histološki su uočene upalna infiltracija portalnih zona te područja fokalnih nekroza, a limfociti su infiltrirali i parenhim uzduž sinusoidnog zida. Uočeni su binuklearni hepatociti, ali ne i inkluzijska tjelešca u jezgri i citoplazmi (202). Svi praćeni bolesnici u potpunosti su se oporavili od bolesti. U inficiranih osoba može se

pojaviti i granulomatozni hepatitis, s dugom neobjašnjivom temperaturom, bez limfadenopatije. U tih bolesnika biopsija jetre pokazuje mononuklearne infiltrate u portalnim područjima i razasute nekazeozne granulome s gigantskim stanicama (74).

### **2.3.3. CMV hepatitis u imunoneдостatnih bolesnika**

U imunoneдостatnih osoba bolest se može manifestirati kao hepatitis i to od klinički blagih do letalnih oblika što ovisi o stupnju imunoneдостatnosti. CMV infekcija je u svojoj blagoj simptomatskoj formi praćena povišenim vrijednostima jetrenih enzima dok se hiperbilirubinemija i žutica rijetko javljaju. U letalnih oblika, infekcija može dovesti do akutnog zatajenja jetre.

U bolesnika s AIDS-om, osim jetre, često su zahvaćeni i drugi dijelovi hepatobilijarnog trakta kao npr. žučni vodovi, pa nailazimo na kolangitis, papilarnu stenozu i sklerozirajući kolangitis (20).

Posebno je značajan problem CMV hepatitisa u bolesnika s transplantiranim organima (117, 150, 202, 205). Nakon transplantacije jetre hepatitis je opisan u djece i odraslih. Infekcija je najčešće primarna, a davalac seropozitivan. Ponekad se primarna infekcija razvija u primalaca CMV seronegativnih organa koji su primali višestruke transfuzije krvi. Takve su CMV infekcije odlikuju blažom kliničkom slikom od onih koje se prenose CMV seropozitivnim organima (49). Infekcija se u nekih bolesnika dijagnosticira jer se protokolom čini jetrena biopsija (19, 21) radi mogućeg odbacivanja tijekom prvih mjeseci nakon transplantacije, ali i zbog toga što inficirani imaju i klinički prepoznatljiv hepatitis sa temperaturom, bilirubinemijom i povišenim enzimima (135, 149). Opisana su i jetrena zatajenja koja su iziskivala ponovnu transplantaciju. Potrebno je naglasiti da je klinički važno razlikovati odbacivanje transplantata od CMV infekcije, jer odbacivanje treba tretirati povećanom imunosupresijom dok se CMV infekcija treba liječiti smanjenjem imunosupresije i uvođenjem antiviralne terapije (58,106). Klinički značajan CMV hepatitis



susreće se rjeđe u bolesnika s transplantiranim bubrezima, no u onih s transplantiranom jetrom (30,56). U bolesnika s leukemijom, CMV može uzrokovati diseminiranu bolest s hepatitisom kao kliničkom značajkom.

#### **2.3.4. Dijagnoza i terapija**

Dijagnoza se postavlja na uobičajen način, dakle izoliranjem virusa iz sline ili mokraće. Obično su prisutni pozitivna reakcija vezanja komplementa i IgM protutijela (149).

Virus se najčešće ne može prikazati nakon jetrene biopsije, ali se prikazom nuklearnih i citoplazmatskih inkluzija može indirektno dokazati monoklonskim protutijelima, imunoperoksidazom i imunofluorescentnim tehnikama (196). Intranuklearne viralne inkluzije češće se prikazuju u epitelu žučnih vodova, no u hepatocitima (20, 202). Imunohistokemijska analiza bioptata je mnogo osjetljivija metoda, no dokazivanje inkluzijskih tjelešaca (34).

Terapija i profilaksa opisane su u poglavlju o CMV.

### **2.4. IMUNOLOŠKI MEHANIZMI U VIRUSNIM INFEKCIJAMA**

Poznato je da patogeni bivaju prepoznati, a potom i uništeni pomoću različitih mehanizama. Limfociti B prepoznaju izvanstanične antigene među kojima najveći broj predstavljaju bakterije, dok limfociti T mogu prepoznati antigene prerađene unutar stanica kao što su virusni antigeni.

Virusna replikacija unutar stanica najčešće ne može biti prepoznata pomoću protutijela koja cirkuliraju u ekstracelularnim prostorima. Limfociti T su nositelji stanicama posredovanog imunog odgovora koji se zasniva na reakciji između njih i stanica koje nose njima prepoznatljiv antigen (84). Virusi repliciraju u citosolu ili bliskom nuklearnom prostoru i njima inficirane stanice bivaju uništene citotoksičnim limfocitima T, koji nose na staničnoj površini CD8

molekulu. Po tome se razlikuju od upalnih (Th1) i pomoćničkih (Th2) T stanica koje na svojoj površini nose CD4 molekulu (57).

Limfociti T posjeduju receptore koji mogu prepoznati peptidne fragmente intracelularnih patogena transportiranih na staničnu površinu pomoću glikoproteina glavnog sustava tkivne snošljivosti (major histocompatibility complex - MHC). Funkcionalno različiti limfociti T prepoznaju različite razrede MHC molekula. Molekule razreda I MHC nose viralne peptide, a prepoznaju ih citotoksični limfociti T koji kontroliraju infekciju ubijajući inficirane stanice (216). Limfociti T ostaju nakon toga neinficirani i mogu nastaviti uništavati sljedeće inficirane stanice. CD8<sup>+</sup> limfociti T mogu prepoznati prerađene IE virusne antigene pa mogu uništiti inficiranu stanicu prije završetka virusnog ciklusa što utječe na produkciju novih virusa. Molekule razreda II MHC bivaju prepoznate od upalnih (Th1) ili pomoćničkih (Th2) limfocita T koji aktiviraju makrofage, odnosno limfocite B u obrani od infekcija. Preko molekula razreda II MHC, CD4<sup>+</sup> limfociti T mogu prepoznati izvanstanične antigene (1).

Da bi se neimune CD8<sup>+</sup> stanice aktivirale u citotoksične stanice, potrebne su antigen prezentirajuće stanice kao što su npr. dendritične stanice. Te stanice mogu direktno stimulirati CD8<sup>+</sup> stanice da sintetiziraju interleukin 2 (IL-2) koji utječe na njihovu proliferaciju i diferencijaciju. U slučaju nekih virusa za citotoksični odgovor potrebna je uz CD8<sup>+</sup> stanice i prisutnost CD4<sup>+</sup> stanica.

Virusi pokušavaju izbjeći imuni odgovor domaćina na različite načine. Oni posjeduju vlastite gene kojima ometaju imunološki nadzor, odnosno izbjegavaju prezentaciju pomoću MHC i ostaju neprepoznati imunološkom sustavu domaćina. MHC je poligenski (postoje različiti geni koji kodiraju proteine i dovode do specifičnog vezanja na peptide) i polimorfan (zbog multiplih alela za svaki gen), a MHC geni su najpolimorfija poznata grupa gena (84).

U imunološkom odgovoru prema virusnim infekcijama važna je i uloga citokina, polipeptida koje luče stanice uključene u imunološki odgovor, a čiji učinak utječe na brojne druge stanice uključene u taj odgovor (186). Učinak citokina različit je ovisno o ciljnoj stanici na koju djeluju (68,69). CD8<sup>+</sup> limfociti T luče IFN $\gamma$ , koji može zaustaviti virusnu replikaciju direktno, ali i potaknuti

povećanu ekspresiju molekula MHC razreda I i molekula koje prenose peptide u inficiranim stanicama, povećavajući time vjerovatnost da inficirane stanice postanu prepoznatljive za citotoksične limfocite T.  $\text{TNF}\alpha$  također djeluje raznim sinergističkim mehanizmima u smislu olakšanja citotoksičnog učinka (144). Uz citokine koji djeluju na citokinske receptore na ciljnim stanicama i citotoksini oslobođeni iz  $\text{CD8}^+$  stanica upotpunjuju funkciju citotoksičnih limfocita T. U citotoksine ubrajamo Fas ligand koji se veže na Fas receptor na ciljnoj stanici i perforin, protein koji stvara porcije u membrani ciljnih stanica (84).

Citotoksični limfociti T mogu dakle, u borbi protiv virusne infekcije djelovati na dva načina: prepoznavanjem i liziranjem virusom inficiranih stanica ili sekrecijom citokina kao što su  $\text{TNF}\alpha$  i  $\text{IFN}\gamma$ . Neke su studije pokazale da je za borbu protiv necitopatogenih virusa neophodan citotoksičan učinak limfocita T, dok se infekcije citopatogenim virusima mogu kontrolirati i neutralizirajućim protutijelima i sekrecijom citokina u odsutnosti T citotoksičnog odgovora (89).

Posljednje su studije na hepatitis B virusu, necitopatogenom virusu postavile nove dileme, budući je dosad bilo uvriježeno mišljenje da učinak citotoksičnih limfocita uništava virusom inficirane stanice dovodeći do njihove smrti. Guidotti i Chisari smatraju da je to nemoguće, jer broj potencijalno inficiranih hepatocita obilato nadmašuje broj citotoksičnih limfocita koji se mogu suprostaviti infekciji (32,64). Osim toga citotoksični nadzor doveo bi do masivnog uništenja jetrenog parenhima što se u većini akutnih jetrenih infekcija ne događa (63,66). Dokazano je da se antivirusni učinak citotoksičnih limfocita može umanjiti protutijelima protiv  $\text{IFN}\gamma$  i  $\text{TNF}\alpha$  (65, 67, 204). To ukazuje da inficirane stanice mogu biti aktivni sudionici u antivirusnoj obrana odgovarajući na citokinske signale i aktivirajući specifične unutarstanične mehanizme koji mogu prekinuti životni ciklus virusa. Tome u prilog govore i izolirani opisi kliničkih slučajeva u kojima se kronična infekcija virusom B izgubila u vrijeme infekcije virusom A ili C (39, 179). Navedeno ukazuje da bismo u objašnjenju patogeneze virusnih hepatitisa trebali uzimati u obzir dva kooperativna mehanizma, citotoksični, koji prepoznaje i uništava mali dio inficiranih hepatocita i citokinski, koji direktno ili indirektno (preko aktivacije makrofaga) spašava

najveći dio inficiranih hepatocita intracelularnom aktivacijom opisanih mehanizama.

## 2.5. IMUNOLOŠKI NADZOR CMV INFEKCIJE

Imunološki sustav domaćina glavni je čimbenik u obrani od CMV infekcije. Iako prirodena imunost utječe na osjetljivost prema CMV (180), NK stanice, polimorfonuklearni limfociti i monociti/makrofagi, bez specifičnog imunog odgovora nisu dovoljni za uspješnu kontrolu infekcije (195, 211). CMV infekcija dovodi kod imunokompetentnog domaćina do stvaranja specifičnih protuvirusnih protutijela i aktivacije specifičnih limfocita T. Perzistentna virusna infekcija je kronična produktivna infekcija, koja se zadržava u određenim vrstama stanica domaćina, unatoč imunološkom nadzoru (141). Osnovni mehanizmi perzistencije u CMV infekciji su ometanje imunološkog prepoznavanja i imunosupresivno djelovanje CMV. Ometanje imunološkog prepoznavanja virusnih antigena povezano je s molekulama razreda I MHC, obzirom na ulogu  $CD8^+$  limfocita T u nadzoru infekcije. Pokazano je da postoje virusni mehanizmi koji ometaju prezentaciju antigena (40), kao i da samo pet sati nakon početka infekcije dolazi do gotovo potpunog nestajanja MHC molekula razreda I sa stanične površine (100). Otkrićem CMV proteina, koji se ponaša kao receptor za Fc fragment imunoglobulina G, u stanicama inficiranim s HCMV i MCMV (53, 201) pronađena je još jedna mogućnost ometanja imunološkog prepoznavanja. Prisutnost proteina na površini inficiranih stanica i ovojnicama virusa, omogućava maskiranje stanica vezanjem IgG i onemogućavanjem lize posredovane protutijelima (191). Imunosupresivno djelovanje CMV je posljedica djelovanja virusa na sazrijevanje stanica u primarnim limfatičkim organima (129, 158) ili inhibicije zrelih stanica (81).

Iako imunološki sustav djelotvorno nadzire produktivnu infekciju u organima i tkivima, ne može potpuno ukloniti virusni genom pa se uspostavlja

trajna latentna infekcija. Latencija je potpuni izostanak produktivne infekcije u tkivima uz mogućnost reaktivacije latentno prisutnog virusnog genoma (193). Klinička iskustva s imunosuprimiranim bolesnicima (AIDS, imunosupresivni lijekovi), kao i brojna istraživanja pokazala su da se u uvjetima nedostatnosti imunološkog sustava javljaju rekurentne infekcije. Unatoč određenoj ulozi specifičnih protutijela najvažniju ulogu u nadzoru CMV infekcije i uspostavi latencije imaju stanični imunološki mehanizmi (192). To najbolje potvrđuju bolesnici s nedostatkom stanične imunosti kod kojih i uz normalnu razinu specifičnih protutijela dolazi do klinički manifestne CMV bolesti (56).

### **2.5.1. Uloga limfocita T u nadzoru CMV infekcije**

Glavnu ulogu u nadzoru CMV infekcije imaju limfociti T i to prvenstveno CD8<sup>+</sup> subpopulacija s direktnim citolitičkim potencijalom i sposobnošću lučenja citokina, što je razumljivo, jer se virusni antigeni prerađuju citosolnim putem i prezentiraju preko molekula razreda I MHC (146, 165, 166). Eksperimentalna istraživanja su pokazala da CD8<sup>+</sup> limfociti T nadziru CMV infekciju i da je taj učinak neovisan o pomoći CD4<sup>+</sup> limfocita T (101, 166). To je otkriće dovelo i do kliničkog pokušaja da se bolesnicima u postransplantacijskom periodu pasivno prenesu HCMV specifični CD8<sup>+</sup> limfociti T. Rezultat je bio uspješan i doveo do smanjenja klinički teške CMV infekcije nakon transplantacije (170). U slučajevima kada je životinjama eksperimentalno odstranjena CD8<sup>+</sup> limfocitna T subpopulacija, mehanizmi ovisni o CD4<sup>+</sup> limfocitima T u potpunosti su kontrolirali virusnu infekciju (86). Zanimljivo je da nadzor infekcije u žlijezdama slinovnicama nije ovisan o CD8<sup>+</sup> limfocitima T, već je potpuno pod nadzorom CD4<sup>+</sup> ovisnih mehanizama. Pri CD4<sup>+</sup> limfocitnoj T depleciji dolazi u ovom organu do uspostave kronične perzistentne infekcije unatoč prisutnosti CD8<sup>+</sup> stanica u tkivu (85). Neutralizacijom IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$  protutijelima ustanovljeno je da CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfociti T ostvaruju učinke posredstvom citokina (114, 148).

Stanični mehanizmi imunološkog nadzora neophodni su za uspostavu i održavanje latencije (153).

### **2.5.2. Uloga stanica NK u nadzoru CMV infekcije**

Stanice NK značajno doprinose imunom odgovoru domaćina iako su same nedovoljne za potpunu eliminaciju CMV (25). Osnovni način djelovanja stanica NK je ubijanje ciljnih stanica. Citotoksični učinak je posljedica neposrednog prepoznavanja receptora na stanici ili je posredovan protutijelima (antibody dependent cell cytotoxicity - ADCC) (140, 147, 174). Stanice NK su i izvor citokina  $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$  koji imaju protuvirusno djelovanje. Najaktivnije su u ranom postinfekcijskom tijeku, između trećeg i petog postinfekcijskog dana, nakon čega im se aktivnost smanjuje, a povećava se aktivnost citotoksičnih limfocita T (10, 121, 197, 211). Adoptivnim prijenosom stanica NK u miševu dojenačke dobi kao i u ozračene inficirane odrasle miševu može se smanjiti smrtnost životinja ograničavanjem MCMV replikacije (23). U nadzoru rekurentnog virusa stanice NK imaju ograničenu ulogu u svim organima osim slezene, gdje mogu samostalno kontrolirati virus (153).

### **2.5.3. Uloga citokina u nadzoru CMV infekcije**

Citokini pridonose uklanjanju virusa nakon što se lokalno oslobode iz limfocita T. Mehanizam je dvojak, izravni protuvirusni učinak, kao i mobilizacija specifičnih i nespecifičnih imunih mehanizama. U obrani od virusnih infekcija značajniju ulogu zauzimaju citokini koji se luče po Th1 obrascu kao što su  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  i IL-2 (70, 93, 144). Pri CMV infekciji  $IFN\gamma$  djeluje neposredno na ciklus umnožavanja virusa, a  $TNF\alpha$  pojačava spomenuti učinak (113).

Imunoregulacijski učinci IFN $\gamma$  su posljedica djelovanja ovog citokina na sazrijevanje staničnih efektorskih mehanizama u nadzoru virusne infekcije (NK stanica, CD8<sup>+</sup> limfocita T, CD4<sup>+</sup> limfocita T i drugih) te boljeg imunološkog prepoznavanje djelovanjem na postupak prerade virusnih antigena i pojačanje ekspresije MHC molekula razreda I i II (121). Pokazano je osim toga da IFN $\gamma$  ima ključnu ulogu u nadzoru rekurentnog virusa (153).

#### **2.5.4. Uloga protutijela u nadzoru CMV infekcije**

Uloga protutijela u obrani od CMV infekcije dokazana je u nekoliko studija (107, 160). Pokazano je da protutijela nisu esencijalna u primarnoj CMV infekciji, ali da ograničavaju rekurentnu virusnu infekciju (87). Transplacentarno prenesena HCMV protutijela u premturane djece koja su infekciju stekla transfuzijom pokazala su protektivnu ulogu, kao i pasivna imunizacija imunoglobulinima u primalaca alograftova.

### **2.6. MIŠJI MODEL CMV INFEKCIJE**

MCMV je kao i HCMV pripadnik  $\beta$ -herpesviridae porodice i visoko je specifičan za vrstu. Kao i kod ostalih herpesvirusa, nakon primarne infekcije, slijedi kronična perzistentna infekcija ili latentna infekcija iz koje se može razviti simptomatska reaktivacija u slučaju poremećenog imunološkog nadzora (35).

MCMV ima slične biološke karakteristike kao i HCMV pa se stoga, infekcija na mišjem modelu pokazala vrlo korisnom pri proučavanju bolesti od kojih oboljevaju ljudi, a koje su povezane s ovom klasom virusa. U prednosti mišjeg modela možemo ubrojiti olakšan eksperimentalni pristup, mogućnost manipulacije mišjim genima i korištenja virusnih mutanti. U miševa inficiranih

CMV izolatom iz žlijezdi slinovnica hepatitis je pretpostavljen kao primarni uzrok smrti. Pokazano je da intravenska ili intraperitonealna inokulacija virusa dovodi do znatno izraženije bolesti, no inokulacija istom dozom subkutanom ili intranazalnim putem. Težina bolesti i mortalitet životinja pokazali su se ovisni o mnogobrojnim čimbenicima kao što su mjesto inokulacije, doza virusa, stupanj virusne atenuacije, imunokompetentnost, genetska osnova (28, 62, 142, 145, 178, 192).

Ishod CMV infekcije u životinja prvenstveno je povezan sa sposobnošću da se uspostavi odgovarajući stanični imuni odgovor. To se odnosi na kontrolu primarne infekcije, ali i na sprječavanje virusne reaktivacije u latentno inficiranih životinja (154, 167). Osim navedenog, kvalitativne i kvantitativne razlike u upalnim staničnim infiltratima jetre ovisne su o osjetljivosti, odnosno rezistentnosti različitih sojeva životinja inficiranih s MCMV (124, 178). Virusna replikacija je pojačana u miševa s proteinskim deficitom (200) te u NK deficitentnih životinja inficiranih s MCMV, što ukazuje na ulogu upalnog odgovora u obrani od infekcije. C57B1/6 miševi depletirani stanice NK *in vivo* razvijaju težak hepatitis s visokim letalitetom (24, 177).

Uočeno je da se virus u akutnoj letalnoj infekciji rano pojavljuje u jetri i gušterači i dovodi do biokemijskih abnormalnosti (178). U BALB/c životinja je pokazano da upalni eksudati u jetri zahvaćaju najvećim dijelom CD8<sup>+</sup> stanice i perzistiraju najmanje 32 tjedna nakon što su antigen pozitivne stanice nestale (142). U BALB/c je životinja dokazana virusna replikacija u slezeni (173), te atrofija koštane srži i timusa (55, 161), kao i da CD8<sup>+</sup> stanice mogu kontrolirati replikaciju u jetri, plućima, slezeni, nadbubrežnim žlijezdama i očima (164, 142).



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Mediji

1. Kompletan RPMI 1640 medij

2mM L-glutamin,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-merkaptoetanol, 10 mM Hepes (pH 7,2),  $1 \times 10^5$  U/l Penicilin, 0,1 g/l Streptomycin sulfat, 0,05g/l Gentamycin sulfat, 5-10% fetalnog telećeg seruma (FCS), RPMI 1640 medij

2. Kompletan MEM

2mM L-Glutamin,  $1 \times 10^5$  U/L Penicilin, 0,1g/l Streptomicin sulfat, 0,05 g/l Gentamycin sulfat, 10% FCS, DMEM

3. Medij za smrzavanje stanica

70% RPMI 1640 medij, 20% FCS, 10% Dimetilsulfoksid (DMSO)

4. Medij za FACS

10 mM EDTA, 20mM Hepes (pH 7,2), 2% FCS , 0,1% Natrij azid ( $\text{NaN}_3$ ), PBS

5. Medij s metilcelulozom

2,2% metilceluloza, 10% FCS

### 3.1.2. Pufferi

1. PBS (fosfatima pufferirana fiziološka otopina) pH 7,2

140 mM Natrij klorid (NaCl), 2,7 mM Kalij klorid (KCl), 7,5 mM Natrij hidrogenfosfat-2hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), 1,5 mM Kalij dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,7 mM Kalcij klorid ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,7mM Magnezij klorid-6-hidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ).

2. Bikarbonatni puffer, pH 9,6

0,5 mM Natrij karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 45 mM Natrij hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )

3. Citratni puffer, pH 5,0

50 mM Limunska kiselina ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ ), 50 mM Natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )

### 3.1.3. Kemikalije

Amonij sulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Kemika

Blokirajući reagens za ELISA, Boehringer Mannheim

Dimetilsulfoksid (DMSO), Merck

Etilendiamintetraacetat- $\text{Na}_2$ -sol (EDTA), Merck

Fetalni teleći serum (FCS), Gibco

Gentamicin sulfat, Serva

L-Glutamin, Merck

Hepes, Serva

Kalcij-klorid,  $\text{CaCl}_2$ , Kemika

Kalcij ferocijanid,  $\text{KFe}(\text{CN})_4$ , Sigma

Kalij ferocijanid,  $\text{KFe}(\text{CN})_3$ , Sigma

Limunska kiselina,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ , Kemika

Magnezij klorid,  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , Merck

Merkaptoetanol, Merck  
MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid, Sigma  
Natrij azid,  $\text{Na N}_3$ , Difco  
Natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
Di-natrij-hidrogenfosfat-12-hidrat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
Natrij hidrogenkarbonat,  $\text{NaHCO}_3$ , Kemika  
Natrij hidroksid,  $\text{NaOH}$ , Kemika  
Natrij klorid,  $\text{NaCl}$ , Kemika  
Nondient P-40 (NP-40), Sigma  
O-fenildiamin (OPD), Sigma  
Penicilin, Grunenthal, Stolberg  
Propidij jodid, Serva  
Streptomicin sulfat, Merck  
Sukroza, Merck  
Tripansko modriilo, Serva  
Tris-hidroksimetil-aminometan, Boehringer Mannheim  
Tween-20 (polioksietilen-sorbitan monolaureat), Sigma  
Vodikov peroksid (30%),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Kemika

#### **3.1.4. Plastično laboratorijsko posuđe**

Petrijeve posude za kulturu stanica (f 90 i 145 mm), Greiner  
Ploče za kulturu stanica s 24 rupice, Greiner  
Ploče za kulturu stanica s 48 rupica, Costar  
Bočice za kulturu stanica od 50 i 250 ml  
Kontejneri od 1,8 ml (Eppendorf)  
Epruvete za protočni citometar, Falcon Becton Dickinson

### 3.1.5. Reagensije za protočnu citometriju

1. Štakorski anti mišji Lyt-5 (B-220), klon RA3-6B2, izotip IgG-2S, konjugiran fikoeritinom (PE), Code RM 2604-3, Medac
2. Štakorski anti mišji Lyt-2 (CD8) (IgG-2a), klon YTS 169.4.2. FITC konjugiran, Code RM 2201-3, Medac
3. Anti mišji L3T4 (CD4), konjugiran fikoeritinom (PE), kataloški broj 1447, Becton Dickinson
4. Anti mišji Lyt-1 (CD5), biotinom konjugiran, LOT MO925
5. Streptavidin FITC, kataloški broj 349011, Becton Dickinson

### 3.1.6. Laboratorijske životinje

U pokusima su korišteni miševi soja BALB/c ( $H^{2d}$ ) starosti između četiri i osam tjedana, uzgojeni u vlastitoj koloniji vivarija Medicinskog fakulteta u Rijeci, u umjetno stvorenim uvjetima i izolirani od vanjske okoline.

