

Eksperimentalna neonatalna listerioza u miša s nedostatkom gena za receptor 1 čimbenika nekroze tumora

Bubonja Šonje, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2007

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:188:936059>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

-07

16. 08. 2006 (1423)

7

Marina Bubonja

**EKSPERIMENTALNA NEONATALNA LISTERIOZA U
MIŠA S NEDOSTATKOM GENA ZA RECEPTOR 1
ČIMBENIKA NEKROZE TUMORA**

Doktorska disertacija

Rijeka, 2007.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Maja Abram

Doktorska disertacija obranjena je dana _____ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr. sc. Miljenko Dorić
2. Prof.dr. sc. Branka Bedenić
3. Prof dr. sc. Igor Prpić
4. Prof. dr. sc. Maja Abram

Rad ima: 82 stranice

UDK klasifikacija:

PREDGOVOR

In vivo pokusi obavljani su na Zavodu za mikrobiologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, a patohistološka i molekularna analiza uzoraka na Institutu za neuropatologiju Univerzitetske klinike u Kelnu, Njemačka. Cjelokupna obrada kao i analiza dobivenih rezultata provedena je na Zavodu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Istraživanje je provedeno u okviru projekta br 0062023 financiranog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske pod mentorstvom glavnog istraživača prof. dr. sc. Maje Abram. Istraživanje je dijelom potpomognuto stipendijom Europskog udruženja mikrobioloških društava (FEMS Research Fellowship) za 2005. god.

U ovoj prigodi izuzetno mi je zadovoljstvo da mogu zahvaliti svima koji su mi pomogli i omogućili izradu ove disertacije. Srdačno zahvaljujem prof. dr. sc. Maji Abram na stručnom vodstvu i strpljivoj potpori od početka mojeg rada na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju. Iznimnu zahvalnost dugujem Gabrijeli, Lauri, Werneru, Monici i Sonji na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela ovog istraživanja.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati ulogu TNF- α i TNFR1 u imunološkom odgovoru na infekciju *Listeria monocytogenes* u TNFR1^{-/-} mišje sisančadi. Pratiti tijek infekcije i patološke promjene u organima te analizirati stanične elemente u imunološkom odgovoru. Utvrditi da li nedostatak TNFR1 utječe na izražaj pojedinih proupalnih i protuupalnih medijatora u različitim tkivima, te na tijek i ishod listerioze.

Materijali i metode: Mišja sisančad TNFR1^{-/-} i C57BL/6 inokulirana je i.p. *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Praćena je kinetika isčišćavanja bakterija iz jetre, slezene i mozga. Tkiva su analizirana patohistološkim tehnikama, a RT-PCR metodom je određen izražaj mRNK citokina: IFN- γ , TNF- α , IL-12p40, IL-10; kemokina: MCP-1, RANTES, MIP-1 α , Crg-2/IP-10 i enzima: iNOS i IDO.

Rezultati: Infekcija TNFR1^{-/-} sisančadi rezultirala je mortalitetom od 100%, dok su sve C57BL/6 životinje preživjele infekciju. TNFR1^{-/-} miševi nisu isčistili bakterije iz tkiva, što je rezultiralo nekrotičnim hepatitisom, meningoencefalitisom i apscesima mozga. Infekcija kontrolne skupine rezultirala je slabom indukcijom mRNK za TNF- α , IFN- γ , IL-10 u jetri te IFN- γ , IL-12p40, IL-10 u mozgu. U jetri TNFR1^{-/-} sisančadi utvrđena je naglašena indukcija mRNK iNOS i IDO; u slezeni slabija indukcija mRNK TNF- α , IFN- γ i IL-10, te izrazit izražaj mRNK iNOS i IDO; u mozgu naglašena indukcija mRNK IFN- γ , IL-12p40, IL-10, RANTES, Crg-2, iNOS i IDO.

Zaključak: C57BL/6 mišja sisančad savladava infekciju listerijom, dok tijekom infekcije i mortalitet TNFR1^{-/-} sisančadi ukazuje na ključnu ulogu TNFR1 u protulisterijskoj imunosti. Poremećaj u izražaju upalnih medijatora naglašava kompleksnu ulogu TNF- α u imunološkom odgovoru. Ovo istraživanje doprinijet će boljem razumijevanju patogeneze neonatalne listerioze, te uloge TNFR1 u nadzoru nad ovom infekcijom.

Ključne riječi: Citokini; kemokini; *Listeria monocytogenes*; miš; TNFR1

SUMMARY

Objective: In order to determine the importance of TNF- α and TNFR1 signalling in antilisterial immunity, neonatal TNFR1^{-/-} deficient mice were infected with *Listeria monocytogenes*. The course of infection, pathological changes in organs, and cellular response to infection were studied. The role of TNFR1 signalling in expression of different inflammatory and anti-inflammatory mediators in tissues was investigated.

Material and Methods: Two days old mice TNFR1^{-/-} deficient mice and age-matched control C57BL/6 mice were i.p. infected with *L.monocytogenes* $\Delta actA$. Tissue sections were analysed using immunohistochemistry. RT-PCR was used to delineate the time course of the local expression of mRNA encoding cytokines: IFN- γ , TNF- α , IL-12p40, IL-10; chemokines: MCP-1, RANTES, MIP-1 α , Crg-2/IP-10 and enzymes: iNOS and IDO.

Results: 100% of the TNFR1^{-/-} deficient mice succumbed to infection. In contrast all C57BL/6 survived the infection. The impaired clearance of bacteria from the organs of TNFR1^{-/-} deficient mice resulted in development of necrotic hepatitis, meningoencephalitis and brain abscesses. The infection of control mice resulted in weak hepatic induction of mRNA for TNF- α , IFN- γ , IL-10, and induction of mRNA for IFN- α , IL-12p40 and IL-10 in the brain. Hepatic levels of mRNA for iNOS i IDO were increased. In the spleen of TNFR1^{-/-} mice weak induction of mRNA for TNF- α , IFN- γ and IL-10 was detected as well as strong induction of mRNA for iNOS and IDO. Enhanced expression of mRNA for IFN- γ , IL-12p40, IL-10, RANTES, Crg-2, iNOS and IDO was detected in the brain of TNFR1^{-/-} mice.