### 3.1.7. Virusi

U eksperimentima je korišten MCMV soj Smith, American Type Culture Collection (VR-194, RockWille, MD). Virus smo proizvodili na kulturi mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF) i pročišćavali ga sedimentacijom kroz sloj 15% sukroze ultracentrifugiranjem (25000x, 90 min). Virus je filtriran i raspodijeljen po 25 $\mu$ l u Eppendorf epruvete te do upotrebe čuvan na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Izolat virusa iz žlijezda slinovnica (salivary gland virus /SGV/) dobiven je nakon tri MCMV "pasaže" u četiri tjedna starih ženki miša. Prva "pasaža" učinjena je sa  $2 \times 10^5$  čistina na sloju fibroblasta (plaques forming units/PFU/) injiciranih u lijevo stražnje stopalo životinja. U prvom i drugom tjednu nakon infekcije životinje su primile  $\alpha\text{CD4}^+$ . Žrtvovane su 14. dana nakon infekcije. Druga "pasaža" učinjena je s  $2 \times 10^5$  SGV homogenata injiciranog intraperitonealno.  $\text{CD4}^+$  limfocitna T deplecija učinjena je samo jednom i to u drugom tjednu nakon infekcije, a životinje su žrtvovane 14. dana nakon infekcije. U trećoj pasaži  $5 \times 10^4$  PFU SGV-a injicirano je intraperitonealno, a  $\text{CD4}^+$  limfocitna T deplecija nije učinjena. Životinje su žrtvovane 11. dana nakon infekcije. SGV homogeniziran je u 1 ml MEM-a i pohranjen na  $-70^\circ\text{C}$ .

Homogenati žlijezda slinovnica pripremljeni su od neinficiranih životinja i upotrebljeni da bi se inokulirale kontrolne životinje u svim eksperimentima.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Deplecija limfocitnih T subpopulacija

*In vivo* deplecija  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  limfocitnih T subpopulacija učinjena je intraperitonealnim injiciranjem 1 mg monoklonalnih protutijela specifičnih za  $\text{CD4}$  (YTS 191.1) i/ili  $\text{CD8}$  (YTS 169.4) biljeg (33). Prva deplecija učinjena je protulimfocitnim protutijelima sat vremena nakon infekcije, a sljedeće svakih šest dana. Učinkovitost deplecije limfocita T testirana je protočnom citometrijskom analizom za  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  stanice, a u pravilu je bila veća od 95%. Analiza stanica slezene učinjena je pomoću FITC (fluorescein izotiocijanat) ili PE (phycoerithrin) konjugiranih protutijela (Becton Dickinson, cat.# 1333 i 1447).

### **3.2.2. Priprema suspenzije splenocita**

Nakon što su žrtvovani cervikalnom dislokacijom, miševima su sterilno izvađene slezene. Čahura slezene razderana je pomoću dvije sterilne igle, a stanice su isprane pomoću 5 ml hladnog RPMI obogaćenog s 5% FCS-a kroz sterilnu plastičnu mrežicu. Eritrociti su razarani inkubiranjem suspenzije u 0,85% otopini amonijeva klorida ili Geyevoj otopini tijekom 10 minuta. Potom je suspenzija isprana sa po 5 ml hladnog medija (3 x 5 min na 400 x g). Stanice su konačno resuspendirane u kompletnom RPMI s 5% FCS, izbrojene te podešene na potreban broj. Vijabilnost je određena u 0,5% otopini tripanskog modrila.

### **3.2.3. Priprema mišjih embrionalnih fibroblasta**

Embriji su sterilno vađeni iz gravidnih ženki 17. ili 18. dana graviditeta. Nakon što je očišćeno od sadržaja trbušne šupljine, tkivo je usitnjeno i isprano PBS-om. Tkivo je stavljano u Petrijeve ploče s tripsinskim medijem iz kojih je, nakon daljnjeg usitnjavanja, prebacivano izravno u Erlenmayerove tikvicu. U nju je stavljen sterilni magnet za elektromagnetsku mješalicu i 10 ml tripsinskog medija prethodno zagrijanog na 37°C. Tkivo je inkubirano na 37°C kroz 30 minuta uz stalno miješanje na elektromagnetskoj mješalici. Nakon toga je pridodano još 10 ml tripsinskog medija i nastavljena inkubacija uz stalno miješanje. Čitav postupak ponovljen je još jednom, do konačnog volumena tripsinskog medija od 30 ml i inkubacije od 90 min. Nakon tako napravljene enzimske digestije tkiva mišjih embrija, pipetom je sakupljen supernatant iz Erlenmayerove tikvice i propušten kroz plastičnu mrežicu, zatim prebačen u epruvetu i centrifugiran na 200 x g tijekom pet do deset minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen vakum aspiracijom, a talog resuspendiran u 10 ml 3% MEM-a te suspenzija propuštena još jednom kroz plastičnu mrežicu. Stanice su izbrojene, a vijabilnost je provjerena uz pomoć tripanskog modrila. Preneseno je  $5 \times 10^7$  stanica mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF) na svaku

Roux bocu i dodano 70 do 100 ml 3% MEM-a (bez merkaptoetanol). Boca je inkubirana vodoravno položena idućih 3 do 5 dana na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. Nakon prvog dana inkubacije odličen je sav medij iz boce, čime smo se oslobodili detritusa i neadherentnih stanica, i zamijenjen je novim. Kada je čitavo dno boce prekriveno stanicama MEF-a (3 do 5 dana inkubacije) one su ekspanzirane u tri boce i dalje jednako inkubirane. Nakon trećeg propuštanja dobivene su željene stanice koje smo prenijeli na ploče s 48 rupica. U svaku rupicu prenijeli smo po  $5 \times 10^4$  MEF-a u volumenu od 0,5 ml medija. Nakon 24 sata dobili smo konfluentan sloj stanica koji nam je poslužio kao podloga za određivanje titra virusa u homogenatu organa.

#### **3.2.4. Određivanje virusa u organima**

Titir virusa u organima određen je metodom brojenja virusnih čistina (plakova) nastalih citopatogenim učinkom virusa na podlozi prekrivenoj MEF-om. Organi (jetra, pluća, slezena, gušterača, timus, mozak, crijevo, srčani mišić) su propušteni kroz metalne mrežice u 2 ml hladnog MEM-a s 3% FCS. Dobiveni homogenati su resuspendirani u Eppendorf epruvetama s po 1 ml hladnog medija u početnom razrjeđenju od 10 puta i zatim razrjeđivani tako da je svako sljedeće razrjeđenje bilo deset puta veće od prethodnog. Nakon titracije razrijeđeni homogenat je prebačen na pripremljenu ploču s mišjim fibroblastima. Neposredno prije ukapavanja razrijeđenog homogenata odstranjen je višak medija u pločama tako da je u svakoj rupici ostalo oko 150 μl medija. Nakon toga je u svaku rupicu prebačeno po 100 μl prethodno razrijeđenog homogenata (10, 100 i 1000 puta) tako da je rupica s najmanjim razrjeđenjem sadržavala 1/100 ukupnog homogenata. Prilikom razrjeđivanja virusa mijenjani su nastavci, kako bi se izbjeglo dobivanje lažno visokog titra virusa.

Nakon prenošenja razrjeđenja homogenata organa na ploče s MEF-om, one su inkubirane pola sata na 37°C, uz 5% CO<sub>2</sub>, a potom centrifugirane 30 minuta na 2100 okretaja (800xg) čime je pojačana učinkovitost infekcije

fibroblasta, odnosno povećana osjetljivost testa za 10-20 puta (172). Po centrifugiranju ploče su još jednom stavljane u inkubator, a nakon jednoga sata dodan je viskozni metilcelulozni medij (1 ml po rupici) radi onemogućavanja vertikalnog širenja infekcije u kulturi. Plakovi virusa nastali su radijalnim širenjem virusa iz inficirane stanice, a brojeni su nakon tri do pet dana inkubacije na 37°C uz 5% ugljični dioksid. Broj virusnih plakova nastalih u kulturi pomnožen je s razrjeđenjem homogenata organa, a rezultat je izražen kao broj virusnih čistina (PFU) po organu.

### 3.2.5. Imunosupresija i prijenos imunih stanica (adoptivni T prijenos)

Ispitivanje protuvirusnog učinka limfocita učinjeno je uz pomoć adoptivnog prijenosa limfocita T u singenične primaoce ozračene jednokratno subletalnom dozom  $\gamma$  zraka (6,5 Gy). Gama ozračivanje čitavog tijela eksperimentalnih miševa uzrokovalo je imunoneдостatnost primatelja stanica čime smo ukinuli njihov udio u specifičnom imunom odgovoru tijekom trajanja eksperimenta. Životinjama preneseni limfociti T su pročišćeni iz suspenzije splenocita propuštanjem kroz kolone najlonske vune sa čistoćom većom od 95%. Limfociti T su u pojedinim grupama depletirani *in vivo* monoklonskim protutijelima na CD4 (YTS 191.1.2) i/ili CD8 (YTS 169.4.2) molekulu (33).

Pri profilaktičkom adoptivnom prijenosu primaoce je simultano s infekcijom u stražnju šapicu ( $2 \times 10^5$  PFU MCMV iz kulture tkiva) injicirano u repnu venu  $10^5$  imunih limfocita T.

Pri terapijskom adoptivnom prijenosu  $5 \times 10^6$  imunih limfocita T je preneseno u primaoce s diseminiranom infekcijom sedmi dan nakon infekcije s  $2 \times 10^5$  PFU MCMV.



### **3.2.6. Dokazivanje limfocitnih podvrsta protočnom citometrijom**

Postupak pripremanja stanica za protočnu citometriju izvođen je na ledu u Eppendorf epruvetama od 1,5 ml. Suspenzija stanica dobivena je iz slezene. Eritrociti su razoreni s amonijevim kloridom, a tripansko modriilo je korišteno za određivanje vijabilnosti stanica nakon odstranjenja eritrocita. Stanice su dva puta isprane u hladnome FACS mediju i raspodijeljene u Eppendorf epruvete ( $10^6$  stanica po uzorku). Zatim je suspenzija stanica centrifugirana na 4000 okretaja tri minute u mini centrifugi (Eppendorf) i na talog su stavljena protutijela prema preporuci proizvođača. Poslije inkubacije na ledu ( $0^{\circ}\text{C}$ ) u trajanju od trideset minuta stanice su isprane dva puta s 1 ml FACS medija, prebačene u epruvete za protočnu citometriju i analizirane. Sve inkubacije izvedene su u ukupnom volumenu od 0,2 ml, a sva ispiranja s 1 ml hladnog FACS medija.

Stanice su analizirane s obzirom na ekspresiju CD4, CD8, CD5, B220 i TCR $\alpha\beta$  biljege.

Fluorescencija je analizirana na Becton Dickinson protočnom citometru, a podaci su analizirani uz pomoć WinMDI (verzija 2.4) softvera.

### **3.2.7. Vadenje krvi i pohranjivanje seruma**

Krv je životinjama vađena retroorbitalnom punkcijom u eterskoj narkozi ili je uzimana iz repne vene. Nakon toga je inkubirana na  $37^{\circ}\text{C}$  najmanje 60 minuta. Serumi su dobiveni odvajanjem krvnih stanica i fibrinogena u prirodnom procesu zgrušavanja te centrifugiranjem 10 minuta na 3000 okretaja. Tako pripremljeni serumi su zamrznuti i čuvani do uporabe.

### 3.2.8. Određivanje biokemijskih parametara u serumu

Vrijednosti biokemijskih parametara u mišjim serumima određivane su višekanalnim automatskim analizatorom Technicon RA 1000. Pojedini parametri su određivani tijekom trajanja eksperimenata za grupirane serume tri do četiri životinje ili po žrtvovanju životinja za svaku posebno.

Vrijednosti ALT i AST određivane su optimiranom UV metodom na 30°C (Trace, Melbourne, Australia).

Vrijednosti LDH određivane su piruvat optimiranom metodom na 30°C (Chronolab, Switzerland).

Vrijednosti glukoze određivane su glukoza oksidaza metodom (GOD-PAP) (Chronolab, Switzerland).

Vrijednosti ALP, određivane su po IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) s paranitrofenilen fosfatom (pnPP) uz AMP pufer na 30°C (reagensi učinjeni u vlastitom laboratoriju KBC Rijeka).

Vrijednosti GGT određivane su Szasz metodom na 30°C (Trace, Melbourne, Australia).

Vrijednosti kreatinina određivane su Jaffeovom kinetičkom metodom (reagens učinjen u vlastitom laboratoriju KBC Rijeka).

Vrijednosti ureje određivane su ureaza-glukoza dehidrogenaza metodom (Chronolab, Switzerland).

### 3.2.9 Testiranje staničnog imunološkog odgovora reakcijom kasnog tipa preosjetljivosti

Lokalno, na obrijanu kožu abdomena, životinjama je dan prije injiciranja SGV virusa stavljeno 25µl 0,5% dinitrofluorbenzena (DNFB) ili 25µl otopine za razrjeđivanje (aceton : maslinovo ulje; 4:1). Nakon injiciranja  $2,5 \times 10^4$  PFU,  $10^5$

PFU ili kontrolnog homogenata žlijezde slinovnice miševi su podvrgnuti drugi puta dinitrofluorbenzenu ili otopini za razrjeđivanje. Tri dana nakon infekcije svim je životinjama aplicirano 10 $\mu$ l 0,2% DNFB na svaku stranu oba uha. 24 sata kasnije otok uške mjeren je mikrometrom. Prosječno otjecanje uške izračunato je oduzimanjem prosječne vrijednosti debljine uške prije lokalnog izlaganja otopini od prosječne vrijednosti izmjerene 24 sati nakon izlaganja kod iste životinje.

### 3.2.10. Određivanje mišjeg IFN $\gamma$ u serumu

Mišji interferon gama (mIFN $\gamma$ ) određivan je kvantitativno ELISA testom (Endogen, USA). Postupak je započet stavljanjem 50 $\mu$ l reagensa u 96 rupica na ploči. Nakon toga dodano je 50 $\mu$ l razrijeđenog standarda u rupice i pokrivena ploča inkubirana dva sata pri sobnoj temperaturi 20-25 $^{\circ}$ C. Zatim je ploča isprana tri puta i posušena. Nakon toga je razrijeđen streptavidin HRP koncentrat u puferu za razrjeđivanje i dodano 100 $\mu$ l takve otopine u svaku rupicu. Pokrivena ploča inkubirana je jedan sat na 4 $^{\circ}$ C, a nakon toga ponovno oprana, potopljena u vodi i posušena. U svaku je rupicu potom dodano 100 $\mu$ l otopine TMB supstrata. Zatim je ploča ostavljena na sobnoj temperaturi u mraku 30 minuta. Reakcija je prekinuta dodavanjem 100 $\mu$ l Stop otopine u svaku rupicu. Nakon toga je ploča očitana na spektrofotometru (valne duljine od 450 do 550 nm) najkasnije 30 minuta nakon prestanka reakcije i izračunati su rezultati.

Test je detektirao < 15 pg/ml mišjeg IFN $\gamma$ .

### 3.2.11. Određivanje mišjeg TNF $\alpha$ u serumu

Mišji TNF $\alpha$  (mTNF $\alpha$ ) određivan je kvantitativno *in vitro* ELISA testom (Endogen, USA).

Određivanje se sastojalo od postupaka koji su opisani u prethodnom odjeljku. Test je specifičan za određivanje prirodnog i rekombinantnog mišjeg TNF $\alpha$ . Nema križne reakcije s mišjim IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), IFN $\gamma$  ili humanim TNF $\alpha$ .

Test je detektirao < 10pg/ml mišjeg TNF $\alpha$ .

### 3.2.12. Patohistologija

Životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom nakon čega su im izvađeni organi i stavljeni u 10% puferirani formalin ili 4% paraformaldehid u fosfatima puferiranoj soli (Phosphate buffered saline - PBS) s pH 7,4. U učinjenim eksperimentima dvije do tri životinje žrtvovane su u svakoj grupi svakih nekoliko dana ili na kraju eksperimenta, ovisno o predviđenom protokolu. U eksperimentima sa SGV životinje su žrtvovane od drugog do petog dana nakon infekcije i analizirani su jetra, pluća, slezena, gušterača, crijevo, srce, skeletni mišić, mozak i žlijezde slinovnice.

Rezovi bojeni hematoksilinom i eozinom analizirani su pod svjetlosnim mikroskopom.

### 3.2.13. Imunohistokemijske metode

Parafinski rezovi su deparafinizirani i pripremljeni za imunohistokemijsku analizu. Kao primarna protutijela upotrebljavana su monoklonska protutijela

*Chroma 101*, pripremljena kao što je ranije prikazano (95). Ova protutijela reagiraju s pp89 IE proteinom što rezultira bojenjem jezgri inficiranih stanica. Sekundarna protutijela bila su biotinizirana kozja antimišja Fab (Sigma # B0529). Nakon deparafiniziranja kroz ksilol i postupne rehidracije alkoholom (100% prema 50% etanol) histološki rezovi su inkubirani u tripsinu (0,01%) kroz 15 minuta na 37°C. Iza blokiranja aktivnosti peroksidaze (5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50% metanol, 50% PBS), rezovi su inkubirani na 0,01% NP-40 i blokirani sa normalnim serumom kunića (1:100) u 1% goveđem serumskom albuminu (BSA). Rezovi su zatim inkubirani s *chroma 101* (1:500, 1 sat na 37°C) i sekundarnim protutijelom (1:200, 30 minuta). Vizualizaciju specifičnog vezanja protutijela postigli smo sa DAB - niklom (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) koji je pokazivao crnu boju kao pozitivan rezultat. PBS, TBS (0,1 M Tris-HCl, 0,15M Na Cl, pH 7,5) ili voda upotrebljavani su pri ispiranju. Sve su inkubacije činjene na sobnoj temperaturi. Rezovi su kontrabojani hematoksilinom i eozinom.

U pokusima adoptivnog prijenosa jedna je grupa životinja inficirana sa rekombinantnim MCMV koji ima gen za  $\beta$  galaktozidazu (E.Coli - lac z gen). Tkivo je fiksirano u 3% otopini paraformaldehida 1 sat, saturirano u 30% otopini sukroze i brzo smrznuto u tekućem dušiku. Rezovi tkiva su permeabilizirani i bojani u otopini kalij ferocijanida i kalij fericijanida koja sadrži 0,1% X gal. Na kraju rezovi tkiva su kontrabojeni s Meyerovim hematoksilinom.

### 3.2.14. Statističke metode

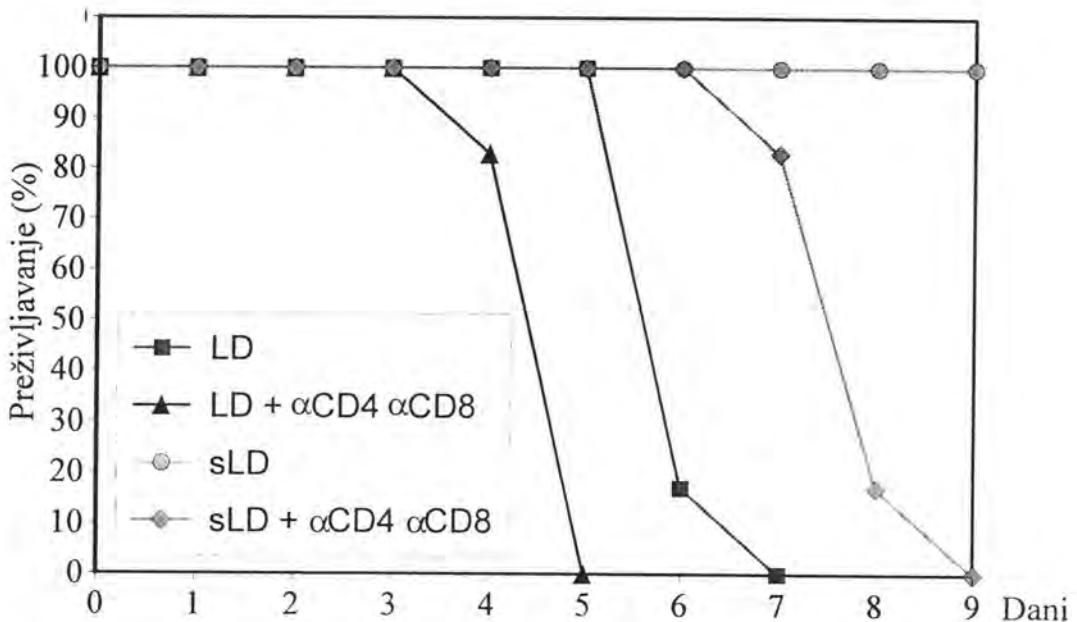
Statistička značajnost razlika vrijednosti titra virusa među grupama je određivana Man Whitney testom. Titrovi virusa bili su statistički značajni ukoliko je  $p < 0,05$ . Osim toga korišten je i Student t test.

## 4. REZULTATI

### 4.1. INFEKCIJA S MCMV IZOLIRANIM IZ ŽLIJEZDA SLINOVNICA (SGV)

#### 4.1.1. Virulentnost SGV ovisna je o dozi virusa i imunološkom statusu domaćina

MCMV izoliran iz žlijezda slinovnica inficiranih miševa pokazuje pojačanu virulentnost u odnosu na virus izoliran iz kulture tkiva. U prvoj smo grupi eksperimenata testirali virulentnost SGV izolata na BALB/c miševima i to u dozama od  $2,5 \times 10^4$  PFU (subletalna doza /sLD/) i  $10^5$  PFU (letalna doza /LD/). Željeli smo ustanoviti u kojoj mjeri virulentnost SGV ovisi o dozi virusa koju injiciramo ispitivanim životinjama, kao i da li, i koliko, imuni status životinja utječe na tijek infekcije.



Slika 1. Preživljavanje BALB/c miševa nakon SGV infekcije

Postotak preživljavanja miševa inficiranih intraperitonealno sa subletalnom (sLD) ili letalnom dozom (LD) SGV ( $2,5 \times 10^4$  ili  $10^5$  PFU), sa ili bez deplecije

*CD4 (mAb 191.1) i CD8 (mAb 169.4) limfocita T. Protulimfocitna protutijela injicirana su životinjama intraperitonealno u vrijeme infekcije.*

Iz slike 1 vidljivo je da su sve životinje inficirane subletalnom dozom preživjele infekciju, dok su životinje inficirane letalnom dozom uginule između petog i sedmog dana nakon infekcije.

Obzirom na značenje limfocita T u obrani od virusnih infekcija depletirali smo  $CD4^+$  i  $CD8^+$  subpopulacije limfocita T letalno i subletalno inficiranim životinjama kako bismo utvrdili ulogu ovih stanica u nadzoru SGV infekcije. Sve depletirane životinje inficirane letalnom dozom uginule su između trećeg i petog dana nakon infekcije. U subletalno inficiranih životinja deplecija limfocitnih T subpopulacija dovela je do toga da su i sve životinje inficirane subletalnom dozom virusa uginule i to između šestog i devetog dana. Promatrajući životinje tijekom trajanja eksperimenta uočili smo da su jedan do dva dana prije ugibanja bile izrazito malaksale, imale nisku tjelesnu temperaturu, nakostriješenu dlaku, tjelesnu težinu reduciranu i do 50% u odnosu na onu prije infekcije, povremena krvarenja iz probavnog trakta, dakle simptomatologiju koja se može vidjeti u životinja s endotoksičnim šokom.

U skladu s ranijim opažanjima drugih autora naši rezultati pokazuju da su osim doze virusa kojom su životinje inficirane, limfociti T ključni čimbenici koji utječu na preživljavanje pri infekciji SGV (165,178).

#### **4.1.2. Hepatitis kao najznačajnija karakteristika SGV infekcije**

Sljedeći pokus je izveden s ciljem da se u životinja sa SGV infekcijom utvrde patohistološke promjene u organima te njihova veza s mortalitetom životinja u određenim grupama. Životinje su inficirane sa subletalnom ( $2,5 \times 10^4$  PFU), odnosno letalnom ( $10^5$  PFU) dozom SGV i žrtvovane drugog, četvrtog ili petog dana nakon infekcije. Patohistološke promjene su promatrane pod

svjetlosnim mikroskopom u hematoksilin i eozin bojenim rezovima tkiva, prethodno fiksiranim u formalinu i uložnim u parafinske kocke. Kako bi se mogao postaviti odnos između tkivnog oštećenja i virusne rasprostranjenosti u organima, rezovi organa promatrani patohistološki podvrgnuti su i imunohistokemijskom ispitivanju koristeći monoklonska protutijela specifična za virus.

Od organa su na ovaj način osim jetre, promatrani i slezena, pluća, gušterača, srce, crijevo, mišići, timus i središnji živčani sustav. Promjene su bile najuočljivije u jetri. U životinja inficiranih letalnom dozom, velika područja nekroze uočena su već drugog dana nakon infekcije. Lezije su do petog dana uznapredovale ka konfluentnoj nekrozi koja je zahvatila čitav organ. Jetra je sadržavala razbacane citomegalične stanice i eozinofilna tjelešca te raštrkana nekrotična žarišta karakterizirana nuklearnim debrisom i promjenama koje odgovaraju akutnoj jetrenoj distrofiji (separacija jetrenih tračaka, odvajanje pojedinačnih stanica, homogena bazofilna citoplazma i piknotične jezgre) i hipoksičnoj nekrozi (velike nakupine stanica s blijedoružičastim citoplazmama). Infiltrati upalnih stanica bili su odsutni u ovim preparatima (slika 2a). Uočene promjene strogo su korelirale s imunohistokemijskim promjenama. Već drugog dana nakon infekcije u preparatima širom jetre mogla su se uočiti razbacana područja pozitivno obojenih jezgri na pp89 IE protein, koja su perzistirala i u rezovima tkiva životinja žrtvovanih četvrtog i petog postinfekcijskog dana (slika 2b).

U životinja inficiranih subletalnom dozom SGV uočene su slične promjene onima u životinja inficiranih letalnom dozom, no ipak različite, obzirom na raširenost i vremensko razdoblje u kojem su uočene. Drugog i četvrtog dana nakon infekcije prevladavala su u jetri razbacana žarišta nekroze i eozinofilna tjelešca s blagom žarišnom hipoksijom ili distrofičnim promjenama. Petog dana nakon infekcije, jetra je djelovala oporavljena s rijetkim žarištima nekroze i blagim upalnim infiltratima (2c). Imunohistokemijska analiza pokazala je sličnost u rasporedu pozitivno obojenih jezgara s onom uočenom u letalno inficiranih životinja drugog i četvrtog dana nakon infekcije, dok su petog dana

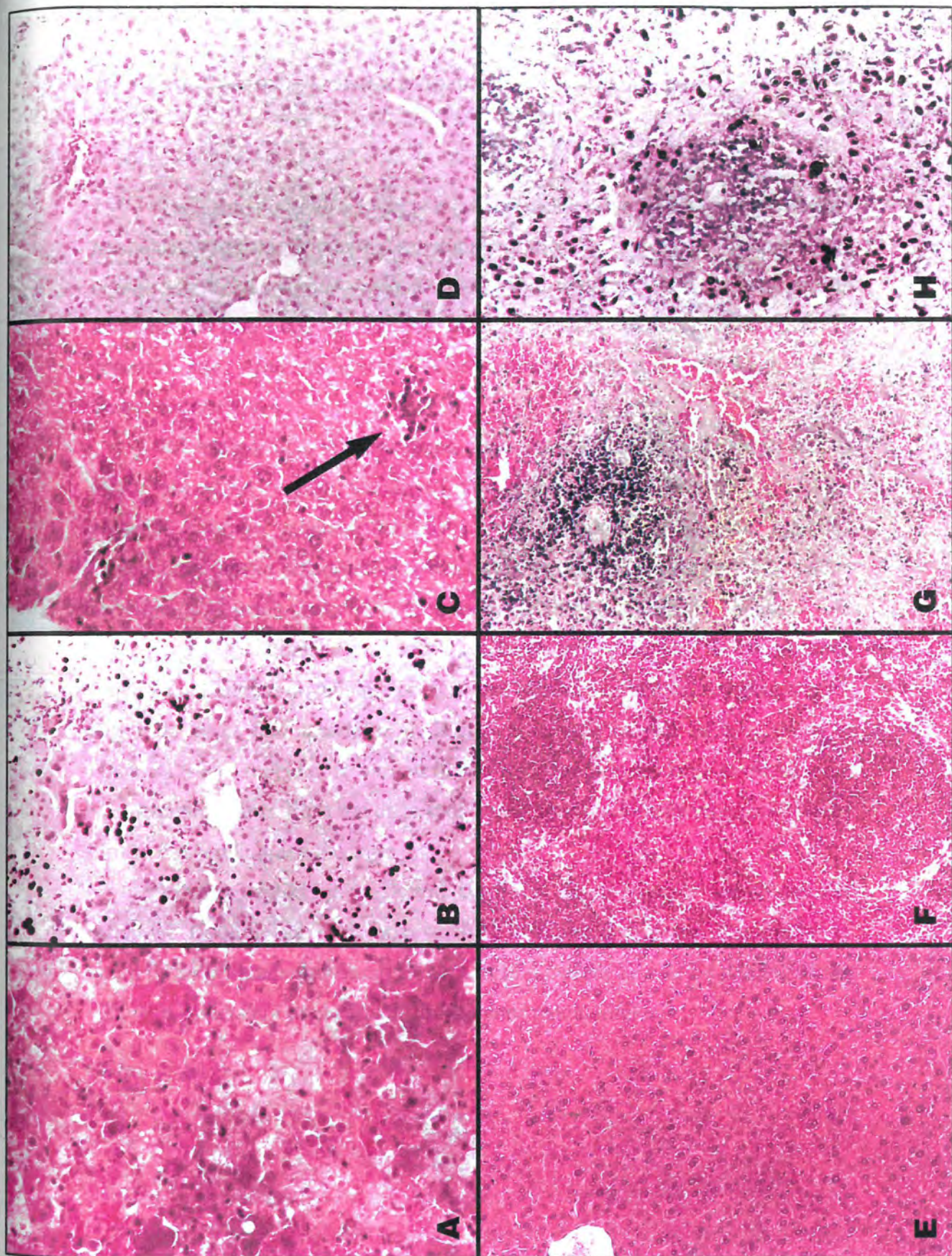


nakon infekcije u subletalno inficiranih životinja uočene samo rijetke imunohistokemijski pozitivno obojene stanice (2d).

Od drugih analiziranih organa zanimljive su promjene uočene u slezeni i timusu. Pri letalnoj dozi uočena je značajna involucija timusa s deplecijom korteksa i velikim žarištima nekroze u preostalim dijelovima korteksa. Pri subletalnoj dozi promjene u timusu bile su minimalne i obilježene blagom kortikalnom deplecijom. U slezeni je uočena konfluirajuća nekroza crvene pulpe koja se rasprostirala do rubnih područja bijele pulpe. Pri letalnoj dozi to je dovelo do gubitka normalne arhitekture slezene petog dana nakon infekcije, a istovremeno je uočena i deplecija bijele pulpe. Lezije su odgovarale distribuciji virusa (2g). Imunohistokemijsko bojanje pokazalo je pozitivitet u crvenoj pulpi, uz rijetke pozitivne jezgre uočene u bijeloj pulpi (2h). Iste lezije uočene su i pri subletalno inficiranih životinja, no bile su manje rasprostranjene i slično kao u jetri slabije uočljive petog dana nakon infekcije s izuzetkom nekoliko rijetkih imunohistokemijski pozitivnih žarišta nekroze.

### ***Slika 2. Histopatološke i imunohistokemijske promjene u jetri i slezeni***

*Histopatološke promjene i rasprostranjenost virusa petog dana nakon infekcije u jetri i slezeni životinja inficiranih sa  $2,5 \times 10^5$  PFU (sLD) ili  $10^5$  PFU (LD) SGV intraperitonealno. Vide se histološki rezovi bojeni hemalaun eozinom i isti rezovi analizirani imunohistokemijski radi detekcije rasprostranjenosti virusnih antigena u tkivu. Vidljiva je konfluentna nekroza (A), praćena izraženom raširenošću virusnog antigena u jetri (B), odnosno slezeni (G i H), u životinja inficiranih letalnom dozom virusa. Pri infekciji subletalnom dozom vidi se petog dana nakon infekcije oporavak histopatološkog oštećenja (C) i nestanak virusnog antigena iz jetre (D). Prikazani su i hemalaun eozinom bojani rezovi jetre (E) i slezene (F) kontrolnih životinja.*



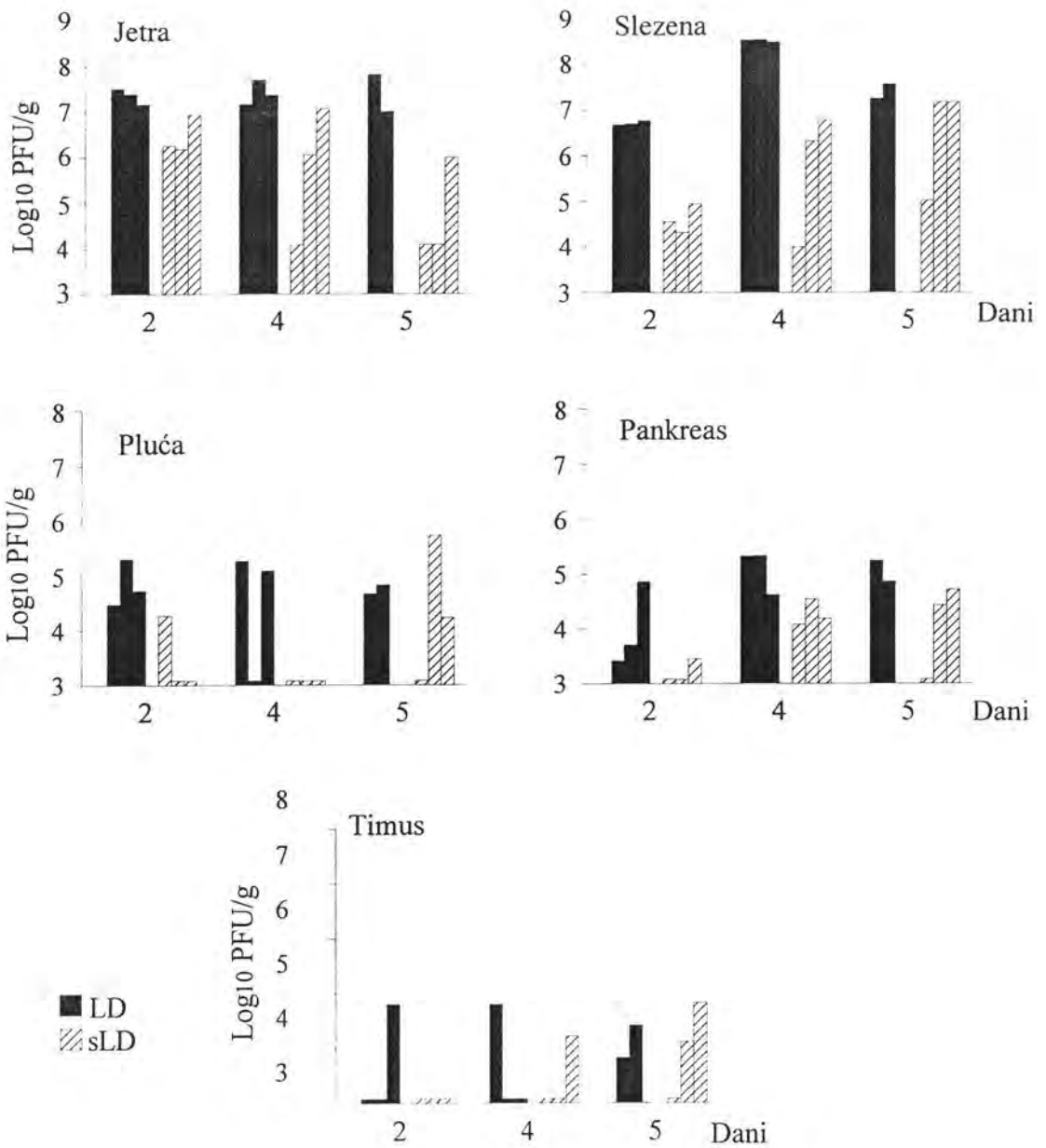
Slika 2.

### 4.1.3. Odnos replikacije virusa u tkivu i stupnja oštećenja jetre

Da bismo pokazali u kojoj je mjeri oštećenje tkiva uočeno histopatološki i imunohistokemijski u odnosu sa stupnjem virusne replikacije u određenom organu određivali smo titar virusa u tim organima u letalno i subletalno inficiranih životinja. To smo činili drugog, četvrtog i petog dana nakon infekcije (slika 3), odnosno iste dane kada smo tkivne rezove analizirali patohistološki i imunohistokemijski.

Pri letalnoj dozi virusa, drugog dana nakon infekcije uočili smo srednji titar virusa od  $7,41 \log_{10}$  PFU/g tkiva jetre i taj je nivo perzistirao tijekom perioda praćenja životinja, odnosno četvrtog i petog postinfekcijskog dana. Infekcija subletalnom dozom rezultirala je nižim titrom virusa već od drugog dana nakon infekcije da bi petog postinfekcijskog dana srednji titar u jetri iznosio samo  $4,72 \log_{10}$  PFU/g. Za razliku od vrijednosti u jetri, titar je ostao isti ili čak rastao u drugim analiziranim organima, npr. plućima, slezeni i gušterači bez obzira na to jesu li životinje bile subletalno ili letalno inficirane. Izuzeci su bili timus, u kojem su titrovi u obje doze varirali ili bili ispod granice detekcije te mozak gdje nije detektiran virus. Proizlazi da je sposobnost kontrole virusne replikacije u jetri ključni čimbenik preživljavanja.

Virusna replikacija u slezeni mogla bi imati utjecaja na sposobnost inficirane životinje da pruži odgovarajući imunološki odgovor. Zanimljivo je uočiti da su pri letalnoj infekciji titrovi virusa u slezeni za više od dva logaritma viši, no u subletalnoj infekciji, već drugog dana nakon infekcije.

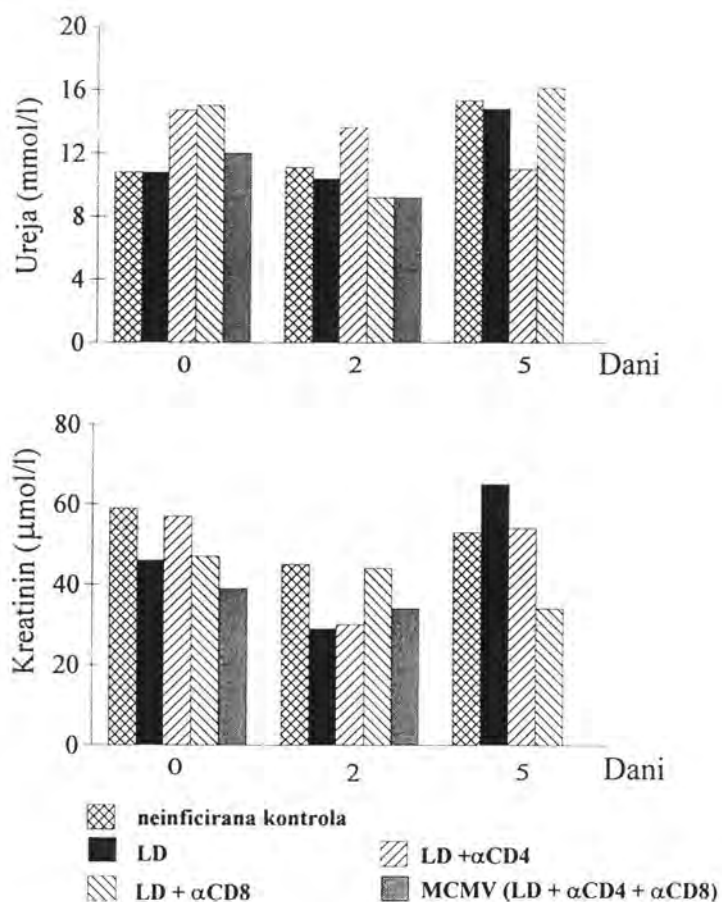


**Slika 3. Titar virusa u miševa inficiranih sa SGV**

Titrovi virusa u jetri, slezeni, plućima, pankreasu i timusu životinja inficiranih s  $2,5 \times 10^4$  PFU (sLD), odnosno  $10^5$  PFU (LD) SGV drugog, četvrtog i petog dana nakon infekcije. Stupci predstavljaju vrijednosti pojedinačnih životinja. Razina detekcije razlikovala se ovisno o tkivu i varirala između  $10^2$  do  $10^4$  PFU/g.

#### 4.1.4. Biokemijski parametri kao pokazatelji oštećenja jetre

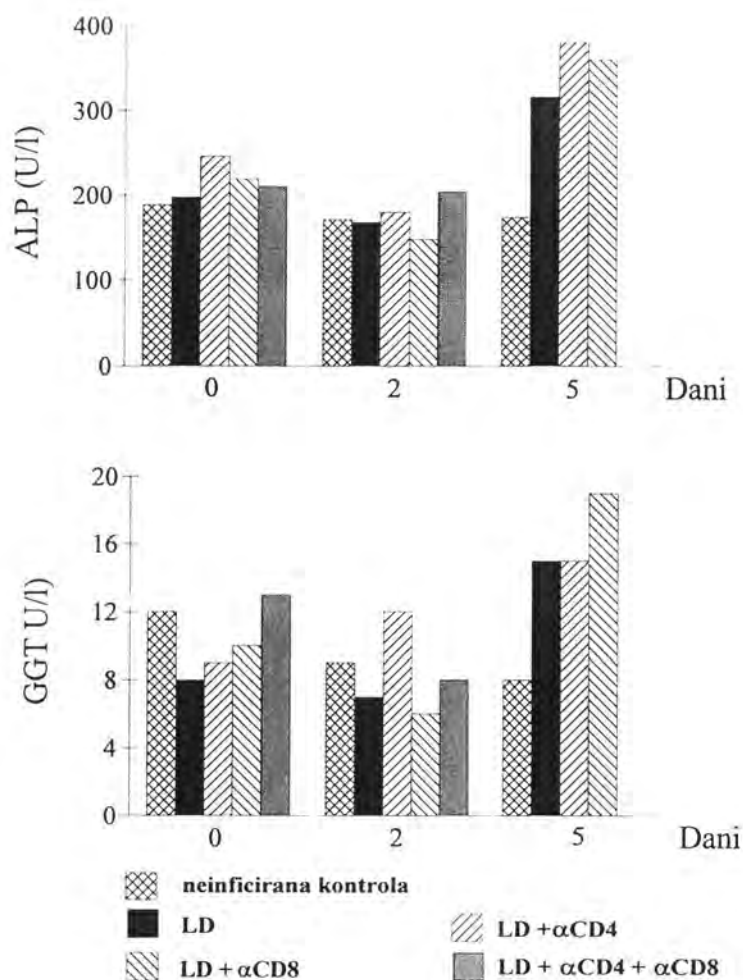
Visoki titar virusa u jetrenom tkivu pratili su i poremećaji u vrijednostima laboratorijskih parametara povezanih s funkcijom jetre. U ispitivanih životinja određivali smo serumske vrijednosti glukoze, AST, ALT, LDH, GGT, ALP, ureje i kreatinina.



**Slika 4. Ureja i kreatinin u letalno inficiranih životinja**

Vrijednosti ureje i kreatinina u serumu životinja inficiranih s  $10^5$  PFU (LD) SGV nultog te drugog i petog dana nakon infekcije. Prikazane su i vrijednosti u životinja inficiranih s LD SGV depletiranih za  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocitne T subpopulacije, kao i vrijednosti u kontrolnih životinja.

Vrijednosti ureje, kreatinina (slika 4) i GGT (slika 5) nisu se razlikovale u odnosu na kontrolne vrijednosti drugog, četvrtog i petog dana nakon infekcije čak niti u letalno inficiranih životinja. Vrijednosti ALP pokazale su diskretno povišenje petog dana u letalno inficiranih životinja depletiranih za  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  ili obje subpopulacije T limfocita (slika 5).

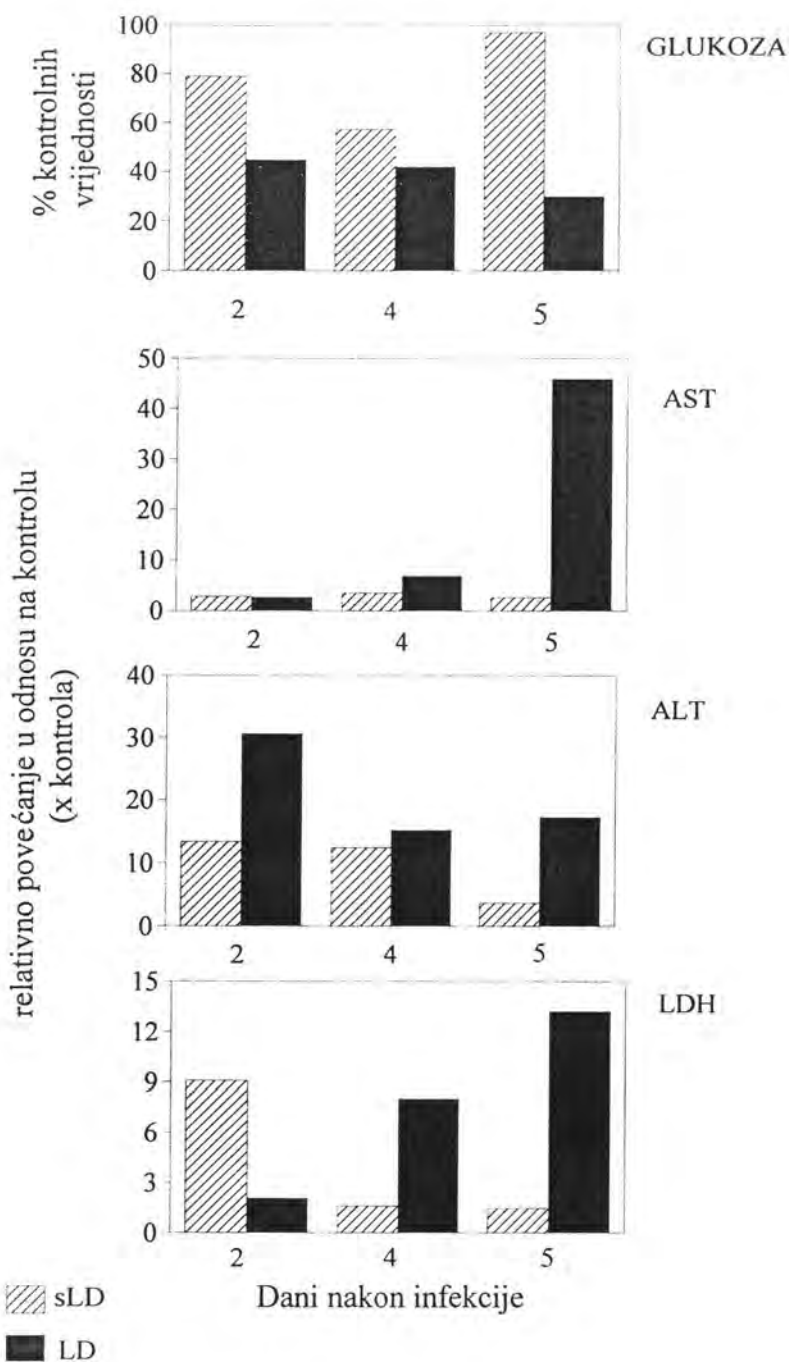


**Slika 5. ALP i GGT u letalno inficiranih životinja**

Vrijednosti ALP i GGT u serumu životinja inficiranih s  $10^5$  PFU (LD) SGV multog, drugog i petog dana nakon infekcije. Prikazane su vrijednosti u životinja inficiranih s LD SGV depletiranih za  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocitne T subpopulacije, kao i vrijednosti u kontrolnih životinja.

Vrijednosti glukoze ukazivale su na hipoglikemiju, ne samo u životinja inficiranih letalnom dozom virusa, već i u subletalno inficiranih životinja. Razina glikemije u letalno inficiranih životinja bila je niska za čitava tijeka infekcije, a petog postinfekcijskog dana činila je 29% vrijednosti glikemije u kontrolnih životinja. U subletalno inficiranih životinja vrijednosti glukoze bile su niže u odnosu na kontrolnu grupu drugog i četvrtog postinfekcijskog dana da bi se petog dana nivo glikemije povisio na 97% kontrolnih vrijednosti (slika 6). Vrijednosti AST, ALT i LDH bile su povišene tijekom infekcije i u subletalno i u letalno inficiranih životinja, no dok su pri subletalnoj dozi vrijednosti padale petog dana, u letalno inficiranih životinja su bile petog dana više, no ranijih dana (slika 6). Važno je napomenuti da su životinje inficirane letalnom dozom pretežito ugibale šestog postinfekcijskog dana, dok su subletalno inficirane životinje preživjele infekciju (slika 1).

Uočljivo je da pad glikemije i porast vrijednosti AST, ALT i LDH (slika 6), kao pokazatelji jetrene disfunkcije, koreliraju s visokim titrom virusa u jetri (slika 3) i ugibanjem životinja (slika 1), što potvrđuje da direktno oštećenje hepatocita virusom ima ključnu ulogu u etiologiji SGV izazvanog hepatitisa.