Conclusion: C57BL/6 neonatal mice successfully face the infection. The course of infection and mortality rate of TNFR1^{-/-} deficient mice show the critical importance of TNFR1 expression in the antilisterial immunity. Deregulation of the inflammatory mediators' production implies the complex role of TNF- α in immune response. This research will contribute to better understanding of

pathogenesis of neonatal listeriosis and the role of TNFR1 signalling in immune response to *L. monocytogenes*.

Key words: chemokines; cytokines; *Listeria monocytogenes*; mouse; TNFR1

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.2. Epidemiologija	3
1.3. Klinička obilježja infekcije <i>L. monocytogenes</i>	4
1.3.1. Febrilni gastroenteritis	6
1.3.2. Listerioza središnjeg živčanog sustava i sepsa	7
1.3.3. Listerioza novorođenčeta	8
1.4. Uloga virulentnih čimbenika bakterije <i>L. monocytogenes</i> u patogenezi bolesti	9
1.4.1. Ulazak u stanicu	10
1.4.2. Bijeg iz fagocitne vakuole i umnožavanje u citoplazmi	11
1.4.3. Unutarstanična pokretljivost i izravno širenje iz stanice u stanicu	12
1.5. Imunološki odgovor domaćina	12
1.5.1. Uloga stanica prirođene imunosti	14
1.5.2. Uloga stanica stečene imunosti	16
1.5.3. Upalni medijatori u kontroli listerioze	18
1.5.3.1. <i>TNF-α</i> i <i>TNF receptori</i>	18
1.5.3.2. <i>IFN-γ</i>	20
1.5.3.3. <i>IL-12p40</i>	21
1.5.3.4. <i>IL-10</i>	22
1.5.3.5. Kemokini <i>Crg-2/IP-10</i> , <i>MCP-1</i> , <i>MIP-1α</i> i <i>RANTES</i>	23
1.5.3.6. <i>IDO</i>	25
1.5.3.7. <i>iNOS</i> i dušikovi oksidi	26
1.6. Imunološki odgovor novorođenčeta	27
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJALI I METODE	31

3.1. Bakterijski soj	32
3.2. Pokusne životinje	32
3.3. Etički aspekti istraživanja	33
3.4. Monoklonska i poliklonska protutijela	33
3.5. PCR početnice i sonde	34
3.6. Inokulacija i određivanje titra <i>L. monocytogenes</i> u organima	35
3.7. Patohistološka i imunohistokemijska analiza	36
3.8. Određivanje mRNK u tkivima, RT-PCR i southern blot hibridizacija	37
3.9. Statistička obrada podataka	37
4. REZULTATI	38
4.1. Mortalitet TNFR1 ^{-/-} miševa inficiranih <i>L. monocytogenes</i> $\Delta actA$	39
4.2. Broj bakterija u organima TNFR1 ^{-/-} miševa inficiranih <i>L. monocytogenes</i> $\Delta actA$	40
4.3. Patohistološka slika organa TNFR1 ^{-/-} miševa inficiranih <i>L. monocytogenes</i> $\Delta actA$	42
4.4. Izražaj mRNK citokina TNF- α , IFN- γ , IL-12p40 i IL-10; kemokina MCP-1, RANTES, MIP-1 α i Crg-2/IP-10 te enzima iNOS iIDO u tkivima TNFR1 ^{-/-} miševa inficiranih <i>L. monocytogenes</i> $\Delta actA$	48
4.4.1. Izražaj mRNK upalnih medijatora u jetri	49
4.4.2. Izražaj mRNK upalnih medijatora u slezeni	50
4.4.3. Izražaj mRNK upalnih medijatora u mozgu	52
5. RASPRAVA	54
6. ZAKLJUČCI	65
7. LITERATURA	68
POPIS KRATICA	77
ŽIVOTOPIS	79

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Listeria monocytogenes prvi je put izolirana prije 80 god. u laboratorijskih zečeva, a tek desetak godina kasnije otkriveno je da je ovaj mikroorganizam patogen i za čovjeka (1,2). Vrste roda *Listeria* široko su rasprostranjene u okolišu, smatra se da domaće životinje preživači održavaju ciklus kruženja listerije u prirodi fekalno-oralnom kontaminacijom tla (3). Put prijenosa *L. monocytogenes* iz okoliša u organizam domaćina ostao je nepoznat sve do 80-tih godina prošlog stoljeća. Tek nakon nekoliko većih epidemija listerioze otkriveno je da bakterija dospijeva u organizam kontaminiranom hranom biljnog i životinjskog porijekla (4). U odraslih, zdravih osoba bakterija može asimptomatski kolonizirati probavni sustav ili se bolest može očitovati blažom slikom gastroenteritisa. U osjetljivog domaćina može doći do razvoja teške sustavne infekcije - listerioze, bolesti s najvišom stopom smrtnosti u odnosu na sve ostale patogene koji se prenose hranom. Unatoč ubikvitarnosti bakterije, listerioza je relativno rijetka u imunokompetentnih osoba, a pojava bolesti obično je povezana s predležućim stanjima (trudnoća, imunosupresivna terapija, novorođenačka i starija životna dob). Listerioza novorođenčeta može se javiti kao rani i kasni oblik, ovisno o tome da li je stečena u trudnoći ili za vrijeme poroda kada dolazi do kontakta novorođenčeta sa sekretom genitalnih organa majke. Za razliku od kongenitalne listerioze koja se najčešće očituje kao sepsa, novorođenčad zaražena tijekom ili nakon porodaja češće obolijeva od meningitisa.