**Slika 6. Oštećenje jetrene funkcije u SGV infekciji**

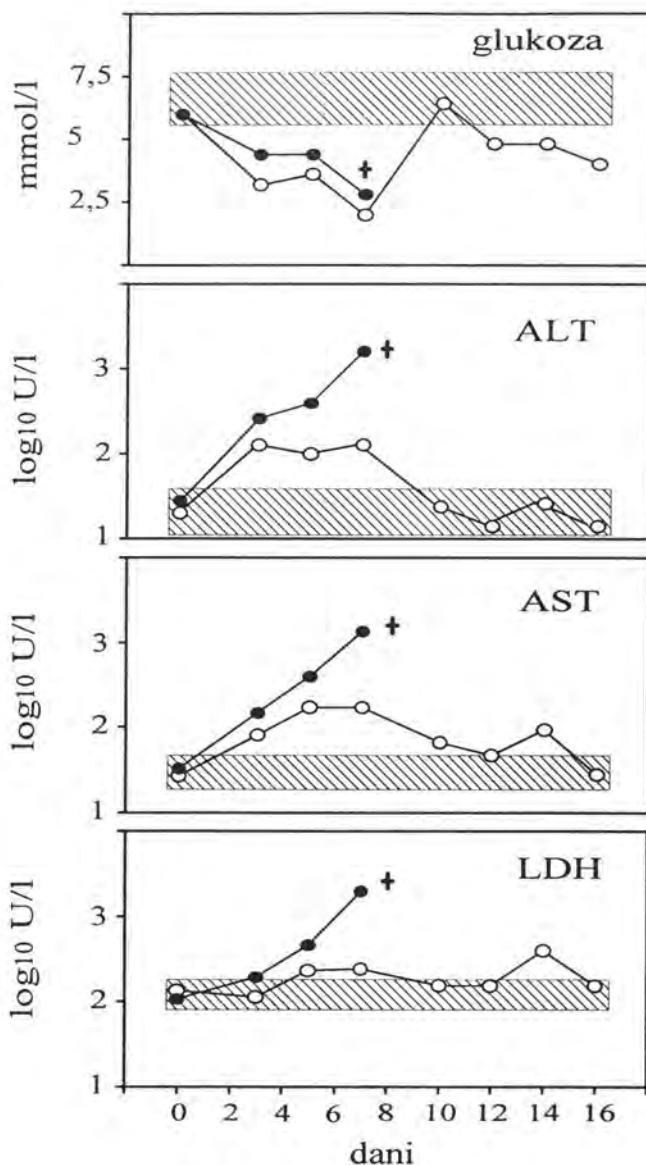
Vrijednosti glukoze, AST, ALT i LDH u serumu životinja inficiranih subletalnom (sLD), odnosno letalnom (LD) dozom SGV drugi, četvrti i peti dan nakon infekcije. Svaki stupac predstavlja rezultate seruma sakupljenih od pet do šest životinja. Vrijednosti glukoze izražene su kao postotak kontrolnih vrijednosti. Vrijednosti AST, ALT i LDH izražene su kao relativno povećanje u odnosu na kontrolne vrijednosti (0-50x).



#### 4.1.5. Uloga limfocita T u kontroli SGV infekcije

Prikazana histopatološka analiza, kao i vrijednosti virusnih titrova ukazuju na ključnu ulogu imunološkog odgovora u preživljavanju životinja inficiranih SGV. Pri infekciji životinja subletalnom dozom, imunološki sustav djelotvorno kontrolira replikaciju virusa u jetri, što dovodi do djelomičnog vraćanja jetrene funkcije petog dana nakon infekcije. Nasuprot tome, replikacija virusa u jetri pri infekciji letalnom dozom ukazuje da te životinje ne stvaraju dostatni imuni odgovor za suočavanje s visokim stupnjem virusne replikacije u jetri. Da bismo ustanovili ulogu imunološkog odgovora u kontroli hepatitisa izazvanog SGV, životinjama inficiranim subletalnom dozom SGV depletirali smo CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocitne T subpopulacije i promatrali jetrenu funkciju u takvih životinja. Deplecija je rezultirala 100% mortalitetom životinja u toj grupi. Sve su životinje uginule u periodu između šestog i devetog dana, slično kao i ranije prikazane životinje inficirane letalnom dozom virusa (slika 1). Osim preživljavanja u životinja smo pratili parametre koji su u ranijim eksperimentima bili pokazatelji jetrenog oštećenja, a to su glukoza, ALT, AST i LDH.

Vrijednosti enzima karakterističnih za oštećenje jetre pokazali su prolazno povećanje vrijednosti s vrškom u periodu između petog i sedmog postinfekcijskog dana u grupi nedepletiranih životinja. Nakon toga su se vrijednosti AST, ALT i LDH vratile u raspon normalnih vrijednosti najkasnije do šesnaestog postinfekcijskog dana. U depletiranih životinja vrijednosti enzima su tijekom sedam postinfekcijskih dana rasle (slika 7), a nakon toga su životinje uginule. Vrijednosti glukoze u serumu životinja snizile su se do razine hipoglikemije u obje grupe tijekom prvih sedam postinfekcijskih dana. Nakon toga su životinje u depletiranoj grupi uginule, dok su nedepletirane, subletalno inficirane životinje postale ponovno normoglikemične. Iz prikazanog se vidi da su jetrena funkcija i duljina preživljavanja u subletalno inficiranih i depletiranih životinja ovisni o imunološkom nadzoru posredovanom limfocitima T.



▨ Kontrola ○ MCMV ● MCMV + αCD4 + αCD8

**Slika 7. Učinak deplecije limfocita T na jetrenu funkciju**

Vrijednosti glukoze, ALT, AST i LDH u životinja inficiranih sa subletalnom dozom SGV s ili bez deplecije CD4 (mAb 191.1) i CD8 (mAb 169.4) limfocita T. Osjenčana ploha predstavlja raspon vrijednosti za pojedini parametar u kontrolnih životinja. Svaka točka predstavlja zajedničku vrijednost pojedinog parametra u serumu sakupljenom od šest životinja. † označava ugibanje životinja.

Kao što smo prikazali na slici 1. životinje inficirane letalnom dozom virusa ugibaju nešto ranije ukoliko su im depletirane subpopulacije limfocita T. Određivanjem titra virusa u različitim organima tako inficiranih životinja petog postinfekcijskog dana, pokušali smo utvrditi ulogu limfocita T u letalnoj MCMV infekciji.

Među rezultatima prikazanim u tablici 1. uočava se da su vrijednosti titra virusa u slezeni za  $1,78 \log_{10}$  PFU/g niže u depletiranih životinja u usporedbi sa nedepletiranim životinjama.

organ	Titar virusa ( $\log_{10}$ PFU/g)	
	LD	LD+ $\alpha$ CD4 $\alpha$ CD8
jetra	7.41	8,21
slezena	7.40	5,62
pluća	4.74	5.31
gušterača	5.15	5.38
timus	4.12	5.47

**Tablica 1. Utjecaj deplecije limfocita T na titar virusa tijekom letalne SGV infekcije**

Vrijednosti virusnog titra u miševa inficiranih letalnom dozom SGV, s ili bez deplecije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T, petog dana nakon infekcije. Podaci prikazuju srednju vrijednost izračunatu na temelju izmjerenih titrova u pojedinim organima kod dvije do tri životinje u svakoj grupi.

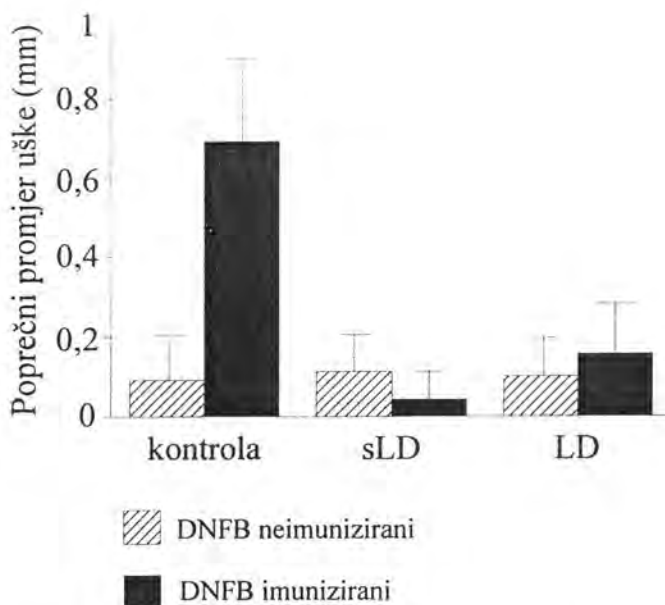
U jetri, plućima i gušterači deplecija limfocita T dovela je do porasta virusnog titra, no za manje od jednog  $\log_{10}$  PFU/g u usporedbi s nedepletiranim životinjama. Osim toga deplecija limfocita T nije značajno utjecala na razinu jetrenih enzima i glukoze. Nasuprot subletalne infekcije gdje deplecija limfocita T mijenja tijek bolesti, u letalnoj infekciji ona samo dovodi do neznatnog povećanja virusnog titra u nekim organima.

Navedeni rezultati sugeriraju da bi T stanice mogle biti ciljne stanice za virusnu replikaciju u slezeni. Osim toga, moguće je da letalna infekcija čini odgovor limfocita T nedostatnim za suočavanje s visokim titrom virusa u ranom tijeku infekcije.

#### **4.1.6. Reakcija kasnog tipa preosjetljivosti u SGV inficiranih životinja**

Prikazani rezultati nametnuli su nam pitanje ne izaziva li virusna infekcija imunosupresiju i time dovodi do razvoja teške kliničke slike s posljedičnim letalnim ishodom.

Pri procjeni funkcije limfocita T upotrijebili smo u inficiranih životinja tip kasne preosjetljivosti prema heterolognom T ovisnom antigenu. Poprečni promjer otečene uške mjeren je četvrtog postinfekcijskog dana nakon senzibilizacije i ponovnog lokalnog davanja antigena (DNFB) kontrolnim i inficiranim životinjama. Kao što je prikazano na slici 8. miševi inficirani s letalnom ili subletalnom dozom virusa pokazali su statistički značajno manju sposobnost odgovora prema DNFB u odnosu na kontrolne životinje ( $p < 0.01$ ) što je dokaz uloge virusom potaknute imunosupresije u patogenezi bolesti.



**Slika 8. Reakcija kasnog tipa preosjetljivosti u SGV inficiranih životinja**

Poprečni promjer uške u kontrolnih te subletalno i letalno inficiranih životinja nakon izlaganja DNFB u ranije imuniziranih, odnosno neimuniziranih životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti izmjerene u tri do četiri životinje.

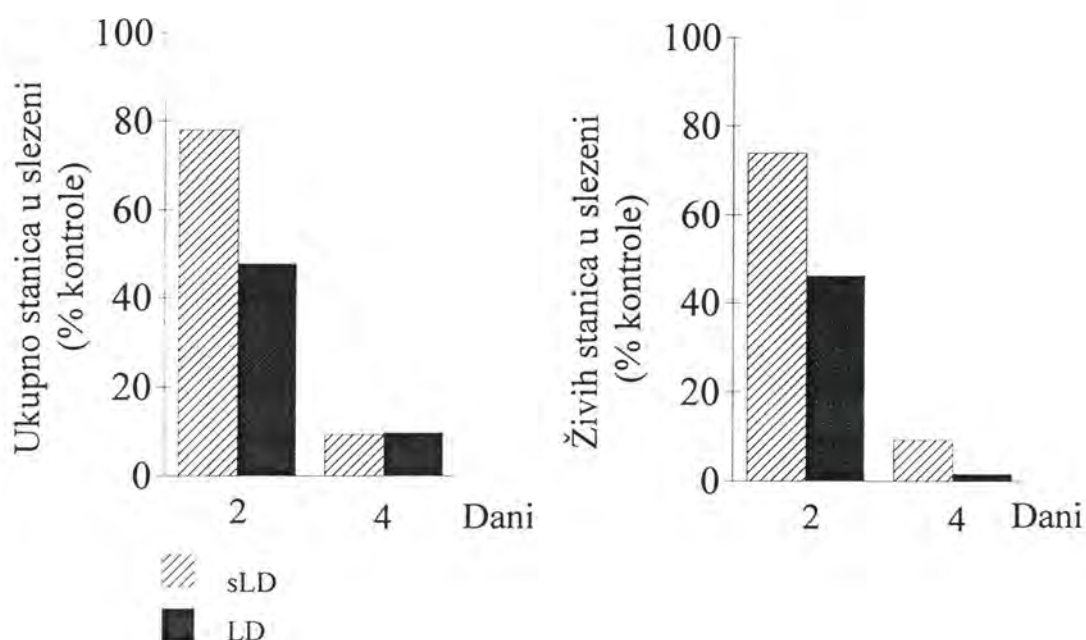
#### 4.1.7. Deplecija stanica slezene miševa inficiranih sa SGV

Promjene uočene u histopatološkoj slici slezene uočene pri infekciji SGV ukazale su na njihovu moguću povezanost s imunodeficijntnim odgovorom inficiranih životinja. Uslijed toga životinjama inficiranim s različitim dozama virusa izvadene su slezene i analiziran je učinak infekcije na populaciju stanica u organu. Pri infekciji letalnom dozom došlo je do brze i obimne deplecije splenocita. Broj živih stanica iznosio je drugog postinfekcijskog dana 46%, a četvrtog postinfekcijskog dana 1,6% u odnosu na kontrolnu skupinu. U subletalno inficiranih životinja broj je živih stanica bio drugog postinfekcijskog dana 74%, a četvrtog 9,2% kontrolnih vrijednosti što možemo objasniti kao doza ovisan odgovor (tablica 2, slika 9).

Dan nakon infekcije	Grupa	Žive stanice/slezena
2	kontrola	$1.68 \times 10^8$
	sLD	$1.24 \times 10^8$
	LD	$7.75 \times 10^7$
4	kontrola	$1.26 \times 10^8$
	sLD	$1.16 \times 10^7$
	LD	$2.12 \times 10^6$

**Tablica 2. Broj živih stanica u slezeni nakon infekcije**

Broj živih stanica u slezeni drugog i četvrtog dana nakon infekcije u kontrolnih te u životinja inficiranih letalnom i subletalnom dozom virusa.

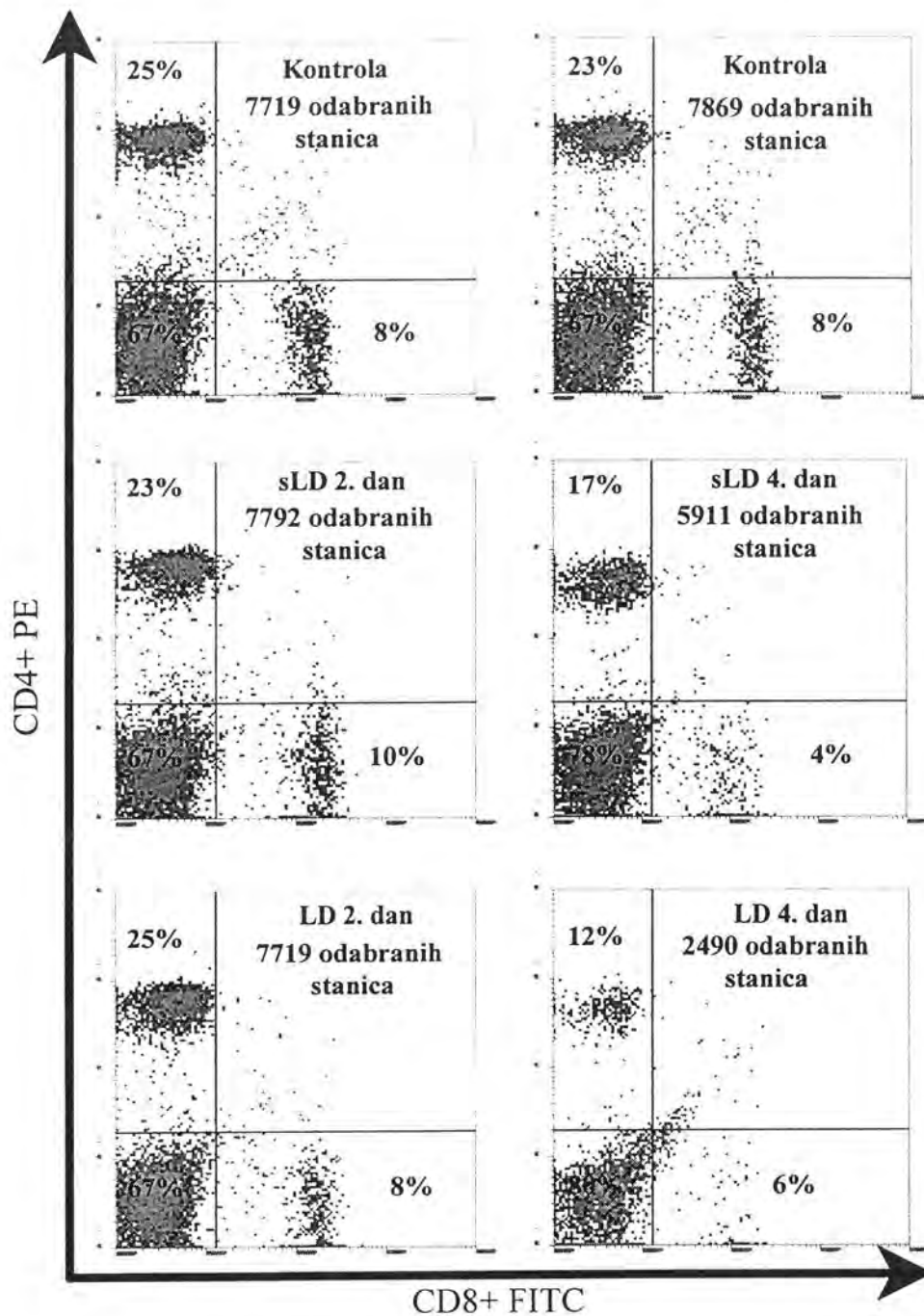


**Slika 9. SGV infekcija izaziva depleciju stanica u slezeni**

Prikaz postotka ukupnog broja stanica te broja živih stanica u slezeni drugog i četvrtog dana nakon infekcije u životinja inficiranih letalnom i subletalnom dozom SGV u odnosu na kontrolne životinje.

Populacije limfocita B i T analizirali smo drugog i četvrtog postinfekcijskog dana protočnim citometrom (slika 10). Stanične populacije su analizirane na temelju biljega B220<sup>+</sup>, TCRαβ<sup>+</sup>, MAC-1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>. Drugog dana nakon infekcije B220<sup>+</sup> populacija stanica u miševa inficiranih SGV bila je održana slično kao i u kontrolnih životinja, dok su TCRαβ<sup>+</sup> stanice bile reducirane na 75% kontrolnih vrijednosti u subletalno, odnosno 70% u letalno inficiranih životinja. Četvrtog dana smo uočili značajne promjene u obje populacije, s izraženijim promjenama u populaciji limfocita T. Pri infekciji letalnom dozom stanične populacije B220<sup>+</sup> bile su reducirane na 22%, dok su TCRαβ<sup>+</sup> bile reducirane na 6% u odnosu na kontrolnu grupu, a pri infekciji subletalnom dozom B220<sup>+</sup> na 87%, a TCRαβ<sup>+</sup> na 33%. Analizom CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> subpopulacija limfocita T uočeno je da su obje podjednako smanjene (slika 11).

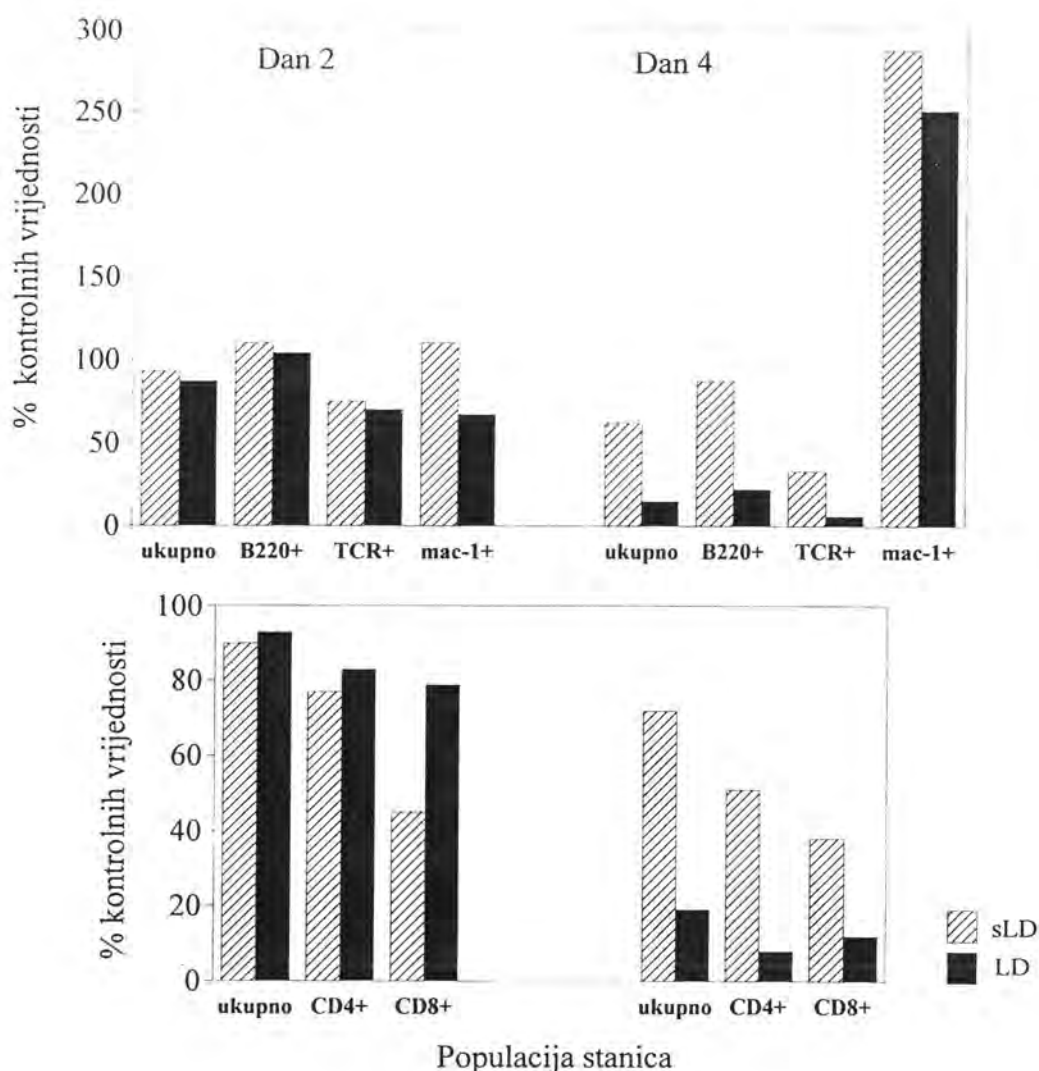
Navedeni rezultati dobiveni protočnom citometrijom ukazuju da i u letalno i u subletalno inficiranih životinja postoji deplecija ukupnog broja splenocita kao i deplecija limfocita T i u nešto manjoj mjeri limfocita B te relativni porast makrofaga. Snažna imunosupresija tijekom infekcije sa SGV vjerojatno je izravna posljedica deplecije T i B limfocita.



**Slika 10. Stanice slezene analizirane protočnom citometrijom**

Rezultati analize stanica slezene protočnim citometrom u kontrolnih te subletalno i letalno inficiranih životinja drugog i četvrtog dana nakon infekcije sa SGV.





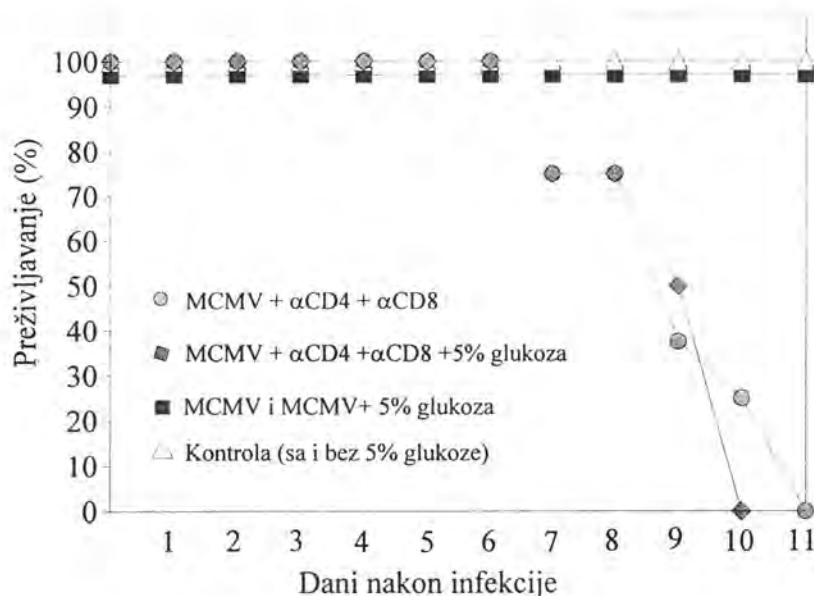
**Slika 11a i b. SGV infekcija izaziva promjenu broja limfocita i makrofaga u slezeni**

a. Ukupan broj stanica kao i njihovih populacija u slezeni životinja inficiranih subletalnom i letalnom dozom SGV, analiziran protočnom citometrijom, drugog i četvrtog dana nakon infekcije. Svi stupci predstavljaju srednje vrijednosti u dvije životinje, osim stupaca s ukupnim brojem limfocita, koji predstavljaju srednje vrijednosti u četiri životinje. Vrijednosti su izražene kao postotak kontrolnih vrijednosti.

b. Protočnom citometrijom izdvojene  $CD4^+$ , odnosno  $CD8^+$  limfocitne subpopulacije u slezeni drugog i četvrtog postinfekcijskog dana u životinja inficiranih subletalnom i letalnom dozom SGV virusa izražene kao postotak kontrolnih vrijednosti.

#### 4.1.8. Glikemija u SGV infekciji

U dosadašnjim eksperimentima uočili smo pad vrijednosti glukoze u serumu životinja s teškim kliničkim tijekom bolesti. Pokušali smo stoga, u sljedećem eksperimentu, subletalno inficiranim životinjama umjesto vode za piće davati 5% otopinu glukoze. Pratili smo u kojoj mjeri davanje glukoze utječe na tijek bolesti, preživljavanje te vrijednosti laboratorijskih parametara koji su bili poremećeni u ranijim eksperimentima uz razvoj jetrenog oštećenja.



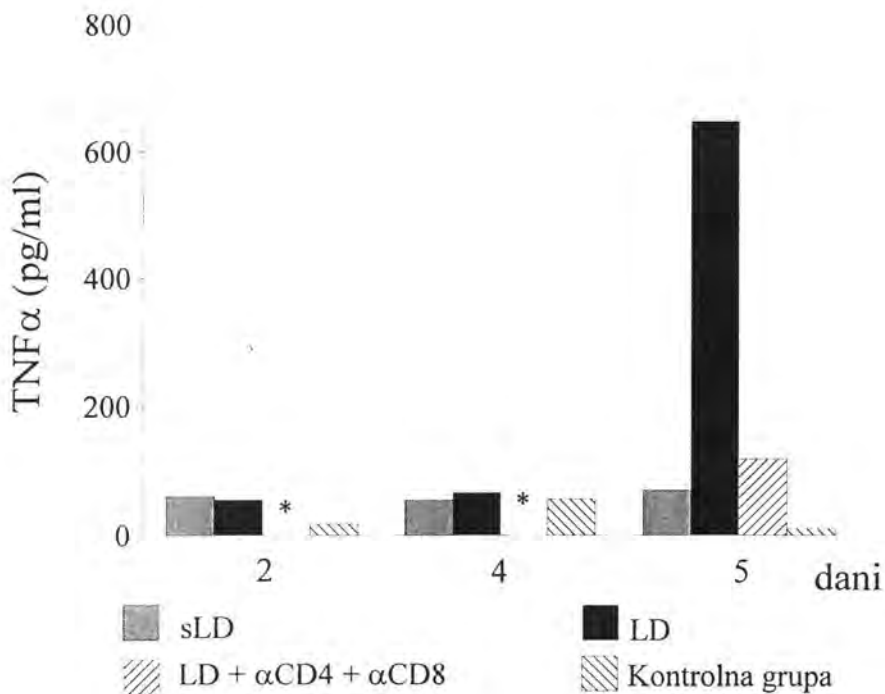
**Slika 12. Peroralna terapija 5% glukozom ne utječe na preživljavanje**

Preživljavanje životinja nakon infekcije subletalnom dozom SGV te subletalnom dozom sa deplecijom  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocitnih T subpopulacija uz primanje ili bez primanja 5% glukoze u vodi za piće. Praćeno je i preživljavanje kontrolnih životinja.

Na slici 12 uočava se da u životinja inficiranih subletalnom dozom SGV i depletiranih za  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocitne T subpopulacije, davanje glukoze u otopini za piće nije utjecalo na preživljavanje. Obje grupe životinja nisu se razlikovale ni po kliničkom tijeku bolesti niti po vrijednostima laboratorijskih parametara.

#### 4.1.9. Značaj $\text{IFN}\gamma$ i $\text{TNF}\alpha$ u SGV infekciji

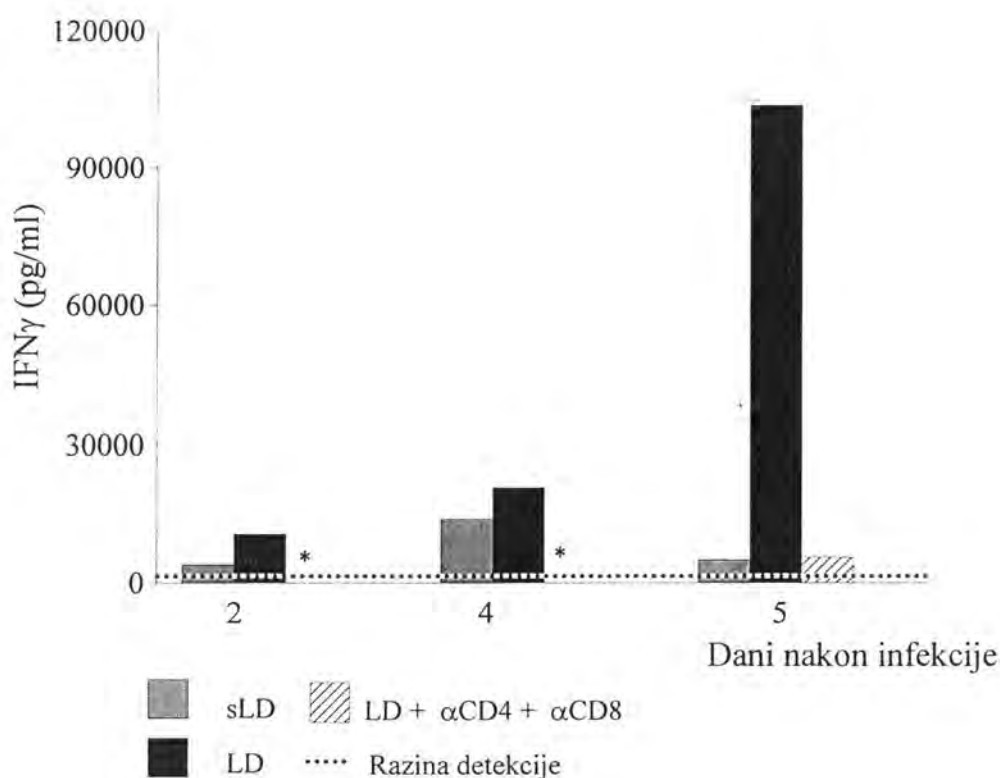
Kao što smo ranije napomenuli, životinje inficirane SGV ugibale su pod kliničkom slikom endotoksičnog šoka pa nas je to navelo da u inficiranih životinja pratimo vrijednosti  $\text{IFN}\gamma$  i  $\text{TNF}\alpha$  koje su inače povišene u takvim stanjima. Pratili smo vrijednosti tih citokina drugog, četvrtog i petog postinfekcijskog dana u letalno i subletalno inficiranih životinja te petog postinfekcijskog dana u letalno inficiranih  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  depletiranih životinja i uspoređivali ih s kontrolnom grupom.



**Slika 13.  $\text{TNF}\alpha$  u MCMV infekciji**

Vrijednosti  $\text{TNF}\alpha$  u serumu životinja nakon infekcije subletalnom ( $2,5 \times 10^4$  PFU) i letalnom dozom ( $10^5$  PFU) SGV virusa te u kontrolnih životinja, drugog, četvrtog i petog dana nakon infekcije. Prikazane su i vrijednosti u letalno inficiranih  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  depletiranih životinja petog dana nakon infekcije. Zvezdica (\*) označava dane kada vrijednosti nisu određivane.

Visoke vrijednosti  $TNF\alpha$  petog postinfekcijskog dana u letalno inficiranih životinja ukazale su nam na povezanost ove pojave s limfocitima T budući da su u grupi depletiranoj za obje subpopulacije limfocita T vrijednosti ovog citokina bile značajno niže (slika 13). Zamjetan je porast vrijednosti  $IFN\gamma$ , od drugog do petog postinfekcijskog dana u životinja inficiranih letalnom dozom virusa. Uočili smo isto tako i veliku razliku u vrijednostima  $IFN\gamma$  između životinja inficiranih letalnom dozom u odnosu na životinje inficirane letalnom dozom i depletirane za limfocitne T subpopulacije (slika 14).



**Slika 14.  $IFN\gamma$  u MCMV infekciji**

Vrijednosti  $IFN\gamma$  u serumu životinja nakon infekcije subletalnom i letalnom dozom SGV virusa drugog, četvrtog i petog dana nakon infekcije. Prikazane su i vrijednosti  $IFN\gamma$  u letalno inficiranih i  $CD4^+$  i  $CD8^+$  depletiranih životinja petog dana nakon infekcije. Vrijednosti  $IFN\gamma$  bile su ispod razine detekcije (RD).

Prikazani rezultati ukazuju da su limfociti T odgovorni za porast vrijednosti  $TNF\alpha$  i  $IFN\gamma$  petog dana nakon infekcije letalnom dozom virusa. Deplecija limfocitnih T subpopulacija rezultirala je značajno nižim vrijednostima ovih citokina u letalno inficiranih životinja petog postinfekcijskog dana. Tada se vrijednosti citokina u letalno inficiranih i depletiranih životinja nisu razlikovale od vrijednosti u subletalno inficiranih životinja. Vrijednosti oba citokina u letalno inficiranih životinja rastu od drugog do petog dana nakon infekcije, dok se pri subletalnoj infekciji nakon četvrtog dana vrijednosti  $TNF\alpha$  samo neznatno povise, a vrijednosti  $IFN\gamma$  čak i snize. Prikazano ukazuje na mogućnost da ovi citokini imaju zaštitnu ulogu pri infekciji subletalnom dozom, a agresivnu pri infekciji letalnom dozom. Budući da vrijednosti  $TNF\alpha$  pri letalnoj infekciji dosežu nivo koji se vidi u životinja kojima je induciran sindrom endotoksičnog šoka za pretpostaviti je da ovaj citokin igra važnu ulogu u oštećenju jetre, odnosno ekspresiji bolesti.

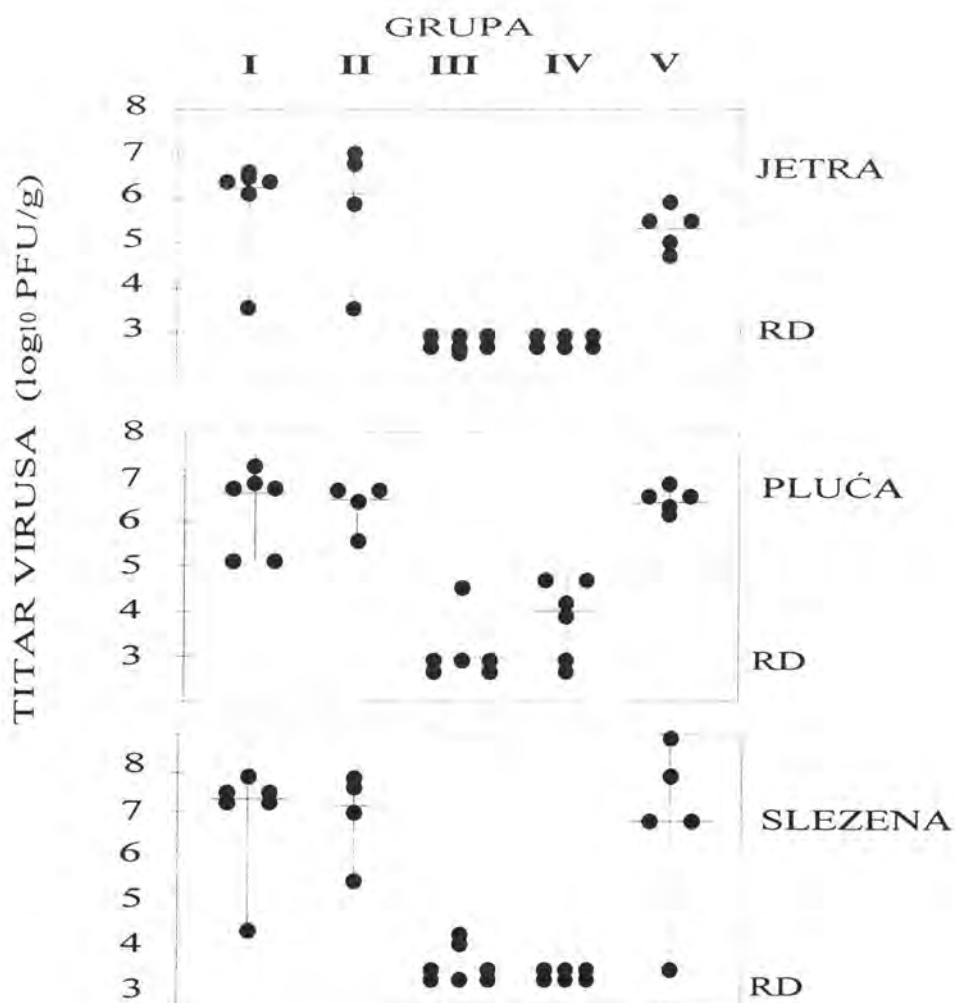
## **4.2. INFEKCIJA S MCMV IZOLIRANIM IZ KULTURE TKIVA**

### **4.2.1. Značaj $CD8^+$ limfocita T u nadzoru MCMV hepatitisa**

Eksperimenti učinjeni sa SGV izolatom MCMV potvrdili su ulogu limfocita T u nadzoru infekcije, a samim time i očuvanju jetrene funkcije inficiranih životinja. U sljedećoj grupi eksperimenata adoptivno smo prenosili različite subpopulacije limfocita T u imunonedostatne životinje kako bismo odredili koja je limfocitna T subpopulacija sposobna kontrolirati MCMV izazvano oštećenje jetre.

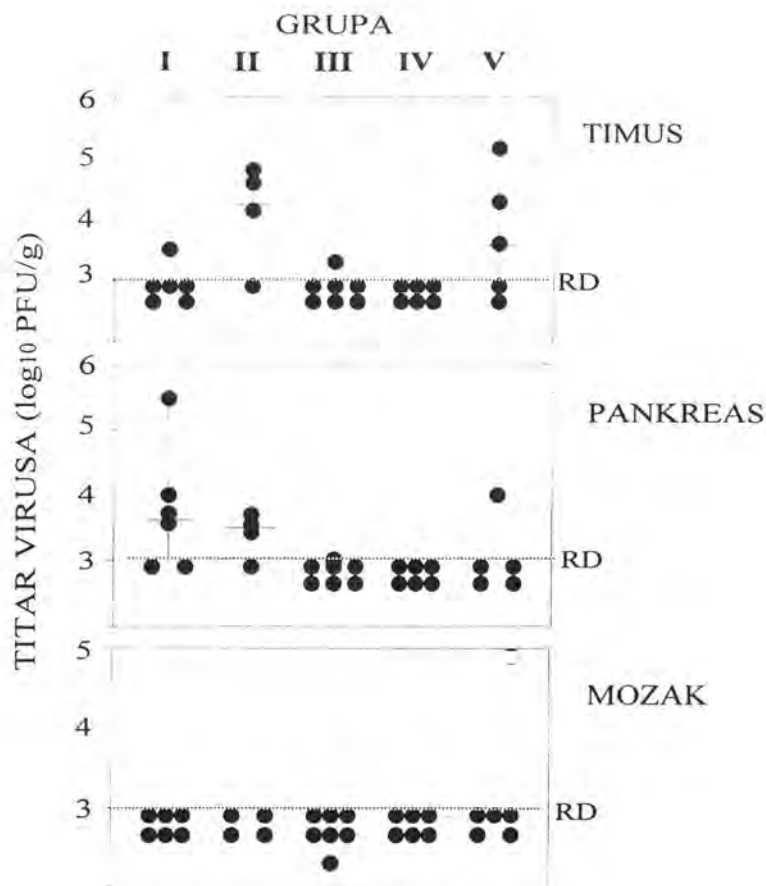
Koristili smo BALB/c miševe koje smo prethodno  $\gamma$  ozračili sa 6.5 Gy, a nakon toga podvrgnuli adoptivnom prijenosu  $10^5$  neimunih ili MCMV senzibiliziranih limfocita T. Potom je životinjama subkutano injiciran izolat

MCMV iz kulture tkiva ( $2 \times 10^5$  PFU intraplantarno), a u svim grupama praćeni su titrovi virusa, biokemijski parametri koji ukazuju na oštećenje jetre i histopatološke promjene te dokazivani virusni antigeni imunohistokemijskim tehnikama. Infekcija  $\gamma$  ozračenih životinja s izolatom MCMV iz kulture tkiva rezultirala je bolešću raširenom po većini organa i organskih sustava. Od analiziranih organa dvanaestog dana nakon infekcije najveći stupanj virusne replikacije uočen je u jetri, plućima i slezeni životinja kojima nisu adoptivno prenesene stanice (grupa I) ili su im prenesene neimune stanice (grupa II) (slika 15). Virusni titrovi u timusu i pankreasu u istim grupama životinja bili su povišeni, no manje izraženo, dok u mozgu nismo uspjeli detektirati virusnu replikaciju. Životinje kojima su adoptivno prenešeni MCMV senzibilizirani limfociti T bez (grupa III) ili s deplecijom  $CD4^+$  limfocitne T subpopulacije (grupa IV) mogle su uspješno kontrolirati virusnu replikaciju u organima u kojima smo određivali virusni titar (slike 15 i 15a). Virusni titar bio je u jetri ispod razine detekcije u svih životinja koje su primile  $CD8^+$  limfocitnu T subpopulaciju (grupe III i IV) (slika 15). Nasuprot tome visoki titar virusa dokazan je u grupama I i II koje nisu primile MCMV senzibilizirane limfocite T (slika 15). Životinje koje su primile adoptivni transfer imunih stanica depletiranih za  $CD8^+$  limfocitnu T subpopulaciju (grupa V) nisu mogle uspješno kontrolirati virusnu replikaciju u jetri (slika 15).



**Slika 15. Uloga limfocita T u kontroli virusne replikacije**

Prikazani su virusni titrovi u jetri, plućima i slezeni u životinja nakon adoptivnog prijenosa imunih, odnosno neimunih stanica.  $\gamma$ -ozračene životinje inficirane su u stražnju šapicu sa  $2 \times 10^5$  PFU MCMV izoliranog iz kulture tkiva. Dva sata nakon infekcije životinjama su adoptivno prenesene neimune stanice T (grupa II), imune MCMV stanice T iz latentno inficiranih životinja (grupa III) ili imune MCMV stanice T uz depleciju  $CD4^+$  (grupa IV) ili  $CD8^+$  (grupa V) limfocita T. Životinje kojima nisu prenesene stanice upotrijebljene su kao negativna kontrola (grupa I). Životinje su žrtvovane 12 dana nakon infekcije i virusni titrovi su određivani u jetri, plućima i slezeni. Svaka točka predstavlja vrijednosti titra u jedne životinje. Postoji statistički značajna razlika u količini virusa u grupama III i IV u odnosu na grupu I ( $p < 0.01$ ), grupu II ( $p < 0.01$ ) i grupu V ( $p < 0.01$ ) u jetri, plućima i slezeni.

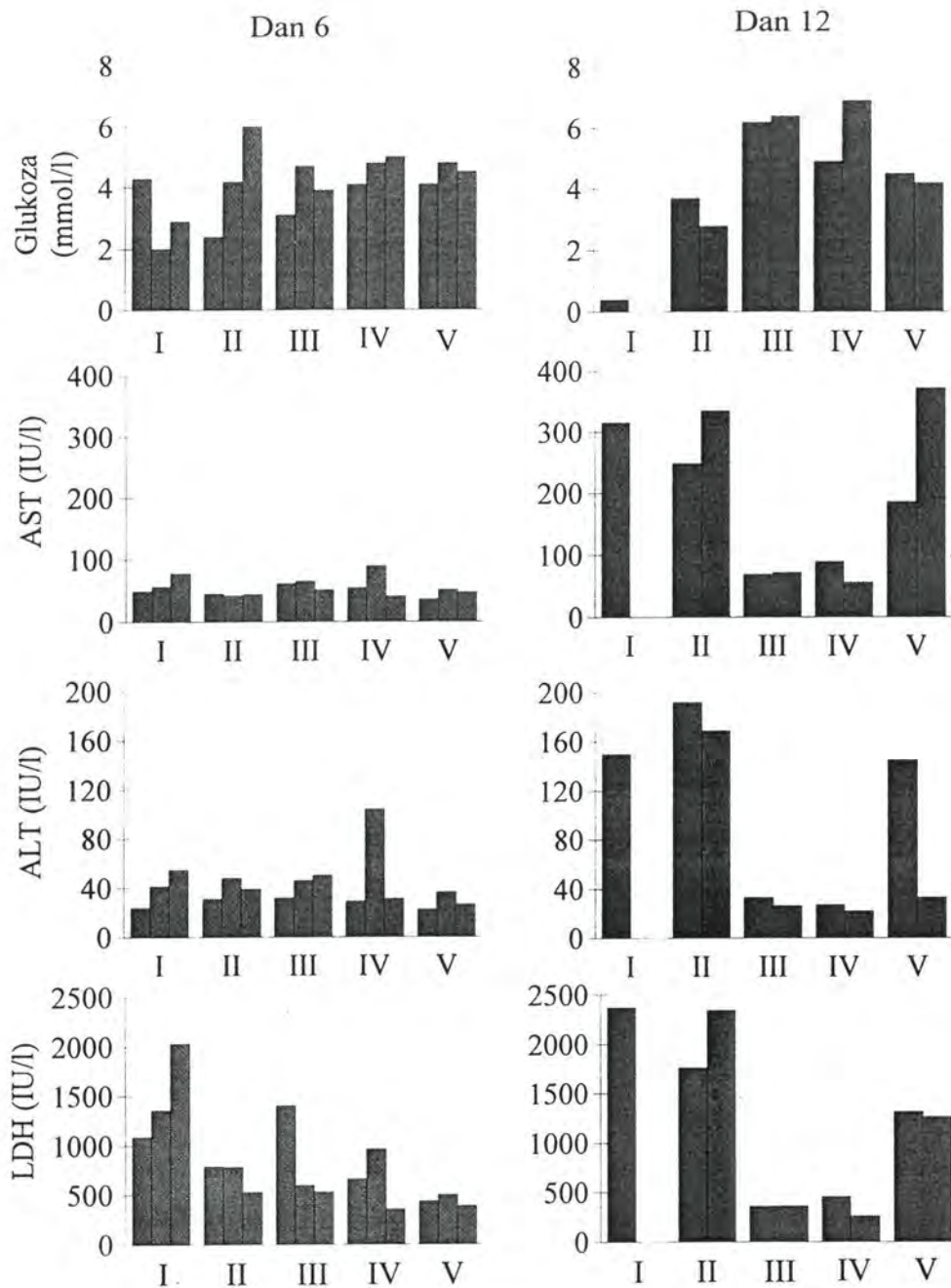


**Slika 15a. Uloga limfocita T u kontroli virusne replikacije**

Prikazani su virusni titrovi u timusu, gušterači i mozgu nakon adoptivnog prijenosa (popis grupa pod slikom 15). U timusu i slezeni postoji statistički značajna razlika u titru virusa između grupa IV i V ( $p < 0,05$ ), dok je u mozgu virusni titar u svim grupama ispod RD.

Povišene vrijednosti jetrenih enzima i pad vrijednosti glukoze ukazali su nam na oštećenje jetrene funkcije, a pratili su visok stupanj virusne replikacije u jetri (slika 16). Šestog dana nakon infekcije uočene su neznatne promjene u vrijednostima glukoze i LDH u grupama životinja kojima nisu adoptivno prenesene imune stanice. Izrazit pad vrijednosti glikemije i porast jetrenih enzima u serumu uočen je dvanaestog postinfekcijskog dana u grupama I i II. Prisutnost CD8<sup>+</sup> limfocita T u grupama III i IV, utjecala je na zadržavanje normalne jetrene funkcije, dok je u grupi V CD4<sup>+</sup> subpopulacija limfocita T mogla samo djelomično održati jetrenu funkciju (slika 16).





**Slika 16. Uloga limfocita T u kontroli jetrene funkcije**

Vrijednosti glukoze, AST, ALT i LDH određivane su šestog i dvanaestog dana nakon adoptivnog prijenosa (opis pod slikom 15). Svaki stupac predstavlja vrijednosti sakupljenih seruma tri do pet životinja.

Histopatološka analiza organa u ovako inficiranih životinja pomogla nam je u objašnjenju imunoloških mehanizama u nadzoru MCMV izazvane bolesti. Vidljivo je da u imunoneđostatnih životinja virusna infekcija uzrokuje oštećenja mnogih organa i organskih sustava, a osobito jetre, pluća, slezene i gušterače. U plućima je uočena masivna koagulacijska nekroza koja je uključivala čitave ređnjiće, no bez upalnih promjena. Osim toga zamijetili smo i vrlo impresivnu koagulacijsku nekrozu intersticija. Citomegaličke lezije bile su udružene s lezijama. Virusni titar u plućima bio je u skladu s opisanim promjenama, dakle vrlo visok (slika 15). U slezeni smo zamijetili tešku konfluirajuću nekrozu crvene pulpe (uključeno oko 90% crvene pulpe). Rijetka žarišta koagulacijske nekroze uočena su u ostacima bijele pulpe. Promjene su također bile praćene visokim titrom virusa (slika 15). U gušterači je uočena globalna degeneracija, s razbacanim difuznim i fokalnim lezijama koje su pretežito zahvatile acinarne stanice, dok su otočići jednim dijelom bili pošteđeni. Upalne promjene su jedva zamjetljive. Uočene su i citomegaličke stanice. Titar virusa u gušterači bio je značajno niži, no u drugim ranije opisanim organima (slika 15a). U mozgu nisu zamjećene patološke promjene, to je u skladu s niskim titrom virusa (slika 15a).

Oštećenja uočena u životinja kojima nisu prenesene imune stanice bila su neupalne naravi i povezana s pp89 imunoreaktivnošću što ukazuje na citopatogenu virusnu replikaciju kao primarni uzrok tkivnog oštećenja.