Patogeneza listerioze još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, iako se listerija dugi niz godina koristi u istraživanjima mehanizama stanične imunosti i stanične biologije (5). Unatoč tome što je učinjen veliki napredak u razumijevanju mehanizama virulencije bakterije i imunološkog odgovora domaćina, saznanja o osjetljivosti pojedinih rizičnih skupina na infekciju još uvijek su djelomična i nepotpuna. Neosporno je da je odgovor domaćina na infekciju složeni proces koji uključuje niz čimbenika. Poznato je da su za nadzor i rezoluciju infekcije ovom bakterijom neophodne različite imunokompetentne stanice koje međusobno komuniciraju putem upalnih medijatora. Brojni citokini i kemokini aktiviraju upalne stanice te dovode do njihove mobilizacije i usmjeravanja ka upalnim žarištima. *In vitro* i *in vivo* studije o ulozi TNF- α i IFN- γ u antilisterijskom odgovoru rezultirale su saznanjima o ključnoj ulozi ovih citokina i njihovih receptora u regulaciji odgovora makrofaga i prirodenučilačkih (NK, od engl. natural killer) stanica

(6,7). Suvremena znanstvena i tehnička dostignuća kao što su sekvencioniranje genoma miša i listerije, te upotreba genetički promijenjenih miševa omogućavaju analizu i rasvijetljavanje uloge pojedinih gena u osjetljivosti/otpornosti na infekciju. Eksperimentalni modeli bolesti omogućavaju praćenje patogeneze *in vivo* doprinoseći tako boljem razumijevanje listerioze i poboljšavanju dijagnostičkih i terapijskih protokola.

1.1. *Listeria monocytogenes*

Bakterije roda *Listeria* široko su rasprostranjene u prirodi, a od šest vrsta koje se nalaze unutar roda jedino se *L. monocytogenes* smatra patogenom za čovjeka. Dvije hemolitične vrste *L. ivanovi* i *L. seeligeri* uglavnom uzrokuju bolesti u životinja preživača, dok su preostale vrste listerija saprofiti. *L. monocytogenes* je gram pozitivna fakultativno anaerobna bakterija štapićasta oblika sa zaobljenim krajevima. Izolirana je iz zemlje, silaže, vode, trule vegetacije, izmeta kao i tkiva različitih beskralješnjaka i kralješnjaka, uključujući čovjeka. Unutar vrste *L. monocytogenes* postoji 13 serotipova, a podjela se zasniva na površinskim ugljikohidratnim (O ili somatskim) i flagelarnim antigenima. Kao uzročnici bolesti najčešće se izoliraju serotipovi 4b, 1/2a i 1/2b (8), (9). Prepoznata kao značajan patogen čovjeka i životinja, ova je bakterija u posljednja dva desetljeća postala predmetom interesa medicinske, veterinarske i prehrambene mikrobiologije.

1.2. Epidemiologija

Iako *L. monocytogenes* uzrokuje zoonozu, prijenos bakterije sa zaražene životinje na čovjeka u većini slučajeva je posredan, preko kontaminirane hrane biljnog ili životinjskog porijekla. Danas se smatra da je osnovni izvor zaraze u životinja loše pripremljena silaža, a klinički bolesne ili često zdrave životinje kliconoše potencijalni su izvor zagađenja okoliša.

L. monocytogenes je česta kontaminanta namirnica, najčešće se izolira iz sirovog povrća, mliječnih proizvoda, ribe, mesa peradi i ostalih životinja. Bakterija se razmnožava unutar velikog raspona pH

(4,3-9,6) i temperature (1-45°C), te pokazuje znatnu otpornost prema visokim koncentracijama NaCl-a (do 12%). Otpornost bakterije na različite postupke koji se koriste tijekom obrade namirnica predstavlja velik problem prehrambenoj industriji (10). U usporedbi s ostalim mezofilnim medicinski značajnim mikroorganizmima, listerije rastu dobro pri nižim temperaturama. Ova osobina omogućava umnažanje bakterije u namirnicama unatoč suvremenih metoda skladištenja na nižim temperaturama. Izolacija bakterije iz smrznute hrane upućuje na činjenicu da *L. monocytogenes* može podnijeti i smrzavanje. U pokušaju da se smanji/eliminira listerija u namirnicama, američka Uprava za hranu i lijekove (FDA; od engl. Food and Drug Administration) je u kolovozu 2006. godine prvi put odobrila korištenje jedinstvenog antimikrobnog aditiva - listerija specifičnih bakteriofaga kao dodatak mesnim prerađevinama koje se konzumiraju bez dodatne termičke obrade (11).

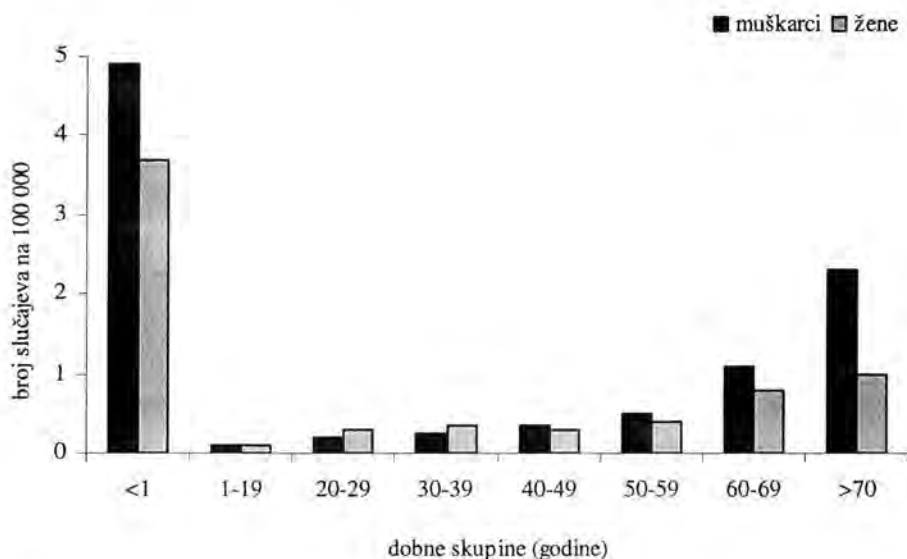
U jednoj studiji provedenoj na području Hrvatske *L. monocytogenes* je izolirana u 4,27% uzoraka kolača uzorkovanih u ugostiteljskim objektima, a autori ističu da izolirani serotipovi i količina bakterija u pregledanim kolačima predstavljaju visok potencijalni rizik za infekciju čovjeka (12). U sličnim istraživanjima u našoj zemlji provedenim na domaćim (nepasteriziranim) mliječnim proizvodima *L. monocytogenes* je pronađena u 13,39% pregledanih uzoraka, a također je izolirana iz 3,03% uzoraka svježeg i smrznutog mesa peradi (13,14).