Dvanaestog dana nakon infekcije histopatologija je pokazala u jetri zaraženih životinja teška multifokalna oštećenja s koagulacijskom nekrozom, ali bez upalnih promjena. Imunohistokemija je pokazala jasnu povezanost žarišta koagulacijske nekroze s  $\beta$ -galaktozidaza (slika 17) i pp89 (slika 18) pozitivnim stanicama. Zanimljivo je uočiti da globalno oštećenje jetre kakvo smo uočili u SGV infekciji (slika 2), nije prisutno u infekciji imunoneđostatnih životinja s MCMV izolatom iz kulture tkiva. Osim toga adoptivni prijenos CD8<sup>+</sup> limfocita T (grupe III i IV) nije samo kvantitativno smanjio oštećenja u jetri, već su se ona i kvalitativno razlikovala sastojeći se od rijetkih, malih, upalnih žarišta (18b). U tim grupama pozitivna imunoreaktivnost prema pp89 bila je izuzetno rijetka i primijećena samo pojedinačno (slika 18e). U grupi V, CD4<sup>+</sup> limfociti T su

spriječili teško oštećenje jetre, a može se uočiti da su patohistološka oštećenja morfološki slična onima zamijećenim u grupama I i II (slika 18c). Imunohistokemija se pokazala pozitivnom u manjim nakupinama stanica i rijetkim individualnim stanicama (slika 18f).

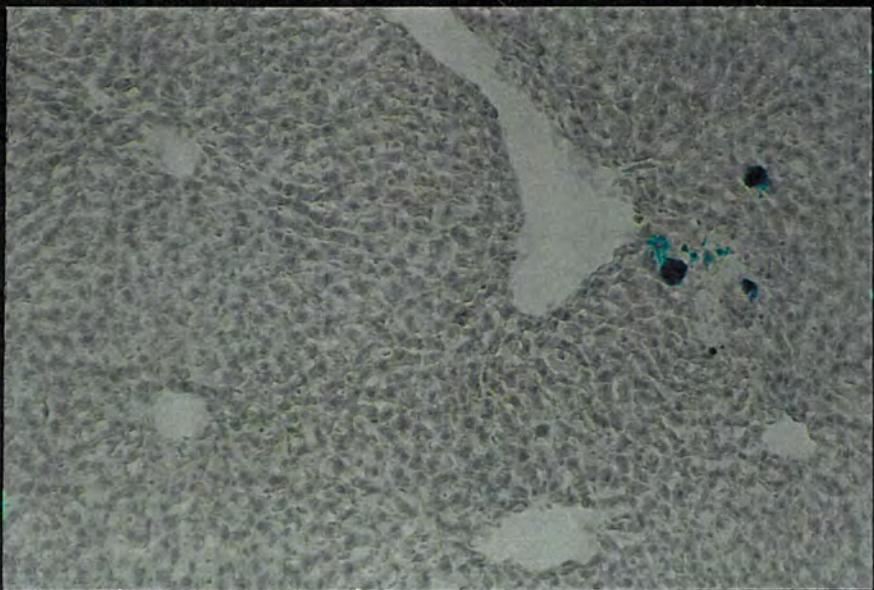
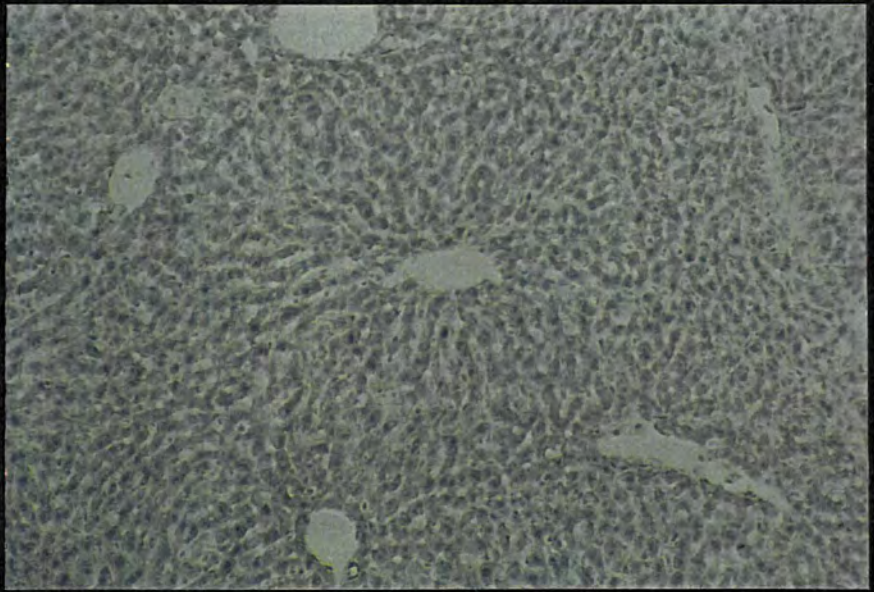
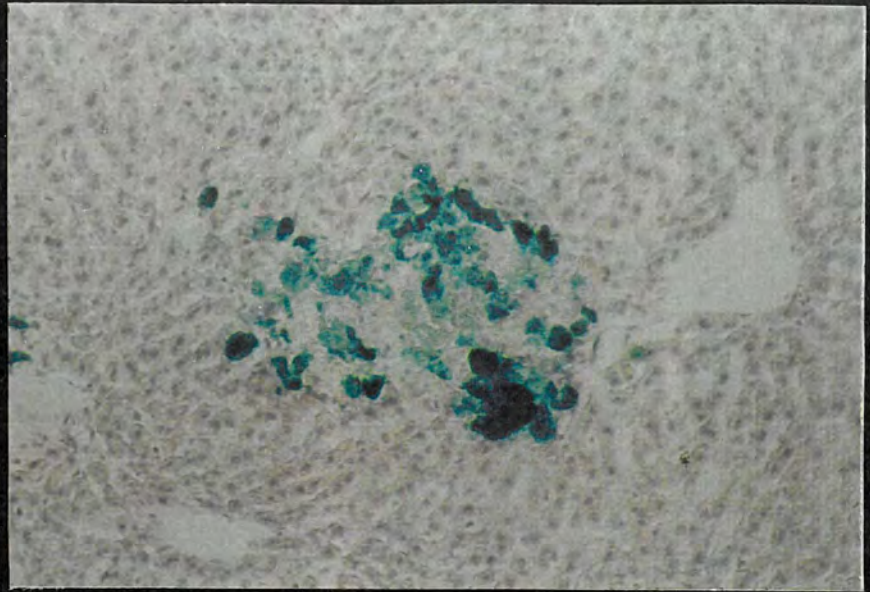
Navedeno potvrđuje osjetljivost jetre za MCMV replikaciju i posljedično jetreno oštećenje kao i kontrolu virusne replikacije imunološkim mehanizmima. Rezultati eksperimenta pokazuju značaj  $CD8^+$  limfocitne T subpopulacije pri kontroli virusne replikacije u jetri i očuvanju jetrene funkcije.

### ***Slika 17. Lokalizacija virusa u jetri pomoću $\beta$ -galaktozidaze***

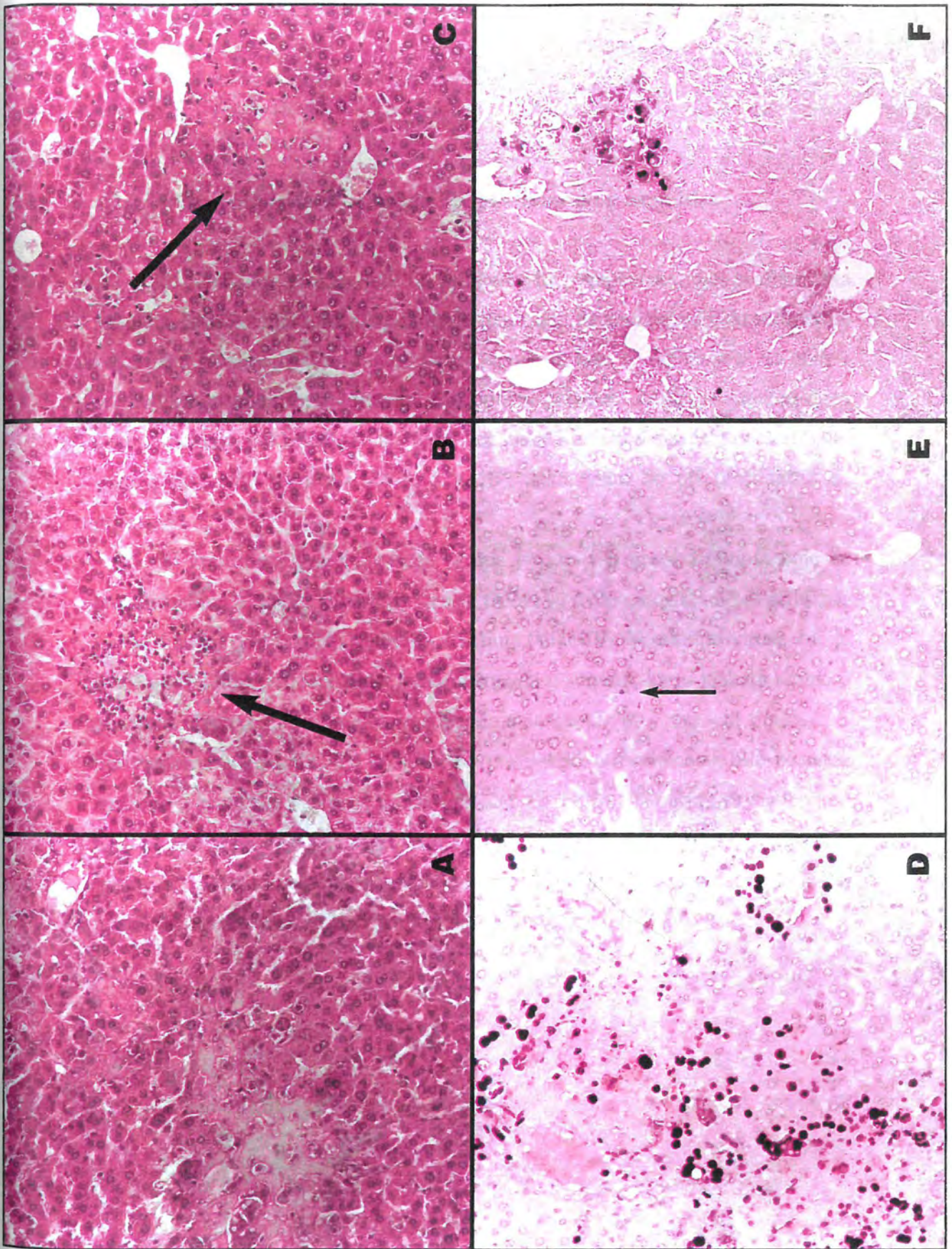
*Prikazana je lokalizacija virusa u jetrenom tkivu uz pomoć detekcije  $\beta$ -galaktozidaze u inficiranim stanicama. Na slici su prikazani histološki rezovi jetrenog tkiva u inficiranih životinja koje nisu primile prenesene stanice (gornja slika), koje su primile imune T stanice (srednja slika) i koje su primile imune stanice depletirane za  $CD8^+$  limfocitnu T subpopulaciju.*

### ***Slika 18. Limfociti T umanjuju patohistološko oštećenje jetre***

*Prikazane su morfološke promjene u histopatološkim rezovima jetrenog tkiva bojanog hemalaun eozinom (A,B,C) te rasprostranjenost virusa u jetri u imunohistološkim rezovima (D,E,F). Jetrene lezije su označene debelim strelicama. Prijenos neimunih limfocita T (grupa II) doveo je do velikih, teških multifokalnih lezija s koagulacijskom nekrozom - prikazane debelim strelicama (A). Pozitivna imunoreaktivnost je potvrđena imunohistokemijskom analizom (D). Prijenos imunih stanica depletiranih za  $CD4^+$  limfocitnu T subpopulaciju (grupa IV) doveo je do rijetkih inflamatornih žarišta (B) uz slabo pozitivnu imunohistokemiju (E). Prijenos imunih stanica depletiranih za  $CD8^+$  limfocitnu T subpopulaciju (grupa V) doveo je do rijetkih žarišta nekroze (C) i nakupina imunoreaktivnih stanica (F).*



Slika 17.

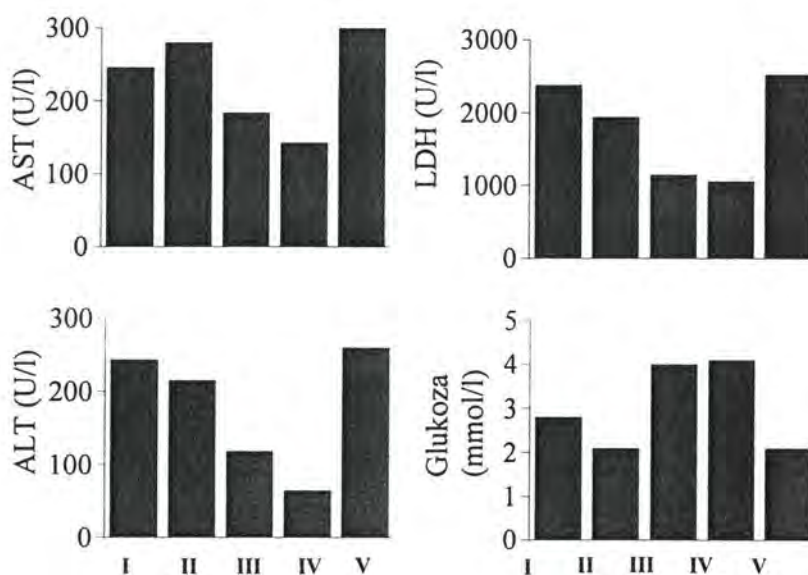
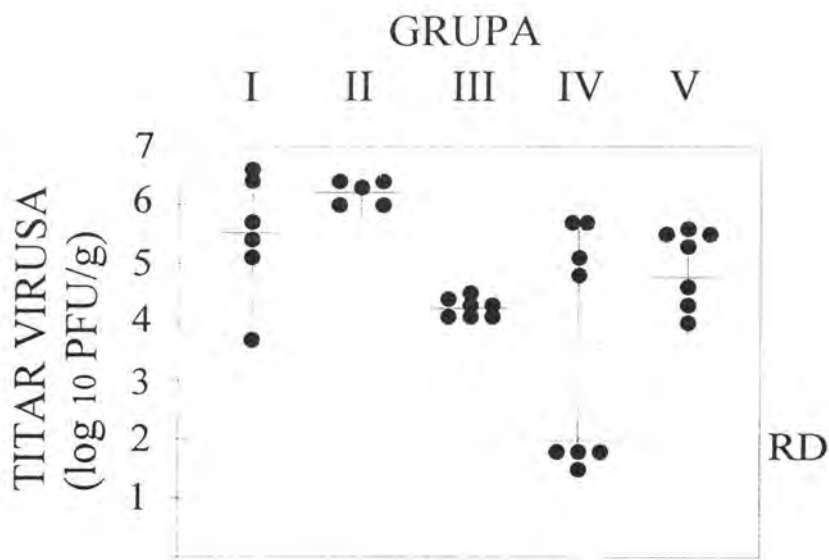


Slika 18.

#### 4.2.2. Adoptivni prijenos u terapiji MCMV izazvanog hepatitisa

U kliničkoj praksi bila bi primjenjivija terapijska, no profilaktička primjena citoimunoterapije adoptivnim prijenosom pa smo proveli eksperiment u kojem smo postavili takav model. Grupe životinja nisu se razlikovale od onih u prethodno opisanom eksperimentu, a adoptivni prijenos činjen je sedmog dana nakon infekcije, dakle kada su životinje već imale klinički manifestnu bolest. Broj stanica koje smo prenosili bio je  $5 \times 10^6$ , dakle veći, no pri profilaktičkom prijenosu.

U kontrolnoj grupi životinja (grupa I), kao i u grupi životinja koje su primile neimune stanice (grupa II) virusni titrovi su dvanaestog dana bili približno visoki kao i u profilaktički tretiranih životinja (slika 19). Visok titar virusa, bio je praćen povišenim vrijednostima jetrenih enzima u serumu, kao i niskom razinom glikemije. U grupama u kojima su životinjama adoptivno preneseni limfociti T titrovi virusa bili su niži. To je, kao i pri profilaktičkom prijenosu, bilo posebno izraženo u grupi bez deplecije prenesenih stanica (grupa III) i grupi sa deplecijom  $CD4^+$  limfocita T (grupa IV), a slabije u grupi s deplecijom  $CD8^+$  limfocita T (grupa V). Titar virusa bio je praćen poremećenim vrijednostima laboratorijskih parametara u serumu kao i pri profilaktičkom tretmanu (slika 19).



**Slika 19. Adoptivni prijenos u terapiji MCMV hepatitisa**

Virusni titar u jetri i vrijednosti glukoze, AST, ALT i LDH u  $\gamma$ -ozračenih životinja dvanaestog dana nakon infekcije s MCMV iz kulture tkiva. Životinjama je sedmi dan nakon infekcije preneseno  $5 \times 10^6$  neimunih (grupa II), odnosno imunih stanica (grupe III, IV, V). U grupi IV životinjama je depletirana  $CD4^+$ , a u grupi V  $CD8^+$  limfocitna T subpopulacija. Svaka točka predstavlja virusni titar u jedne životinje, dok stupci predstavljaju vrijednosti zajednički sakupljenih seruma svih životinja u grupi. Postoji statistički značajna razlika u količini virusa u jetri između grupa I i III ( $p < 0.001$ ), I i IV ( $p < 0.05$ ) i I i V ( $p < 0.01$ ).

## 5. RASPRAVA

CMV infekcija je vrlo rasprostranjena u ljudskoj populaciji. U imunokompetentnih domaćina najčešće je asimptomatska, a virus nakon početne replikacije u tkivima ostaje u stanju latencije. Za razliku od toga u imunone dostatnih ljudi i životinja CMV predstavlja jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta, bilo u obliku primarne infekcije, bilo zbog reaktivacije latentnog virusa (20, 77, 88). Odgovarajući stanični imuni odgovor temelj je u borbi protiv primarne infekcije, kao i u sprječavanju reaktivacije tijekom latencije (87, 167). Jetra je pogodan organ za virusnu replikaciju pa je hepatitis vodeća klinička komplikacija u imunokompromitiranih bolesnika s CMV infekcijom. Budući da je CMV specifičan za vrstu koristili smo mišji CMV kao model za izučavanje CMV infekcije u ljudi (142, 178). Istraživanja smo provodili na dva različita MCMV modela s namjerom da razjasnimo patofiziološke mehanizme jetrenog oštećenja pri CMV infekciji.

U eksperimentima provedenim na modelu infekcije s MCMV izoliranim iz žlijezda slinovnica ustanovili smo temeljni značaj limfocita T u borbi protiv virusnog hepatitisa. Također, uspjeli smo dokazati da je patogenetski mehanizam infekcije povezan s imunosupresijom koju direktnim djelovanjem na imunološki aktivne stanice u slezeni izaziva virus. Na drugom eksperimentalnom modelu adoptivnim smo prijenosom limfocita T u imunodeficijentne životinje inficirane tkivnim izolatom MCMV pokazali da je CD8<sup>+</sup> subpopulacija limfocita T najznačajnija u kontroli virusne replikacije i posljedično tome jetrenog oštećenja.

Ranije studije na mišjem modelu pokazale su da je oštećenje jetre vjerovatno, primarni uzrok smrti u životinja inficiranih s MCMV izoliranim iz žlijezda slinovnica (178). Na istom smo modelu potvrdili te pretpostavke i proširili ih saznanjima o ključnoj ulozi imunosupresije izazvane virusom u razvoju jetrene bolesti. Nakon intraperitonealnog injiciranja virusa u većini se tkiva, organa i organskih sustava odvija replikacija virusa, no ipak je to u najvećoj mjeri izraženo u jetri i slezeni, organima u kojima smo uočili i najizrazitije morfološke promjene. Potvrdili smo da su histopatološke promjene u



jetri te povišene vrijednosti jetrenih enzima i hipoglikemija, praćene izrazito visokim stupnjem replikacije virusa u jetri, što ukazuje na direktan citopatogeni učinak virusa u nastajanju jetrene bolesti.

Pri letalnoj MCMV infekciji, čitava je jetra zahvaćena konfluentnim oštećenjima, koja su po histopatološkim karakteristikama slična onima u stanjima pri kojima se nailazi na visoke vrijednosti  $\text{TNF}\alpha$  (169). To nas je navelo na razmišljanje o ulozi citokina i drugih medijatora kao dodatnih čimbenika u CMV izazvanom oštećenju jetre. Naša daljnja istraživanja su potvrdila da su povišene vrijednosti  $\text{TNF}\alpha$  izazvane letalnom dozom SGV dovoljno visoke da imaju utjecaja na patofiziološke promjene u jetri. Petog postinfekcijskog dana uočili smo također izrazito visoke vrijednosti  $\text{IFN}\gamma$  u letalno inficiranih životinja. Intenzitet bolesti i patohistološke promjene u inficiranih životinja bili su u korelaciji s vrijednostima  $\text{TNF}\alpha$  i  $\text{IFN}\gamma$ . Životinje koje smo koristili u našim eksperimentima pokazivale su u dane pred ugibanje izrazitu adinamiju, gubitak na težini, hipotermiju i krvarenja iz probavne cijevi. Vrijednosti  $\text{TNF}\alpha$  dosezale su vrijednosti koje se vide u životinja sa sindromom endotoksičnog šoka (203). Može se pretpostaviti da ovaj citokin ima važnu ulogu u oštećenju jetre, odnosno ekspresiji bolesti koja podsjeća na endotoksični šok. Naši rezultati ukazuju da bi T stanice mogle biti odgovorne za porast vrijednosti  $\text{TNF}\alpha$  i  $\text{IFN}\gamma$  koje se javljaju petog dana nakon infekcije letalnom dozom SGV, jer deplecija  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  limfocitnih T subpopulacija pri infekciji letalnom dozom, rezultira nižim vrijednostima ovih citokina. Vrijednosti  $\text{TNF}\alpha$  najviše su u miševa inficiranih letalnom dozom, neposredno pred njihovo ugibanje, što govori u prilog tezi da bi  $\text{TNF}\alpha$  mogao biti uz direktno oštećenje jetre virusom primarni uzrok smrti u tih životinja.

Uočili smo da je praćenje virusne replikacije u jetri dobar pokazatelj tijeka i ishoda bolesti. Pri infekciji subletalnom dozom virusni titar je bio zamjetno niži petog dana nakon infekcije (što je odgovaralo gubitku pp 89 imunoreaktivnosti) dok je pri infekciji letalnom dozom virusni antigen, odnosno virusni titar, za

čitava tijeka bolesti perzistirao u jetri. Uočili smo da je preživljavanje životinja u direktnoj korelaciji s virusnom replikacijom u jetri, ali ne i u drugim organima.

Naši rezultati ukazuju da se pri izlaganju subletalnoj dozi virusa limfociti T mogu učinkovito suprostaviti infekciji i kontrolirati replikaciju virusa u jetri te posljedično dovesti do normalizacije jetrenih funkcija i preživljavanja inficiranih životinja. Potvrda za to je i teška jetrena disfunkcija i smrt subletalno inficiranih životinja kojima smo depletirali limfocite T. Pri infekciji letalnom dozom izražena replikacija virusa dovodi do imunodeficijencije pa je dodatna deplecija limfocita T od manjeg značaja. To je potvrđeno činjenicom da pri infekciji letalnom dozom imamo teško oštećenje limfoidnih organa, izraženu depleciju stanica u slezeni i suprimiran imuni odgovor. Iako i subletalno inficirane životinje također pokazuju suprimiran imuni odgovor u reakciji kasne preosjetljivosti, histopatološke promjene ukazuju na oporavak imunih stanica petog dana nakon infekcije. Ishod infekcije nedvojbeno je povezan s količinom limfocita T koji su depletirani u slezeni. Pokazali smo da su vrijednosti titra virusa u slezeni kod letalno inficiranih životinja značajno niže u depletiranih životinja, no u nedepletiranih. Možda bi upravo T stanice u slezeni mogle biti ciljne stanice za virusnu replikaciju u tom organu. Moguće je također da odsustvo T stanica dovodi do pojačane replikacije u ranim danima infekcije i uništenja ciljnih stanica prije petog postinfekcijskog dana.

Zbog posebnog kliničkog značaja koji CMV infekcija ima u imunonekastatnih bolesnika bilo je zanimljivo vidjeti kako će se infekcija razvijati u životinja imunosuprimiranih subletalnom dozom  $\gamma$  zračenja. U takvih imunodeficijentnih životinja inficiranih s manje virulentnim MCMV (virus pasiran u kulturi tkiva) uočili smo oštećenje jetre s multiplom koagulativnom nekrozom bez upalnih promjena, a uz citomegaličke stanice udružene s fokalnim lezijama. U našim eksperimentima na ovom modelu pokazali smo da je životinjama potrebno profilaktički adoptivno prenijeti samo  $10^5$  imunih stanica da bismo kontrolirali virusnu replikaciju u jetri. Ovaj broj stanica ne kontrolira virusnu replikaciju u drugim organima što je u skladu s jednom ranijom studijom u kojoj je isti broj adoptivno prenesenih stanica osam dana nakon infekcije

kontrolirao virusnu replikaciju u jetri, ali ne i u drugim organima (167). U slučaju terapijskog adoptivnog prijenosa sedmog dana nakon infekcije, sličan smo učinak uspjeli postići s većom količinom imunih stanica ( $5 \times 10^6$ ), no važno je primijetiti da su životinje primile stanice kada su već pokazivale znakove izrazite iscrpljenosti i oštećenja organa.

Naši rezultati potvrđuju da su za kontrolu virusne infekcije u jetri posebno važni  $CD8^+$  limfociti T. Mogućnost da se infekcija u jetri kontrolira uz pomoć malog broja  $CD8^+$  limfocita T ukazuje da su uz litičke mehanizme u kontrolu virusne replikacije uključeni i necitolitički mehanizmi. Ranije su studije pokazale da su  $TNF\alpha$  i  $IFN\gamma$  kao produkti imunih stanica važni medijatori u kontroli replikacije MCMV (68, 69, 114, 148). Osim toga i u kontroli virusnog hepatitisa B nedavno je pokazano da su necitolitički mehanizmi od temeljnog značaja, osobito kada je velik broj jetrenih stanica zahvaćen infekcijom (32). Postavlja se ipak, pitanje, zašto bi upravo jetra, bila tako osjetljiva na citokinima posredovanu kontrolu virusnih infekcija? Razlozi najvjerojatnije leže u razgranatoj vaskularnoj mreži jetre, koja omogućava uspješno i brzo prenošenje humoralnih medijatora, od mjesta stvaranja, do mjesta djelovanja. Takva uspješna imunološka kontrola u jetri može objasniti zašto virusni titar pri subletalnoj dozi u inficiranoj jetri pada već petog postinfekcijskog dana, dok je u drugim organima istodobno u porastu.

Na osnovi navedenih činjenica postavili smo hipotezu koja objašnjava patogenezu infekcije SGV u imunokompetentnih životinja. Pri infekciji subletalnom dozom SGV replicira u brojnim tkivima i organima, a osobito u jetri i slezeni. Virusna replikacija i/ili oslobađanje humoralnih faktora dovodi do deplecije limfocitnih subpopulacija u slezeni i posljedične tranzitorne imunosupresije u ovih životinja. Ipak, dovoljna količina  $CD8^+$  limfocita T izbjegne uništenje i postaje medijator u kontroli virusne infekcije petog dana nakon infekcije, dakle istodobno kada se uočava i pad virusnog titra u jetri. Iako je jetra oštećena od posljedica infekcije, mehanizmi imune kontrole ograničavaju ovo oštećenje, dovode do oporavljanja jetrene funkcije i omogućavaju preživljavanje životinja. Nasuprot subletalnoj infekciji, pri letalnoj infekciji veći je broj stanica oštećen u ranoj fazi infekcije, a istodobno su i mnogo veća

oštećenja organa. Viši stupanj virusne replikacije i oslobađanje potencijalno štetnih količina citokina i /ili drugih humoralnih medijatora dovodi do kompletne destrukcije jetre i slezene. Masivna deplecija limfocita onemogućava životinje u pružanju odgovarajućeg imunog odgovora tako da se ne može ponovno uspostaviti jetrena funkcija pa životinje ugibaju oko petog dana nakon infekcije.

Iz navedenih rezultata proizlazi da je imunosupresija ključni faktor o kojem ovisi ishod bolesti. To je u skladu i s ishodom bolesti kod ljudi, jer je fatalni ishod CMV infekcije gotovo uvijek povezan s kompromitiranošću imunog sustava, dok u imunokompetentnih najčešće nemamo klinički manifestnu bolest (26, 91, 208). Osim toga CMV infekcija je zbog povećanja imunoneдостatnosti dopunski faktor rizika za razvoj sekundarnih infekcija u bolesnika koji su primili transplantat ili boluju od AIDS-a (30, 45, 163). CMV infekcija povezana je s imunosupresijom preko različitih mehanizama kao što su povećanje osjetljivosti nezrelih timocita prema apoptozi (97), indukcija TGF- $\beta$ 1(125) IFN $\alpha$  (136), interleukina 1 i 2 (91) inhibicija monocita (22, 171), NK stanica i T stanične funkcije (176). Mehanizam imunosupresije nakon infekcije SGV je nepotpuno razjašnjen, ali smatramo da je masivna deplecija limfocita u slezeni barem jednim dijelom odgovorna za taj fenomen. U ljudi je CMV infekcija od kliničkog značaja pretežito kao oportunistička infekcija koja se javlja u imunokompromitiranih ili imunodeficijentnih bolesnika. To ukazuje na mogućnost da se klinički manifestan CMV hepatitis može javiti u svakog bolesnika kod kojeg virus izazove imunosupresiju ili pojača postojeću.

Našim istraživanjima na mišjem modelu smo potvrdili ključnu ulogu stanične imunosti u nadzoru CMV infekcije, s posebnim naglaskom na kontrolu jetrenog oštećenja. Pokazali smo osim toga da su u patogenezi ove bolesti značajna dva do sada nedovoljno poznata mehanizma kojima virus može dovesti do oštećenja domaćina. To su virusom izazvana deplecija limfocita T i B s posljedičnom imunosupresijom te visoka razina citokina (TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$ ). U vremenima kada se broj imunoneдостatnih bolesnika povećava dijelom zbog uspjeha, a dijelom zbog nemoći suvremene medicine pojašnjavanje patogenetskih

mehanizama CMV infekcije i njenih komplikacija olakšava pravilan medicinski pristup ovoj grupi bolesnika.

## 6. ZAKLJUČNI PREGLED

1. Jetra je vrlo osjetljiva na CMV infekciju izazvanu letalnom dozom ovog virusa izoliranog iz žlijezda slinovnica, što se očituje oštećenjem jetrenih funkcija i uništenjem normalne jetrene strukture. Visoki titar virusa u jetri primijećen je i u miševa inficiranih subletalnom dozom. Petog dana nakon infekcije titar virusa u jetri počinje padati, za razliku od drugih organa u kojima istovremeno raste. Sposobnost kontrole virusne replikacije u jetri povezana je s preživljavanjem, što ukazuje na hepatitis kao primarni uzrok smrti u miševa inficiranih sa SGV.

2. Deplecija limfocita T rezultira kod miševa inficiranih subletalnom dozom brzim razvojem bolesti i teškim jetrenim oštećenjem sličnim onome pri letalnoj infekciji.

3. U slezeni, infekcija letalnom dozom dovodi do značajno višeg stupnja replikacije virusa i tkivnog oštećenja, no infekcija subletalnom dozom. Involucija timusa uočena je pri infekciji letalnom dozom, iako titar virusa nije bio visok. Oštećenje slezene i ostalih limfoidnih organa može ograničiti učinkovitost imunog odgovora i dovesti do nekontrolirane virusne replikacije u jetri i drugim organima.

4. Imunohistokemijskim tehnikama i protočnom citometrijom utvrđena je u inficiranim slezenama deplecija limfocita T i u nešto manjoj mjeri limfocita B te relativni porast makrofaga. Snažna imunosupresija tijekom infekcije sa SGV, vjerovatno je izravna posljedica deplecije limfocita T i B.

5. Visoke vrijednosti  $TNF\alpha$  i  $IFN\gamma$  povezane su s aktivnošću limfocita T i predstavljaju dopunski čimbenik u kontroli virusne infekcije u jetri. Budući da su vrijednosti  $TNF\alpha$  dosezale razine koje su opisane u životinja kojima je induciran

sindrom endotoksičnog šoka, pretpostavljamo da ovaj citokin igra važnu ulogu u oštećenju jetre.

6. Infekcija  $\gamma$  ozračenih miševa (6,5 Gy) s MCMV iz kulture tkiva rezultirala je oštećenjem jetre s multiplom koagulativnom nekrozom, ali bez upalnih promjena, uz citomegaličke stanice udružene s fokalnim lezijama.

7. Prenošenjem imunih limfocita T može se djelotvorno kontrolirati CMV replikacija u jetri i održavati nivo virusa ispod praga detekcije do dvanaestog postinfekcijskog dana. Jetra nije samo jedan od najosjetljivijih organa za replikaciju virusa, već je i najosjetljiviji organ u kontroli virusne infekcije pomoću imunih stanica.

8. Imune stanice dovode do pada virusnog titra i oporavka jetrene funkcije i kada se prenesu životinjama koje su već razvile bolest, no tada je potrebno prenijeti znatno više imunih stanica.

9. U sprječavanju tkivnog oštećenja izazvanog virusom najvažniji su  $CD8^+$  limfociti T. Histopatološke promjene u obliku rijetkih nekrotičnih žarišta bile su prisutne u životinja koje su primile imune stanice depletirane za jednu od T limfocitnih subpopulacija.  $CD4^+$  stanice mogu umanjiti teške histopatološke promjene i djelomično spasiti jetrenu funkciju, mada ne mogu djelotvorno utjecati na virusnu replikaciju.

## 7. LITERATURA

1. Adorini L., Appella E., Doria G., Cardinaux F., Nagy Z.A. (1989) Competition for antigen presentation in living cells involves exchange of peptides bound by class II MHC molecules. *Nature* 342:800-3
2. Aldrete J.S., Sterling W.A., Hathaway B.M., Morgan J.M., Diethelm A.G. (1975) Gastrointestinal and hepatic complications affecting patients with renal allografts. *Am J Surg* 129:115-24
3. Asanuma H., Numazaki K., Nagata N., Chiba S. (1995) Cytokine response and polymerase chain reaction study of peripheral blood mononuclear cells in infants with human cytomegalovirus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 12:153-8
4. Badley A.D., Patel R., Portela D.F., Harmsen W.S., Smith T.F., Ilstrup D.M., Steers J.L., Wiesner R.H., Paya C.V. (1996) Prognostic significance and risk factors of untreated cytomegalovirus viremia in liver transplantation recipients. *J Infect Dis* 173:446-9
5. Balfour H.H., Heussner R.C. (1993) Cytomegalovirus infection and liver transplantation: an overview. *Transplant Proc* 25:2012-3
6. Balter M. (1995) Elusive HIV - suppressor factors found. *Science* 270:1560-1
7. Bancroft G.J., Shellam G.R., Chalmer J.E. (1981) Genetic influences on the augmentation of natural killer (NK) cells during murine cytomegalovirus infection: correlation with patterns of resistance. *J Immunol* 126:988-94



8. Barkholt L.M., Ehrnst A., Veress B. (1994) Clinical use of immunohistopathologic methods for the diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in human liver allograft biopsy specimens. *Scan J Gastroenterol* 29:553-60
9. Bartholomaeus W.N., O'Donoghue H., Reed W.D. (1984) Thymus - dependence of autoantibody responses to liver specific lipoprotein in the mouse. *Clin Exp Immunol* 55:541-5
10. Biron C.A., Byron K.S., Sullivan J.L. (1989) Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *New Eng J Med* 320:1731-5
11. Blumberg B.S., Alter H.J., Visnich S. (1965) A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191:541-4
12. Boeckh M., Gooley T.A., Reusser P., Buckner C.D., Bowden R.A. (1995) Failure of high - dose acyclovir to prevent cytomegalovirus disease after autologous marrow transplantation. *J Infect Dis* 172:939-43
13. Boppana S.B., Pass R.F., Britt W.J., Stagno S., Alford C.A. (1992) Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 11:93-9
14. Bowden R.A., Fisher L.D., Rogers K., Cays M., Meyers J.D. (1991) Cytomegalovirus (CMV)-specific intravenous immunoglobulin for the prevention of primary CMV infection and disease after marrow transplant. *J Infect Dis* 164:483-7
15. Brainard J., Greenon J.K., Vesny C.J., Tesi R.J., Papp A.C., Snyder P.J., Western L., Prior T.W. (1994) Detection of cytomegalovirus in liver transplant biopsies. *Transplantation* 57:1753-7

16. Bratcher D.F., Bourne N., Bravo F.J., Schleiss M.R., Slaoui M., Myers M.G., Bernstein D. (1995) Effect of passive antibody on congenital cytomegalovirus infection in Guinea pigs. *J Infect Dis* 172:944-50

17. Brazelton T.R., Morris R.E. (1996) Molecular mechanisms of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK 506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leflunomide. *Curr Opin Immunol* 8:710-20

18. Brechot C. (1996). Hepatitis C Virus: Molecular biology and genetic variability. *Dig Dis Sci* 41(suppl):6S-21S

19. Breinig M.K., Zitelli B., Starzl T.E., Ho M. (1987) Epstein - Barr virus, cytomegalovirus, and other viral infections in children after liver transplantation. *J Infect Dis* 156:273-9

20. Britt W.J., Alford C.A. (1996) Cytomegalovirus. In: *Fields Virology*, Third edition. Ed. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, p. 2493-523

21. Bronshter O., Makowka L., Jaffe R., Demetris A.J., Breining M.K., Ho M., Esquivel C.O., Gordon R.D., Iwatsuki S., Tzakis A., Marsh J.W. Jr., Mazzaferro V., Van Thiel D., Starzl T.E. (1988) Occurrence of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant patients. *J Med Virol* 24:423-4

22. Buchmeier N.A., Cooper N.R. (1989) Suppression of monocyte functions by human cytomegalovirus. *Immunology* 66:278-83

23. Bukowski J.F., Warner J.F., Dennert G., Welsh R.M. (1985) Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effects of NK cells in vivo. *J Exp Med* 161:40-52

24. Bukowski J.F., Woda B.A., Habu S., Okumura K., Welsh R.M. (1983) Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus - induced hepatitis in vivo. *J Immunol* 131:1531-8
25. Bukowski J.F., Woda B.A., Welsh R.M. (1984) Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol* 52:119-28
26. Carney W.P., Hirsch M.S. (1981) Mechanisms of immunosuppression in cytomegalovirus mononucleosis. II. Virus monocyte interactions. *J Infect Dis* 144:47-A54
27. Carter A.R. (1968) Cytomegalovirus disease presenting as hepatitis. *Br Med J* 3:786.
28. Chalmer J.E., Mackenzia J.S., Stanley N.F. (1977) Resistance to murine cytomegalovirus linked to the major histocompatibility complex of the mouse. *J Gen Virol* 37:107-14
29. Chang M.H., Huang H.H., Huang E.S., Kao C.L., Hsu H.Y., Lee C.Y. (1992) Polymerase chain reaction to detect human cytomegalovirus in livers of infants with neonatal hepatitis. *Gastroenterology* 103:1022-5
30. Chatterjee S.N., Fiala M., Weiner J., Steward J.A., Stacey B., Warner N. (1978) Primary cytomegalovirus and opportunistic infections: incidence in renal transplant recipients. *JAMA* 240:2446-9
31. Chisari F.V. (1996) Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 206:149-73

32. Chisari F.V., Ferrari C. (1995) Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 13:29-60
33. Cobbold S.P., Jayasuriya A., Nash A., Prospero T.D., Waldman H. (1984) Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 312:548-50
34. Colina F., Juca N.T., Moreno E., Ballestin C., Farina J., Nevado M., Lumbreras C., Gomez-Sanz R. (1995) Histological diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver allografts. *J Clin Pathol* 48:351-7
35. Collins T.M., Quirk M.R., Jordan M.C. (1994) Biphasic viremia and viral gene expression in leukocytes during acute cytomegalovirus infection of mice. *J Virol* 68:6305-11
36. Conry-Cantilena C., Vanraden M., Gibble J., Melpolder J., Shakil A.O., Viladomiu L., Cheung L., Dibisceglie A., Hoofnagle J., Shih J.W., Kaslow R., Ness P., Alter H.J. (1996) Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 334:1691-6
37. Crawford J.M. (1994) The liver and the biliary tract. In: Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. *Pathologic basis of disease*. W.B. Saunders company, Philadelphia, p. 831-97
38. Cuturi M.C., Anegon I., Sherman F., Loudon R., Clark S.C., Perussia B., Tricheiri L. (1989) Production of hematopoietic colony - stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med* 169:569-83
39. Davis G.L., Hoofnagle J.H., Waggoner J.G. (1984) Acute type A hepatitis during chronic hepatitis B virus infection: association of depressed hepatitis B

virus replication with appearance of endogenous alpha inteferon. *J Med Virol* 14:141-7

40. Del Val M., Schlicht H.J., Volkmer H., Messerle M., Reddehase M.J., Koszinowski U.H. (1991) Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J Virol* 65:3641-6

41. Devlin J., Wendon J., Heaton N., Tan K., Williams R. (1995) Pretransplantation clinical status and outcome of emergency transplantation for acute liver failure. *Hepatology* 21:1018-24

42. Dixon F.J., Vazquez J.J., Weigle W.O., Cochrane C.G. (1958) Pathogenesis of serum sickness. *Arch Pathol* 65:18-28

43. Donahue J.G., Munoz A., Ness P.M., Brown D.E., Yawn D.H., McAllister H.A. Jr., Reitz B.A., Nelson K.E. (1992) The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 327:369-73

44. Dworsky M.E., Yow M., Stagno S., Pass R.F., Alford C.A. (1983) Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* 72:295-9

45. Einhorn L., Ost A. (1984) Cytomegalovirus infection of human blood cells. *J Infect Dis* 149:207-14

46. Ellis A.J., Saleh M., Smith H. (1995) Late-onset failure: clinical features, serology and outcome following transplantation. *J Hepatol* 23:363-72

47. Ellis A.J., Wendon J.A., Portmann B., Williams R. (1996) Acute liver damage and ecstasy ingestion. *Gut* 38:454-8

48. Erice A., Jordan M.C., Chace B.A., Fletcher C., Chinnock B.J., Balfour H.H. Jr. (1987) Gancyclovir treatment of cytomegalovirus disease in transplant recipients and other immunocompromised hosts. *JAMA* 257:3082-7
49. Falagas M.E., Snyderman D.R., Ruthazer R., Griffith J., Werner B.G. (1996) Primary cytomegalovirus infection in liver transplant recipients: comparison of infections transmitted via donor organs and via transfusions. *Clin Infect Dis* 23:292-7
50. Fidler H., Dillhon A., Gertner D., Burroughs A. (1996) Chronic ecstasy (3,4-methylenedioxymetamphetamine) abuse: a recurrent and unpredictable cause of severe acute hepatitis. *J Hepatol* 25:563-6
51. Finegold M.J., Carpenter R.J. (1982) Obliterative cholangitis due to cytomegalovirus: a possible precursor of paucity of intrahepatic bile ducts. *Hum Pathol* 13:662-5
52. Fontana R.J. (1997) Acute liver failure. *Curr Opin Gastroen* 13:271-9
53. Frey J., Einsfelder B. (1984) Induction of surface IgG receptors in cytomegalovirus infection fibroblasts. *Eur J Biochem* 138:213-6
54. Gerberding J.L. (1994) Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personal at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study. *J Infect Dis* 170:1410-7
55. Gibbons A.E., Price P., Shellam G.R. (1994) Bone marrow atrophy induced by murine cytomegalovirus infection. *Immunology* 82:410-8

56. Glenn J. (1981) Cytomegalovirus infections following renal transplantation. *Rev Infect Dis* 3:1151-78
57. Gooding L.R. (1992) Virus proteins that counteract host immune defenses. *Cell* 71:5-7
58. Gorenssek M.J., Carey W.D., Vogt D., Goormastic M. (1990) A multivariate analysis of risk factors for cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 98:1326-32
59. Govindarajan S., Smedile A., De Cock K.M., Valinluck B., Redeker A.G., Gerin J.L (1989) Study of reactivation of chronic hepatitis delta infection. *J Hepatol* 9:204-8
60. Gowans E.J., Bonino F. (1993) Hepatitis delta virus pathogenicity. In: Hadziyannis S.J., Taylor J.M., Bonino F. Hepatitis delta virus: molecular biology, pathogenesis, and clinical aspects. New York: Wiley Liss, 125-31
61. Grefte A., Van der Giessen M., Van Son W., Hauw T. (1993) Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 167:270-7
62. Grundy J.E., Shanley J.D., Griffiths P. (1987) Cytomegalovirus pneumonitis in transplant patients - a hypothesis. *Lancet* 1:996-9
63. Guidotti L.G., Borrow P., Hobbs M.V., Matzke B., Gresser I., Oldstone M.B.A., Chisari F.V. (1996) Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4589-94

64. Guidotti L.G., Chisari F.V. (1996) To kill or cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 8:478-83
65. Guidotti L.G., Guilhot S., Chisari F.V. (1994) Interleukin-2 and interferon alpha/beta downregulate hepatitis B virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor dependent and independent pathways. *J Virol* 68:1265-70
66. Guidotti L.G., Ishikawa T., Hobbs M.V., Matzke B., Schreiber R., Chisari F.V. (1996) Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4:25-36
67. Guilhot S., Guidotti L.G., Chisari F.V. (1993) Interleukin-2 downregulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice by a post-transcriptional mechanism. *J Virol* 67:7444-9
68. Haagmans B.L., Stals F.S., Van der Meide P.H., Bruggeman C.A., Horyinek M.C., Schijns E.C.J. (1994) Tumor necrosis factor alpha promotes replication and pathogenicity of rat cytomegalovirus. *J Virol* 68: 2297-2304
69. Haagmans B.L., Van den Eertwegh A.J.M., Claassen E., Horzinek M.C., Schijns V.E.C. (1994) Tumour necrosis factor -  $\alpha$  production during cytomegalovirus infection in immunosuppressed rats. *J Gen Virol* 75:779-87
70. Haagmans B.L., Van der Meide P.H., Stals F.S., Van der Eertwegh A.J.M., Claassen E., Bruggeman C.A., Horzinek M.C., Schijns E.C.J. (1994) Suppression of rat cytomegalovirus replication by antibodies against gamma interferon. *J Virol* 68:2305-12
71. Hadler S.C. (1991) Global patterns of hepatitis A virus infection: changing patterns. In: viral hepatitis and liver disease. Edited by Hollinger F.B., Lemon S.M., Maragolis H. Baltimore: Williams and Wilkins p.14-20



72. Hanan C., Munoz S.J., Rubin R.R. (1995) Histopathological heterogeneity in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 21:345-51

73. Harbison M.A., Girolami P.C., Jenkins R.L., Hammer S.M. (1988) Ganciclovir treatment of severe cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 46:82-8

74. Heni N., Heissmeyer H.H., Baumgartner M. (1986) Clinical course of cytomegalovirus infection in adults. *Dtsch Med Wochenschr* 111:499-503

75. Hertenstein B., Hampl W., Bunjes D., Wiesneth M., Duckner C., Koszinowski U.H., Heimpel H., Arnold R., Mertens T. (1995) In vivo/ex vivo T cell depletion for GVDH prophylaxis influences onset and course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT. *Bone Marrow Transplant* 15:387-93

76. Hertogs K., Leenders W.P., Depla E. (1993) Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* 197:549-57

77. Ho M. (1990) Cytomegalovirus. In: Principles and practice of infectious disease (3rd Edition) Editors: Mandell G.L., Douglas G.R., Bennett J.E. Churchill Livingstone p. 1159-74

78. Holland P.V. (1996) Viral infections and the blood supply. *N Engl J Med* 334:1734-5

79. Hoofnagle J.H., Carithers R.L., Shapiro C., Ascher N. (1995) Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 21:240-52

80. Howard C.S., Ellis D.S., Simpson D.I.H. (1984) Exotic viruses and the liver. *Semin Liv Dis* 4:361-6
81. Ibanez E.C., Schrier R., Ghazal P., Wiley C., Nelson J.A. (1991) Human cytomegalovirus productively infect primary differentiated macrophages. *J Virol* 65:6581-8
82. Innis B.L., Snitbhan R., Kunsol P., Laorakpongse T., Poopatanokool W., Kozik C.A., Suntayakorn S., Suknuntapong M.A., Safary A., Targ D.B. (1994) Protection against hepatitis A by inactivated vaccine. *JAMA* 271:1328-34
83. Jacobson M.A., Cello J.P., Sande M.A. (1988) Cholestasis and disseminated cytomegalovirus disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 84:218-24
84. Janeway C.A. Jr., Travers P. (1996) *Immunobiology - The immune system in health and disease*, Second edition. Current biology Ltd., London
85. Jonjić S., Mutter W., Weiland R., Reddehase M.J., Koszinowski U.H. (1989) Site restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long term depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Exp Med* 169:1199-212
86. Jonjić S., Pavić I., Lučin P., Rukavina D., Koszinowski U.H. (1990) Efficacious control of cytomegalovirus infection after longterm depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Virol* 64:5457-64
87. Jonjić S., Pavić I., Polić B., Crnković I., Lučin P., Koszinowski U.H. (1994) Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* 179:1713-7

88. Jordan M.C. (1989) Cytomegalovirus infection (chapt. 83). In: Infectious diseases - a modern treatise of infectious processes Editors: Hoeprich PD, Jordan MC. J.B.Lippincott Company Philadelphia

89. Kagi D., Hengartner H. (1996) Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses. *Curr Opin Immunol* 8:472-7

90. Kanj S.S., Sharara A.I., Clavien P.A., Hamilton J.D. (1996) Cytomegalovirus infection following liver transplantation: review of the literature. *Clin Infect Dis* 22:537-49

91. Kapasi K., Rice G.P. (1988) Cytomegalovirus infection of peripheral blood mononuclear cells: effects on interleukin-1 and -2 production and responsiveness. *J Virol* 62:3603-7

92. Karayiannis P., Hadziyannis S.J., Kim J., Pickering J.M., Piatak M., Hess G., Yun A., McGarvey M.J., Wages J., Thomas H.C. (1997) Hepatitis G virus infection: clinical characteristic and response to interferon. *J Viral Hepat* 4:37-44