1.3. Klinička obilježja infekcije *L. monocytogenes*

Smatra se da čovjek tijekom života više puta unese *L. monocytogenes* hranom u svoj probavni sustav. Na ovo upućuju istraživanja koja pokazuju da 6% ljudi i životinja bez vidljivih znakova bolesti nosi listeriju kao dio fekalne mikroflore (15,16,17), kao i nalaz T-limfocita senzibiliziranih na *L. monocytogenes* u inače zdravih osoba (18). Da li će ulazak bakterije u organizam dovesti do razvoja bolesti ili samo do prolazne kolonizacije crijeva ovisi o bakterijskim čimbenicima - veličini bakterijskog inokuluma i serotipu bakterije, ali i o osjetljivosti samog domaćina.

Nakon ingestije listerijom kontaminirane namirnice najprije dolazi do kolonizacije crijeva domaćina, a potom i prodora bakterije kroz crijevnu barijeru. Bakterija se nastavlja umnožavati u jetri i slezeni nakon čega, ovisno o osjetljivosti domaćina, dolazi do rezolucije bolesti ili hematogenog širenja bakterije u druge organe. Bolest koju izaziva *L. monocytogenes* može se očitovati različitim simptomima odnosno sindromima koji variraju ovisno o mjestu ulaska uzročnika, dobi i imunološkom statusu inficirane osobe. Klinički izražena infekcija listerijom najčešća je u novorođenčadi i starijih osoba. Prema podacima američkog Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC; od engl. Centers for Disease Control and Prevention) iz 2003. god. u općoj se populaciji listerioza javlja u 0.7 na 100 000 osoba, a unutar skupine dojenčadi i starijih osoba incidencija se povećava (19). Incidencija listerioze u populaciji djece do jedne godine života i starijih osoba nekoliko je puta veća (Slika 1).

Prosječna godišnja incidencija listerioze nije velika niti u zemljama unutar Europske zajednice gdje se kreće od dva do deset prijavljenih slučajeva na milijun stanovnika (20). Međutim, važno je istaknuti da se među infekcijama koje se prenose hranom listerioza svrstava među bolesti s najčešćim smrtnim posljedicama.



Slika 1. Incidencija listerioze ovisno o životnoj dobi i spolu. Preuzeto iz (21).

Tako je listerijska sepsa praćena vrlo visokom stopom mortaliteta koja iznosi oko 70% u bolesnika s predležećom bolesti. Oko 33%-50% svih zabilježenih slučajeva listerioze javlja se u trudnica, a u Tablici 1 navedena su druga stanja koja osim trudnoće predstavljaju znatan rizik za razvoj bolesti.

Tablica 1. Predležeća stanja u populaciji odraslih osoba oboljelih od listerioze

Postojeća bolest	Postotak (%)
Ne-hematološki maligniteti	28
Hematološki maligniteti	18
Ciroza	11
Druga stanja	11
Imunosupresivna terapija	9
Dijabetes melitus	7
Dijaliza	5
Transplantacija organa	4
Upalna bolest crijeva	4
Alkoholizam	3
Kronična bolest jetre	1
Ukupno	100

Podaci preuzeti iz (21).

1.3.1. Febrilni gastroenteritis

L. monocytogenes i drugi nepatogeni pripadnici roda *Listeria* mogu kolonizirati probavni sustav čovjeka i životinja zbog svoje sposobnosti preživljavanja u uvjetima niskog pH u želucu, kao i tolerancije povišenog osmolariteta i žučnih soli unutar tankog crijeva. *L. monocytogenes* može biti prolazna mikroflora crijeva, ne uzrokujući simptome bolesti (17). Studije na laboratorijskim životinjama pokazale su da se bakterija umnožava u žučnom mjehuru i ileumu (22). Nije potpuno objašnjeno kojim mehanizmima bakterija uzrokuje proljev niti kako savladava crijevnu barijeru. Izravna sposobnost invazije intestinalnog epitela dokazana je *in vitro* pokusima na enterocitnoj Caco-2 staničnoj liniji (23). Istraživanja pokazuju da se putem M-stanica (od engl. microfold cells) Peyerovih ploča donjeg dijela ileuma bakterija može prenijeti u limfno tkivo odakle se dalje širi po organizmu (24). Neke studije pokazuju da bi i dendritičke stanice (DC; od eng. dendritic cells) Peyerovih ploča mogle biti ulazno mjesto bakterije (25,26). Kolonizacija crijeva najčešće rezultira simptomima enteritisa, a naknadni prodor i umnožavanje bakterija u jetri

febrilnim stanjem sličnim gripi. Širom svijeta zabilježeni su brojni sporadični slučajevi i epidemije febrilnog gastroenteritisa u inače zdravih osoba (27,28,29). Obično se povraćanje, abdominalna bol ili proljev pojavljuju 72h prije pojave vrućice. Prosječno vrijeme inkubacije iznosi 17-20h (3). Infektivne doze najčešće su visoke i kreću se u rasponu od 10^5 bakterijskih kolonija (CFU; od engl. colony forming units) do 10^9 CFU. Epidemije gastrointestinalne listerioze, bez znakova invazivnih oboljenja obično se javljaju u populaciji imunokompetentnih osoba pa se pretpostavlja da je infekcija probavnog sustava početna faza bolesti koja može progredirati u težu kliničku sliku u osoba s oštećenom imunosti. Budući da se rutinskim mikrobiološkim pretragama *L. monocytogenes* ne traži u stolici nije poznato koliko se ukupnih slučajeva gastroenteritisa može pripisati infekciji ovom bakterijom.