93. Katorza E., Pecht M., Apte R.N., Benharroch D., Burstein Y., Trainin N., Rager-Zisman B. (1987) Restoration of immunological responses by THF, a thymic hormone, in mice infected with murine cytomegalovirus (MCMV). *Clin Exp Immunol* 70:268-75

94. Keil G.M., Ebeling Keil A., Koszinowski U.H. (1984) Temporal regulation of murine cytomegalovirus: location, transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediately early times after infection. *J Virol* 50:784-5

95. Keil G.M., Ebeling-Keil A., Koszinowski U.H. (1987) Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. *J Virol* 61:526-33
96. Kershisnik M.M., Knisely A.S., Sun C.C., Andrews J.M., Wittwer C.T. (1992) Cytomegalovirus infection, fetal liver disease, and neonatal hemochromatosis. *Hum Pathol* 23:1075-80
97. Koga Y., Tanaka K., Lu YY, Oh-Tsu M., Sasaki M., Kimura G., Nomoto K. (1994) Priming of immature thymocytes to CD3-mediated apoptosis by infection with murine cytomegalovirus *J Virol* 68:4322-8
98. Kondo K., Kaneshima H., Mocarski S.E. (1994) Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11879-83
99. Koszinowski U.H., Del Val M., Reddehase M.J. (1990) Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 154:189-219
100. Koszinowski U.H., Jonjić S., Lučin P. (1994) Cytomegalovirus persistence by evasion from immune control. *Semin Virol* 5:297-305
101. Koszinowski U.H., Reddehase M.J. (1993) The role of T lymphocyte subsets in the control of cytomegalovirus infection. In: *Viruses and the cellular immune response* Ed: Thomas DB. Marcel Dekker Inc. New York Basel Hong Kong p. 429-45
102. Koziel M.J. (1996) Immunology and hepatitis. *Am J Med* 100:98-109
103. Krawczynski K. (1993) Hepatitis E. *Hepatology* 17:932-41

104. Krawczynski K., Bradley D.W. (1989) Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J Infect Dis* 159:1042-9
105. Laskus T., Lupa E., Cianciara J., Slusarczyk J. (1990) Cytomegalovirus infection presenting as hepatitis. *Digestion* 47:167-71
106. Lautenschlager I., Nashan B., Schlitt H.J., Hoshino K., Ringe B., Tillman H.L., Manns M., Wonigeit K., Pichlmayr R. (1994) Different cellular patterns associated with hepatitis C virus reactivation, cytomegalovirus infection and acute rejection in liver transplant patients monitored with transplant aspiration cytology. *Transplantation* 58:1339-45
107. Lazzaroto T., Paya C.V., Smith T.F., Wiesner R.H., Krom R., Landini M.P. (1992) Antibody response to cytomegalovirus (CMV) polypeptides in liver transplant recipients with CMV hepatitis. *Microbiologica* 15:15-22
108. Lechmann M., Ihlenfeldt H.G., Braunschweiger I. (1996) T- and B- cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus-positive blood donors without viremia. *Hepatology* 24:790-5
109. Lee A.U., Farrell G.C. (1997) Drug-induced liver disease. *Curr Opin Gastroen* 13:199-205
110. Leenders W.P.J., Hertogs K., Moshage H., Yap S.H. (1992) Host and tissue tropism of hepatitis B virus. *Liver* 12:51-5
111. Lefkowitz J.H. (1996) Pathology of the liver. *Curr Opin Gastroen* 12:272-9

112. Linnen J., Wages J.J., Zhang-Keck Z.Y., Fry K.E., Krawczynski K.Z., Alter H., Koonin E., Gallagher M., Alter M., Hadziyannis S., Karayiannis P., Fung K., Nakatsuji Y., Shih J.W.K., Young L., Piatak M.J., Hoover C., Fernandez J., Chen S., Zou J.C., Morris T., Hyams K.C., Ismay S., Lifson J.D., Hess G., Fong S.K.H., Thomas H., Bradley D., Margolis H., Kim J.P. (1996) Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 271:505-8

113. Lučin P., Jonjić S., Messerle M., Polić B., Hengel H., Koszinowski U.H. (1994) Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon gamma and tumor necrosis factor. *J Gen Virol* 75:101-10

114. Lučin P., Pavić I., Polić B., Jonjić S., Koszinowski U.H. (1992) Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J Virol* 66:1977-84

115. Macartney M., Gane E.J., Portmann B., Williams R. (1997) Comparison of a new quantitative cytomegalovirus DNA assay with other detection methods. *Transplantation* 63:1803-7

116. Malnati M.S., Lusso P., Cicone E., Morretta A., Morretta L., Long E.O. (1993) Recognition of virus - infected cells by natural killer cell clones is controlled by polymorphic target cell elements. *J Exp Med* 178:961-9

117. Manez R., Kusne S., Green M., Abu-Elmagd K., Irish W., Reyes J., Furukawa H., Tzakis A., Fung J.J., Todo S., Starzl T.E.R. (1995) Incidence and risk factors associated with development of cytomegalovirus disease after intestinal transplantation. *Transplantation* 59:1010-4

118. Markin R.S. (1994) Manifestations of Epstein - Barr virus - associated disorders in liver. *Liver* 14:1-9

119. Masada C.T., Shaw B.W., Zetterman R.K., Kaufman S.S., Markin R.S. (1993) Fulminant hepatic failure with massive necrosis as a result of hepatitis A infection. *Clin Gastroenterol* 17:158-62
120. McDonnell W., Lok A.S.F. (1997) Viral hepatitis. *Curr Opin Gastroen* 13:228-34
121. McIntyre K.W., Welsh R.M. (1986) Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J Exp Med* 164:1667-81
122. McMahan B.J., Williams J., Bulkow L., Snowball M., Wainwright R., Kennedy M., Drause D. (1995) Immunogenicity of inactivated hepatitis A vaccine in Alaska native children and native and non-native adults. *J Infect Dis* 171:676-9
123. Mellerick J.A., Fraser N.W. (1987) Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology* 158:265-75
124. Mercer J.A., Spector D.H. (1986) Pathogenesis of acute murine cytomegalovirus infection in resistant and susceptible strains of mice. *J Virol* 57:497-504
125. Michelson S, Alami J, Kim SJ, Danielpour D, Bachelier F., Picard L, Bessia C, Paza C., Virelizier V.L. (1994) Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1. *J Virol* 68:5730-7

126. Mocarski E.S. (1996) Cytomegaloviruses and their replication. In: Fields Virology, Third edition. Ed. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, p. 2447-92
127. Morgan D.J., Smallwood R.A. (1996) Drug - induced liver disease. *Curr Opin Gastroen* 12:246-51
128. Murphy E.L., Bryzman S., Williams A.E., Co-Chien H., Schreiber G.B., Ownby H.E., Gilcher R.O., Kleinman S.H., Matijas L., Thomson R.A., Nemo G.J. (1996) Demographic determinants of hepatitis C virus seroprevalence among blood donors. *JAMA* 275:995-1000
129. Mutter W., Reddehase M.J., Busch F.W., Buhring H., Kowszinowski U.H. (1988) Failure in generating hemapoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus in the immunocompromised host. *J Exp Med* 167:1645-58
130. Nair M.P.N., Schwartz S.A., Menon M. (1985) Association of decreased natural and antibody-dependent cellular cytotoxicity and production of natural killer cytotoxic factor and interferon in neonates. *Cell Immunol* 94:159-71
131. Nanda S.K., Ansari I.H., Acharya S.K., Jameel S., Panda S.K. (1995) Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 108:225-30
132. Negro F., Pacchioni D., Shimizu Y. (1992) Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization and comparison with histopathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2247-51
133. Neuhaus P., Blumhardt G., Bechstein W.O., Platz K.P., Jonas S., Mueller A.R., Langrehr J.M., Lohmann R., Schattenfroh N., Knoop M., Keck H., Lemmens P., Raakow R., Lusebrink R., Slama K.L., Lobeck H., Hopf U. (1995)



Comparison of FK506- and cyclosporine - based immunosuppression in primary orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 59:31-40

134. Neurath A.R., Kent S.B., Strick N., Parker K. (1986) Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46:429-36

135. Ninova D.I., Wiesner R.H., Gores G.J., Harrison J.M., Krom R.A., Homburger H.A. (1994) Soluble T lymphocyte markers in the diagnosis of cellular rejection and cytomegalovirus hepatitis in liver transplant recipients. *J Hepatol* 21:1080-5

136. Nokta M.A., Hassan M.I., Loesch K., Pollard R.B. (1996) Human cytomegalovirus induced immunosuppression. Relationship to tumor necrosis-dependent release of arachidonic acid and prostaglandin E2 in human monocytes. *J Clin Invest* 97:2635-41

137. Numazaki K., Asanuma H., Chiba S. (1996) Human cytomegalovirus infection of leukocyte populations (letter). *J Infect Dis* 173:503-4

138. O'Grady J.G., Schalm S.W., Williams R. (1993) Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 342:273-5

139. O'Grady J.G., Alexander G.J., Hayllar K.M., Williams R. (1989) Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 97:439-45

140. Ojo E., Wigzell H. (1987) Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumour target cells. *Scand J Immunol* 7:297-301

141. Oldstone M.B.A. (1989) Viral persistence. *Cell* 56:517-20

142. Olver S.D., Price P., Shellam G.R. (1994) Cytomegalovirus hepatitis: characterization of the inflammatory infiltrate in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol* 98:375-81
143. Onoratio I., Morens D., Martone W., Stansfield S. (1985) Epidemiology of cytomegalovirus infections: recommendations for prevention and control. *Rev Infect Dis* 147:40-6
144. Orange J.S., Wang B., Terhorst C., Biron C. (1995) Requirement for natural killer cell produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* 182:1045-56
145. Osborn J.E., Walker D.L. (1971) Virulence and attenuation of murine cytomegalovirus. *Infect Immunol* 3:228-36
146. Pape G.R., Rieber E.P., Eisenburg J., Hoffmann R., Balch C.M., Paumgartner G., Riethmuller G. (1983) Involvement of the cytotoxic / suppressor T - cell in liver tissue injury of patients with acute and chronic liver diseases. *Gastroenterology* 85:657-62
147. Pape G., Troye B., Axelsson B., Perlmann P. (1979) Simultaneous occurrence of immunoglobulin-dependent and immunoglobulin-independent mechanisms in natural cytotoxicity of human lymphocytes. *J Immunol* 122:2251-7
148. Pavić I., Polić B., Crnković I., Jonjić S., Koszinowski U.H. (1993) Participation of endogenous tumour necrosis factor  $\alpha$  in host resistance to cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* 74:2215-23

149. Paya C.V., Holley K.E., Wiesner R.H., Balasubramaniam K., Smith T.F., Espy M.J., Ludwig J., Batts K.P., Hermans P.E., Krom R.A. (1990) Early diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant recipients: role of immunostaining, DNA hybridization and culture of hepatic tissue. *Hepatology* 12:119-26
150. Paya C.V., Wiesner R.H., Hermans P.E., Larson-Keller J.J., Ilstrup D.M., Krom R.A., Rettke S., Smith T.F. (1993) Risk factors for cytomegalovirus and severe bacterial infections following liver transplantation: a prospective multivariate time-dependent analysis. *J Hepatol* 18:185-95
151. Peters M. (1996) Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology* 23:909-16
152. Pignatelli M., Waters J., Brown D. (1986) HLA class I antigens on the hepatocyte membrane during recovery from acute hepatitis B virus infection and during interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 6:349-53
153. Polić B. (1996) Mehanizmi imunološkog nadzora latentne herpesvirusne infekcije. Doktorska disertacija
154. Polić B., Pavić I., Crnković I., Lučin P., Trobonjača Z., Jonjić S. (1993) The role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in viral immunity. *Cro Med J* 34:294-300
155. Polish L.B., Gallagher M., Fields H.A., Hadler S.C. (1993) Delta hepatitis. Molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 6:211-29
156. Pollard R.B. (1988) Cytomegalovirus infections in renal, heart - lung and liver transplantation. *Pediatr Infect Dis* 7(5 suppl.):S97-102

157. Pollock J.L., Virgin IV H.W. (1995) Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *J Virol* 69:1762-8

158. Preiksaitis J.K., Wieczorek A.J. (1991) Persistence of cytomegalovirus in human long-term bone marrow culture: a relationship to hemopoiesis. *J Med Virol* 35:76-84

159. Preisig R. (1983) Clinical evaluation of hepatic function. *Semin Liver Dis* 3:265-354

160. Price P., Olver S.D., Gibbons A.E., Shellam G.R. (1993) B-cell activation following murine cytomegalovirus infection: implication for autoimmunity. *Immunology* 78:14-21

161. Price P., Olver S.D., Gibbons A.E., Teo H.K., Shellam G.R. (1993) Characterisation of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol* 71:155-65

162. Prober C.G., Arvin A.M. (1987) Perinatal viral infection. *Eur J Clin Microbiol* 6:245-61

163. Rand K.H., Pollard R.B., Merigan T.C. (1978) Increased pulmonary superinfections in cardiac transplant patients undergoing primary cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 298:951-3

164. Reddehase M.J., Jonjić S., Weiland F., Mutter W., Koszinowski U.H. (1988) Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis in the immunocompromised host: CD4 helper independent antiviral function of CD8 positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J Virol* 62:1061-5

165. Reddehase M.J., Keil G.M., Koszinowski U.H. (1984) The cytolytic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus. Detection of virus replication stage specific antigens by separate populations of in vivo active cytolytic T lymphocyte precursors. *Eur J Immunol* 14:56-61
166. Reddehase M.J., Koszinowski U.H. (1984) Significance of immediate-early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature* 312:369-71
167. Reddehase M.J., Weiland F., Munch K., Jonjić S., Luske A., Koszinowski U.H. (1985) Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* 55:264-73
168. Reddy M.M., Vodian M., Grieco M.H. (1990) Elevated levels of CD4 antigen in sera of human immunodeficiency virus-infected populations. *J Clin Microbiol* 28:1744-6
169. Remick D.G., Kinkel S.L. (1993) Pathophysiological alterations induced by tumor necrosis factor. *Rev Exp Path* 34B:7-25
170. Riddell S.R., Watanabe K.S., Goodrich J.M., Li C.R., Agha M.E., Greenberg P.D. (1992) Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257:238-41
171. Rodgers B.C., Scott D.M., Munding J., Sisson J.G. (1985) Monocyte - derived inhibitor of interleukin 1 induced by human cytomegalovirus. *J Virol* 55:527-32

172. Russell J., Stow N.D., Preston C.M. (1987) Herpes simplex virus genes involved in latency in vitro. *J Gen Virol* 68:3009-18

173. Scalzo A.A., Fitzgerald N.A., Simmons A., La Vista A.B., Shellam G.R. (1990) Cmv-1 a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med* 171:1469-83

174. Scalzo A.A., Fitzgerald N.A., Wallace C.R. (1992) The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol* 149:581-9

175. Schreiber G.B., Busch M.P., Kleinman S.H., Korelitz J.J. (1996) The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 334:1685-90

176. Schrier R.D., Oldstone M.B. (1986) Recent clinical isolates of cytomegalovirus suppress human cytomegalovirus activity. *J Virol* 59:127-31

177. Shanley J.D. (1990) In vivo administration of monoclonal antibody to the NK1.1 antigen of natural killer cells: effect on acute murine cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 30:58-60

178. Shanley J.D., Biczak L., Forman S.J. (1993) Acute murine cytomegalovirus infection induces lethal hepatitis. *J Infect Dis* 167:264-9

179. Sheen I.S., Liaw Y.F., Lin D.Y., Chu C.M. (1994) Role of hepatitis C and delta viruses in the termination of chronic hepatitis B surface antigen carrier state: a multivariate analysis in a longitudinal follow - up study. *J Infect Dis* 170:1358-61

180. Shellam G.R., Allen J.E., Papadimitriou J.M., Bancroft G.J. (1981) Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5104-13
181. Sherlock S., Dooley J. (1997) *Diseases of the Liver and Biliary System* (tenth edition), Blackwell Science
182. Shimizu Y.K., Iwamoto A., Hijikata M., Purcell R.H., Yoshikura H. (1992) Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5477-81
183. Simons J.N., Leary T.P., Dawson G.J., Pilot-Matias T.J., Muerhoff A.S., Schlauder G.G., Desai S.M., Mushahwar I. (1995) Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 6:564-9
184. Simons J.N., Leary T.P., Pilot - Matias T.J., Muerhoff A.S., Schlauder G.G., Desai S.M., Mushawar I. (1996) GBV - C and HGV: a new hepatitis virus? *Gastroenterology*, 111:1776-8
185. Singh N., Dummer J.S., Kusne S., Breinig M.K., Armstrong J.A., Makowka L., Starzl T.E., Ho M. (1988) Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *J Infect Dis* 158:124-31
186. Smith G.S. (1996) Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons. *Curr Opin Immunol* 8:467-71
187. Smyth R.L., Scott J.P., Borysiewicz L.K. (1991) Cytomegalovirus infection in heart lung transplant recipients: risk factors, clinical associations and response to treatment. *J Infect Dis* 164:1045-50

188. Snover D.C., Horwitz C.A (1984) Liver disease in cytomegalovirus mononucleosis: a light microscopical and immunoperoxidase study of six cases. *Hepatology* 4:408-12

189. Snyderman D.R. (1990) Cytomegalovirus immunoglobulins in the prevention and treatment of cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis* 12(suppl. 7):S839-48

190. Snyderman D.R., Werner B.G., Heinze - Lacey B., Berardi V.P., Tilney N.L., Kirkman R.L., Milford E.L., Cho S.I., Bush H.L., Levey A.S., Strom T.B., Carpenter C.B., Levey R.H., Harmon W.E., Zimmerman C.E., Shapiro M.E., Steinman T., LoGerfo F., Idelson B., Schroter G.P.J., Levin M.J., McIver J., Leszczynski J., Grady G.F. (1987) Use of cytomegalovirus immune globulin to prevent cytomegalovirus disease in renal - transplant recipients. *N Engl J Med* 317:1049-54

191. Stannard L.M., Hardie D.R. (1991) An Fc receptor for human immunoglobulin G is located within the tegument of human cytomegalovirus. *J Virol* 65:3411-5

192. Starr S.E., Alicon A.C. (1977) Role of T lymphocytes in recovery from murine cytomegalovirus infection. *Infect Immun* 17:458-62

193. Stevens J.G. (1987) Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiol Rev* 53:318-32

194. Stivala A., Guglielmino S.P., Scalia G., Conndorelli F., Ursino F., Castro A., Mughini M.T., Cosentino S., Russo R. (1995) Anti - HCMV serologic response in patients with acute viral hepatitis. *New Microbiol* 18:423-6



195. Stoddart C.A., Cardin R.D., Boname J.M., Manning W.C., Abenes G.B., Mocarski E.S. (1994) Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol* 68:6243-53
196. Strickler J.G., Manivel J.C., Copenhaver C.M., Kubic V.L. (1990) Comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for detection of cytomegalovirus and herpes simplex virus. *Hum Pathol* 21:443-8
197. Su H.C., Ishikawa R., Biron C.A. (1993) Transforming growth factor- $\beta$  expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude and SCID mice. *J Immunol* 151:4674-890
198. Sullivan M. (1987) Immunoglobulin therapy in bone marrow transplantation. *Am J Med* 83:34-45
199. Teixeira M.R., Weller I.V.D., Murray A. (1982) A Pathology of hepatitis A in men. *Liver* 2:53-60
200. Teo H.K., Price P., Papadimitrou J.M. (1991) The effects of protein malnutrition on the pathogenesis of murine cytomegalovirus disease. *Int J Exp Pathol* 72:67-82
201. Thale R., Lučin P., Schneider K., Eggers M., Koszinowski U.H. (1994) Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. *J Virol* 68:7757-65
202. Theise N.D., Conn M., Thung S.N. (1993) Localization of cytomegalovirus antigens in liver allografts over time. *Hum Pathol* 24:103-8

203. Tracey K.J., Wei H., Manogue K.R., Fong Y., Hesse D.G., Nguyen H.T., Kuo G.C., Beutler B., Cotran R.S., Cerami A., Lowry S.F. (1988) Cachetin/tumor necrosis factor induces cachexia, anaemia, and inflammation. *J Exp Med* 167:1211-27
204. Tsui L.V., Guidotti L.G., Ishikawa T., Chisara F.V. (1995) Post-transcriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12398-402
205. Van den Berg A.P., Klompmaker I.J., Haqagsma E.B., Scholten-Sampson A., Bijleveld C.M., Scfhirn J., Van der Giessen M., Slooff M.J., The T.H. (1991) Atigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J Infect Dis* 164:265-70
206. Vento S., Cainelli F., Mirandola F., Cosco L., DiPerri G., Solbiati M., Ferraro T., Concia E. (1996) Fulminant hepatitis on withdrawal of chemotherapy in carriers of hepatitis C virus. *Lancet* 347:92-3
207. Wainberg M.A., Numazaki K., Destephano L., Wong L., Goldman H. (1988) Infection of human thymic epithelial cells by human cytomegalovirus and other viruses: effect on secretion of interleukin 1-like activity. *Clin Exp Immunol* 72:415-21
208. Wahren B., Ljungman P., Paulin T., Ringden O (1986) Enhance and suppressive effects of cytomegalovirus on human lymphocyte responses in vitro *J Virol* 58:909-13
209. Watanabe S., Arima K., Nishioka M., Yoshino S., Hasui H., Fujikawa M. (1997) Comparison between sporadic cytomegalovirus hepatitis and Epstein - Barr virus hepatitis in previously healthy adults. *Liver* 17:63-9

210. Wattré P., Dewilde A., Lobert P.E. (1995) Current status of human cytomegalovirus disease. *Rev Med Interne* 16:354-67

211. Welsh R.M., Brubaker J.O., Vargas-Cortes M., O'Donnell C.L. (1991) Natural Killer (NK) cell response to virus in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J Exp Med* 173:1053-63

212. Wilson C.B., Penix L., Melvin A., Lewis D.B. (1993) Lymphokine regulation and the role of abnormal regulation in immunodeficiency. *Clin Immunol Pathol* 67:25-32

213. Winston D.J., Wirin D., Shaked A., Busuttill R.W. (1995) Randomized comparison of ganciclovir and high-dose acyclovir for long-term cytomegalovirus prophylaxis in liver-transplant recipients. *Lancet* 346:69-74

214. Wolff M.A., Rand K.H., Houck H.J., Brunson M.E., Howard R.J., Langham M.R., Davis G.L., Mailliard M.E., Myers B.M., Andres J., Novak D.A., Haiman S., Parris C.J. (1993) Relationship of the polymerase chain reaction for cytomegalovirus to the development of hepatitis in liver transplant recipients. *Transplantation* 56:572-6

215. Wu J.C., Chen T.A., Huang Y.S. (1995) Natural history of hepatitis D viral superinfection: significance of viremia detected by polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 108:796-802

216. Yewdell J.W., Bennink J.R., Hosaka Y. (1988) Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* 239:637-40

217. Yow M.D., Williamson D.W., Leeds L.J., Thompson P., Woodward R.M., Walmus B.F., Lester J.W., Six H.R., Griffiths P.D. (1988) Epidemiologic characteristics of cytomegalovirus infection in mothers and their infants. *Am J Obstet Gynecol* 158:1189-95

218. Zein N.N., Rakela J., Krawitt E.L., Reddy K.R., Tominaga T., Persing D.H., Therneau T.M., Gross J.B. Jr., Poterucha J.J., Gossard A.A., Jeffers L.J., Schiff E.R. (1996) Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 125:634-9

219. Zuckerman A.J. (1983) The history of viral hepatitis from antiquity to the present. In: *viral hepatitis: laboratory and clinical science*. Ed. Deinhardt F. and Deinhardt J. New York-Basel, Marcel Dekker, Inc.

## ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Rijeci, 27. rujna 1962. godine. Nakon završene srednje škole (Centar za kadrove u obrazovanju i kulturi - prirodnoznanstveno usmjerenje) upisao sam Studij opće medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Za vrijeme studija proglašen sam najboljim studentom Medicinskog fakulteta 1987., a iste godine dobio sam i Nagradu Sveučilišta u Rijeci za najbolji studentski znanstveni rad. Diplomirao sam 2. srpnja 1987. U studenom 1988. godine položio sam stručni ispit. U ožujku 1990. započeo sam s radom u Kardiološkom dispanzeru Doma zdravlja Rijeka, gdje sam bio zaposlen do 1. lipnja 1991. kada sam primljen na Internu kliniku KBC Rijeka. Poslijediplomski studij iz Opće kliničke patofiziologije upisao sam 1987. godine na Medicinskom fakultetu u Rijeci, gdje sam i magistrirao u rujnu 1991, nakon čega sam izabran za znanstvenog asistenta na Katedri za internu medicinu. Tijekom specijalizacije iz interne medicine sudjelovao sam pet mjeseci u domovinskom ratu. U prosincu 1994. dobio sam Županijsku stipendiju za visokodiferentnu medicinu pa sam boravio tri mjeseca na Gastroenterološkom odjelu bolnice u Udinama. Specijalistički ispit iz interne medicine položio sam u travnju 1996. godine. Od tada radim na Gastroenterološkom odjelu Interne klinike KBC Rijeka.