1.3.2. Listerioza središnjeg živčanog sustava i sepsa

Nemogućnost domaćina da ograniči umnožavanje bakterije u jetri i slezeni rezultira daljnjim umnožavanjem i hematogenim širenjem u druge organe. Stanja kao trudnoća, imunosupresija, novorođenačka i starija životna dob znatno povećavaju rizik razvoja bolesti. U većini slučajeva invazivni se oblici bolesti - sepsa i listerioza središnjeg živčanog sustava (SŽS) i javljaju u novorođenčadi, imunološki oslabljenih osoba i starijih osoba. *L. monocytogenes* je među vodećim uzročnicima meningitisa u novorođenčadi mlađe od jednog mjeseca i osoba starijih od 60 god. (30). Stečena listerioza u veće djece i odraslih najčešće se očituje kao gnojni meningitis ili meningoencefalitis sa smetnjama svijesti i koordinacije, te u nekim slučajevima i paralizama kranijalnih živaca, naročito VI i VII. Smatra se da listerija prolazi krvno-moždanu barijeru nakon prethodne fagocitoze od strane endotelnih stanica ili makrofaga. U većini bakterijskih meningitisa stanični odgovor u likvoru karakteriziran je velikim udjelom neutrofila. U listerijskom je meningitisu, međutim, postotak neutrofila snižen, a monociti mogu prijeći učešće od 80 do 90%. Čisti encefalitični oblici listerioze rijetki su u ljudi ali česti u životinja. Njihov je tijek najčešće bifazičan s inicijalnom supfebrilnom fazom u trajanju 3-10 dana u kojoj se može javiti glavobolja i poremećaji vida, a slijedi ju druga faza sa znacima ozbiljnog meningoencefalitisa. U 5-10% slučajeva

listerioza se javlja u manje tipičnim oblicima kao što su endokarditis, arteritis, pneumonija, pleuritis, hepatitis, peritonitis, lokalizirani apscesi, artritis, osteomijelitis, konjunktivitis, primarna kožna listerioza itd. (31).

Dijagnostika listerioze SŽS nije jednostavna. S obzirom na njezin unutarstanični smještaj, *L. monocytogenes* se rijetko pronađe u mikroskopskom preparatu likvora obojenom po Gramu. Tek 5% bolesnika s listerijskim meningitisom ima pozitivan mikroskopski preparat likvora. Monocitni odgovor u likvoru i negativan mikroskopski preparat mogu navesti kliničara na pogrešan zaključak da se radi o herpes ili drugom virusnom encefalitisu, virusnom meningitisu, tuberkuloznom meningitisu, lajmskoj boreliozu, sifilisu ili kriptokoknom meningitisu.

1.3.3. Listerioza novorođenčeta

Jedna trećina svih slučajeva listerioze javlja se u trudnoći, te je rizik za dobijanje bolesti oko 20 puta veći u trudnica u odnosu na ostatak populacije zdravih odraslih ljudi. Listerioza u trudnica obično se očituje blagom kliničkom slikom ili prolazi neopaženo, bez kliničkih simptoma bolesti, što bi ukazivalo na to da trudnoća ne dovodi do sustavnog poremećaja imunosti. U jednoj studiji u kojoj su analizirane trudnice oboljele od listerioze njih 65% imalo je vrućicu, 32% stanje nalik gripi, 21,5% križobolju, 10,5% glavobolju, a 29% trudnica uopće nisu imale znakove bolesti (32). Ipak, specifična promjena lokalne stanične imunosti, kao fiziološka posljedica trudnoće, rezultira povećanom vjerojatnošću da čak i mali broj bakterija koji se nađe u cirkulaciji dospije do placentu koja postaje mjesto umnožavanja i daljnjeg širenja po organizmu, a trudnoća može završiti pobačajem ili rođenjem mrtvog ili inficiranog djeteta (33). Incidencija listerioze novorođenčadi iznosi 52,8 slučajeva na 100 000 živorođene djece (34).

Ovisno o tome da li je do infekcije listerijom došlo tijekom trudnoće ili tijekom poroda, odnosno nakon rođenja, infekcije novorođenčadi mogu se podijeliti na rane i kasne. Septični oblik bolesti u novorođenčadi, poznat kao sindrom granulomatosis infantiseptica, javlja se kao posljedica kongenitalne infekcije. Kasna novorođenačka listerioza očituje se tijekom prvog do trećeg tjedna života novorođenčeta i vjerojatno nastaje kao posljedica aspiracije kontaminirane plodne vode ili

majčinih eksudata tijekom poroda. Zabilježeni su i slučajevi bolničkih infekcija prijenosom listerije s medicinskog osoblja ili neživog okoliša na dijete (35,36). Kasna neonatalna listerioza najčešće se očituje kao febrilni sindrom praćen meningitisom, a u određenom broju slučajeva i kao gastroenteritis ili upala pluća. Simptomi meningitisa u novorođenčeta su napetost fontanele, razdražljivost, konvulzije i koma. *L. monocytogenes* ima afinitet za tkivo mozga i moždane ovojnice te je jedan od tri vodeća uzročnika bakterijskog meningitisa u novorođenačkoj dobi (37). Rana neonatalna listerioza ima stopu mortaliteta od 20-30%, kasna neonatalna listerioza do 20%, dok je mortalitet u starije djece manji od 10%. Iako je stopa mortaliteta kasne neonatalne listerioze niža u odnosu na kongenitalnu infekciju, posljedice bolesti poput hidrocefalusa i psihomotorne retardacije mogu biti i teške i trajne (38).

1.4. Uloga virulentnih čimbenika bakterije *L. monocytogenes* u patogenezi bolesti

Posljednje desetljeće učinjen je veliki napredak u razumijevanju regulacije prijelaza *L. monocytogenes* iz saprofitnog u patogeni način života (39). Geni koji kodiraju listeriolizin-O, fosfolipaze, aktin A i internalin B glavne su virulentne odrednice *L. monocytogenes*. Njihov je izražaj reguliran genetičkim lokusom LIPI-1 (od engl. *Listeria* pathogenicity island 1) kao odgovor na okolišne promjene, što predstavlja fenomen poznat kao bakterijska modulacija. Ulaskom u organizam domaćina, promjena temperature i niski pH u želucu stimuliraju produkciju transkripcijskog aktivatora PrfA (od engl. positive regulatory factor A), proteina stresa i internalina. PrfA se veže na bakterijsku deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK; od engl. deoxyribonucleic acid) i glavni je regulator izražaja gena virulencije *L. monocytogenes* (40). Geni virulencije su maksimalno izraženi pri 37°C. Dobro su proučeni, a brojnim je pokusima s izogenim mutantama bakterije dokazana njihova uloga u parazitskom životu bakterije. Kada se nađe u neživom okolišu *L. monocytogenes* održava svoju saprofitnu prirodu potiskivanjem PrfA aktivnosti kroz transkripcijske, posttranskripcijske i posttranslacijske mehanizme spriječavajući tako izražaj primarnih čimbenika virulencije.

1.4.1. Ulazak u stanicu

L. monocytogenes se može razmnožavati unutar stanica i ubraja se u fakultativne unutarstanične parazitske bakterije. Vežanje *L. monocytogenes* na stanične receptore i ulazak u eukariotsku stanicu prvi je korak u uspostavi infekcije. Listerija je sposobna za invaziju i umnožavanje unutar širokog raspona životinjskih stanica, kako profesionalnih (makrofagi i druge imunopredočne stanice), tako i neprofesionalnih fagocita (31). Bakterijski čimbenici koji posreduju inicijalnu adherenciju na sluznicu probavnog sustava još uvijek nisu dobro definirani. Dokazano je da protein LAP (od engl. *Listeria* adhesion protein) sudjeluje u adheziji bakterije na stanice sisavaca, a fibronektin-vežući protein omogućava vežanje bakterije na protein ekstracelularnog matriksa u oralno inokuliranih miševa (41,42). Detaljno su istraženi i opisani mehanizmi invazije stanica sisavaca. Na površini bakterijske stanice nalaze se proteini internalin A (InlA) i internalin B (InlB) koji joj omogućavaju ulazak u različite eukariotske stanice mehanizmom inducirane fagocitoze. Za razliku od ostalih čimbenika virulencije koji se eksprimiraju tek unutar stanice domaćina, bakterija proizvodi internaline prije same infekcije stanice (43,44). U crijevima domaćina bakterijski se InlA veže na E-kadherinski receptor na enterocitima, te tako omogućava invaziju epitelnih stanica (45). E-kadherin je pronađen i na hepatocitima, DC, endotelnim stanicama krvnih žila mozga i epitelnim stanicama korioidnog pleksusa i korionskih resica posteljice iako nije dokazano da posreduje ulazak listerije u te stanice (46). InlB je slabije vezan za površinu bakterije i može biti otpušten u izvanstanični okoliš. Čini se da InlB pomaže InlA u invaziji enterocita, a sam se veže na tri različita receptora na stanicama sisavaca. Receptor za komponentu komplementa C1q, receptor Met koji je fiziološki ligand za čimbenik rasta hepatocita (HGF, od engl. hepatocyte growth factor) i glikozaminoglikani na površini stanica sisavaca stanični su receptori za InlB (47,48).

1.4.2. Bijeg iz fagocitne vakuole i umnožavanje u citoplazmi

Kada se bakterija nađe unutar eukariotske stanice, snižena koncentracija željeza i/ili ugljikohidrata dovodi do potiskivanja produkcije internalina i uspostave proizvodnje listeriolizina O (LLO) i fosfolipaze C (PLC; od engl. phospholipase) (39). Izlaganje *L. monocytogenes* vodikovom peroksidu (H_2O_2) također povećava transkripciju *prfA* gena što ukazuje na to da reaktivni kisikovi spojevi stvoreni u aktiviranim makrofagima također mogu potaknuti ekspresiju gena virulencije. LLO je citolizin koji stvara pore na membrani fagosoma, dovodeći do njegova oštećenja i bijega bakterije u citoplazmu. Fosfolipaze imaju sinergističan učinak s LLO u oslobađanju bakterije iz vakuole primarnog fagosoma, ali isto tako omogućavaju bakteriji bijeg iz sekundarne vakuole s dvostrukom membranom koja nastaje utiskivanjem bakterije iz citoplazme zaražene stanice u membranu susjedne stanice (31). Kada se bakterija oslobodi vakuole i nađe unutar citoplazme počinje se umnožavati, a generacijsko vrijeme iznosi oko jedan sat.

Fosfolipazna aktivnost značajna je i u patogenezi i nekih drugih bakterijskih infekcija poput mikobakterioza (49). Fosfatidil-kolin fosfolipaza (PC-PLC; od engl. phosphatidylcholin phospholipase) ima lecitinaznu aktivnost i hidrolizira fosfatidil-kolin dok je fosfatidil-inozitol fosfolipaza (PI-PLC; od engl. phosphatidylinositol phospholipase) specifična za fosfatidil-inozitol. Delecije u *plcA* ili *plcB* genima koji kodiraju fosfolipaze rezultiraju izrazitim snižavanjem virulencije bakterije. Bakterijske mutante kojima manjka PI-PLC otežano se oslobađaju iz primarne fagocitne vakuole, dok su PC-PLC deficijentne mutante i do 20 puta slabije virulencije zbog nemogućnosti širenja iz jedne u drugu stanicu. *In vivo* pokusima je pokazano da dvostruka mutacija obaju fosfolipaznih gena rezultira nemogućnošću oslobađanja bakterije iz primarne vakuole kao i širenja bakterije iz jedne u drugu stanicu, a letalna doza 50 (LD_{50}) takve dvostruke bakterijske mutante povećava se oko petsto puta (50).

1.4.3. Unutarstanična pokretljivost i izravno širenje iz stanice u stanicu

Ključna uloga aktina A (ActA; od engl. actin A) u virulenciji listerije otkrivena je nakon što je u inficiranoj kulturi stanica pronađena izogena mutanta bakterije, koja je bila sposobna za bijeg u citoplazmu, ali se nije mogla u njoj pokretati, te se nakupljala u mikrokolonijama u perinuklearnom području (51).

Stanični skelet ili citoskelet je proteinska konstrukcija koja stanici daje oblik i određuje raspored organela te omogućava pokretanje, a čine je tri tipa vlakana: mikrofilamenti, mikrotubuli, te intermedijarni filamenti. Aktinski mikrofilamenti igraju glavnu ulogu u mehanizmu pokretanja stanice te se stalno razgrađuju i ponovno izgrađuju. Procesi dodavanja i odvajanja pojedinačnih aktinskih molekula postojećem filamentu nazivaju se polimerizacijom i depolimerizacijom. Ukoliko se kraj mikrofilamenta koji se polimerizira nađe u blizini lipidne membrane koja omeđuje stanicu, taj proces može proizvesti silu koja gura membranu, a time i pokreće stanicu prema naprijed. *L. monocytogenes* koristi stanične mehanizme za vlastito pokretanje. Kada se bakterija oslobodi iz fagolizosoma i nađe slobodna u citoplazmi stanice, na svojoj površini izražava površinski protein ActA koji polimerizira aktinski skelet stanice domaćina. Tako stanični aktin, umjesto da formira citoskelet, polimerizira oko bakterije stvarajući "rep komete" na jednom polu bakterije. Ove aktinske niti listeriji omogućavaju gibanje do stanične membrane gdje se formiraju izdanci ili filopodija koje fagocitira susjedna stanica. Nakon što bakterija uđe u susjednu stanicu životni ciklus započinje ispočetka. Uz ActA i PC-PLC omogućava bakteriji širenje u susjedne stanice. *Shigella flexneri* i *Rickettsia* spp. koriste slične mehanizme za pokretanje i preživljavanje unutar stanice domaćina (52). Izravan prijelaz iz stanice u stanicu štiti bakterije od djelovanja humoralne imunosti, ali i od antibiotika koji ne prodiru u stanicu.

1.5. Imunološki odgovor domaćina

Imunolozi desetljećima koriste *L. monocytogenes* kao model za proučavanje imunološke reakcije na unutarstanične patogene, a stečena znanja o imunološkim mehanizmima koji su

uključeni u odgovor domaćina doprinijela su rasvijetljavanju patogeneze listerioze. Antilisterijska obrana ovisi o koordiniranom učinku regulacijskih i izvršnih mehanizama nespecifične (prirodne) i specifične (stečene) imunosti (53). Iako su prema svojoj genezi različite, nespecifična i specifična obrana djeluju istodobno, međusobno se dopunjujući. Nespecifična imunost nije usmjerena protiv određenog antigena već je konstitucijsko svojstvo organizma, a zbiva se na lokalnoj i sustavnoj razini. Lokalna obrana obično se ostvaruje na mjestu ulaska agensa u tijelo (koža, sluznica) pri čemu nije riječ samo o mehaničkoj zapreci za antigen već i o fizičkom i kemijskom protumikrobnom djelovanju. Sustavna se obrana poglavito ostvaruje fagocitozom te različitim nespecifičnim tvarima u izvanstaničnoj tekućini. Limfatično tkivo sluznice probavnog sustava (GALT; od eng. gut associated lymphoid tissue) mehanizmima nespecifične imunosti osigurava prvu liniju obrane protiv patogena koji ulaze u organizam putem probavnog sustava. Iznad limfatičnog tkiva crijeva - Peyerovih ploča nalazi se epitelni sloj sa specijaliziranim M-stanicama čija je uloga da prenose stranu tvar iz lumena crijeva u limfoidno tkivo. Imunopredočne stanice - makrofagi i DC koje su smještene ispod M-stanica detektiraju prisutnost patogenih mikroorganizama receptorima prirodne imunosti (PRR; od engl. pattern-recognition receptors) koji prepoznaju molekularne obrasce mikroorganizama (54).

Unutar PRR nalazi se i obitelj TLR receptora (od engl. toll-like receptor) koji imaju središnju ulogu u nespecifičnom imunološkom odgovoru na infekciju. Nakon prepoznavanje patogena putem TLR slijedi njegova prerada i predočavanje antigena limfocitima te produkcija citokina, kemokina i protumikrobnih peptida. TLR signalizacija vodi do aktivacije fagocita i izravnog uništavanja infektivnog agensa. K tome, brojni su dokazi u prilog pretpostavke da TLR igraju ključnu ulogu i u inicijaciji stečenog imunološkog odgovora (55). Do danas je otkriveno jedanaest različitih TLR koji prepoznaju molekularne obrasce patogena karakteristične za pojedine skupine mikroorganizama. TLR 1, 2, 4, 5 i 6 su izraženi na površini stanica i čini se da su važni u prepoznavanju pojedinih bakterijskih struktura (56). TLR5 veže listerijski flagelin nakon čega dolazi do lučenja TNF- α (57), a stavovi istraživača o značaju TLR2 za kojeg je dokazano da prepoznaje lipoteikoičnu kiselinu, lipoproteine i peptidoglikan bakterija, u antilisterijskom odgovoru nisu usaglašeni. Dok neke studije sugeriraju da je TLR2 uključen u prirodni imunološki

odgovor na *L. monocytogenes* i da su TLR2-deficijentni miševi puno osjetljiviji na sustavnu infekciju s ovom bakterijom (58,59), druge studije ukazuju da postoji redundancija u prepoznavanju *L. monocytogenes* putem TLR2 i drugih TLR, a u odsutnosti TLR2 infekcija može biti kontrolirana (60).

Uloga lokalnog imunološkog odgovora probavnog sustava tijekom infekcije *L. monocytogenes* nije dovoljno ispitana te nije poznato kako ova bakterija zaobilazi zaštitne mehanizme lokalne imunosti. Dendritičke stanice su prve imunološke stanice koje dolaze u kontakt s antigenom, a istraživanja pokazuju da listerija uspijeva preživjeti unutar DC Peyerovih ploča koristeći ih kao protektivnu nišu za transport iz lumena crijeva do mezenterijalnih limfnih čvorova (25). Budući da se u većini imunoloških *in vivo* studija primjenjuje intravenski način inokulacije bakterije, uloga mehanizama sustavne imunosti na razini jetre i slezene bolje je istražena. Prirodni odgovor koji se u ovim organima aktivira vrlo brzo nakon ulaska bakterije u tkivo ima višestruku važnost - izravno uništava bakterije i zadržava infekciju pod nadzorom do razvoja specifične stanične imunosti.

1.5.1. Uloga stanica prirodene imunosti

Mreža stanica prirodnog imunološkog odgovora koje su uključene u nadzor nad infekcijom *L. monocytogenes* je jako složena. Dolazak monocita na mjesto infekcije vodeća je karakteristika antilisterijskog odgovora domaćina. Infiltrirani monociti diferenciraju se u tkivne makrofage odgovorne za uništavanje bakterija ili u imunopredočne DC koje doprinose aktivaciji mehanizama stečene imunosti. Novačenje monocita u inficirano tkivo ovisi o izražaju CCR2 kemokinskog receptora na njihovoj površini i lučenju monocitnog kemotaktičkog proteina-1 (MCP-1; od engl. monocyte chemotactic protein-1), kemokina koji se veže na CCR2. Miševi s nedostatkom CCR2 osjetljiviji su na infekciju *L. monocytogenes* u odnosu na kontrolnu skupinu imunokompetentnih životinja (61). Brojne su *in vivo* studije pokazale važnost profesionalnih fagocitnih stanica kao što su neutrofil, makrofagi i DC u ranoj fazi infekcije listerijom (53). Osobe oboljele od AIDS-a, karcinoma ili transplantirane osobe češće oboljevaju od listerioze jer, pored nedostatne stanične

imunosti, mogu imati i smanjen broj neutrofila zbog imunosupresivne terapije (62). Da teška neutropenija može rezultirati povećanom osjetljivošću na listeriju pokazano je pokusima na miševima s potpunom deplecijom neutrofila (63).

Makrofagi sudjeluju u kontroli imunološkog odgovora izravnim kontaktom s ostalim imunocitima ili lučenjem topljivih posrednika. Poznato je više od 100 različitih tvari koje luče makrofagi, a utječu na razmnožavanje, sazrijevanje i izvršne funkcije ostalih imunocita. Među njima su hidrolitički enzimi, komponente komplementa, metaboliti kisika, dušikov oksid, bioaktivni lipidi (prostaglandini, leukotrieni), čimbenici rasta itd. Ove profesionalne fagocitne stanice luče i citokine kao čimbenik nekroze tumora (TNF; od engl. tumor necrosis factor), IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 i gama interferon (IFN- γ ; od engl. interferon gamma) (53,64). Premda im je fagocitoza temeljna obrambena funkcija, makrofagi mogu i predočavati antigene limfocitima u sklopu antigena glavnog sustava tkivne snošljivosti (MHC, od engl. major histocompatibility complex) razreda I i II. Izvršna funkcija makrofaga predstavlja njihovu ključnu ulogu u prirođenoj antilisterijskoj imunosti i uključuje baktericidne mehanizme posredovane reaktivnim dušikovim oksidima i kisikovim radikalima koji lipidnom peroksidacijom razaraju bakterije i membranske strukture tkiva (65). No, poznato je da *L. monocytogenes* može preživjeti fagocitozu i razmnožavati se unutar makrofaga pa oni tako mogu postati rezervoar vijabilnih bakterija. Aktivacija makrofaga putem IFN- γ izlučenim od strane NK i limfocita znatno doprinosi njihovim baktericidnim mehanizmima. Produkcija IFN- γ aktivira makrofage na povećanu proizvodnju citokina TNF- α i IFN- γ te dušikovih oksida što predstavlja ključne mehanizme prirodene imunosti (66,67).

Za razliku od makrofaga, glavna je uloga klasičnih DC u odgovoru na *L. monocytogenes* prerada i predočavanje antigena T limfocitima. Klasične imunopredočne CD11c+ DC imaju ključnu ulogu u stimulaciji naivnih limfocita T predstavljajući tako sponu između mehanizama prirodene i stečene imunosti (68). DC fagocitiraju listeriju, nakon čega se većina internaliziranih bakterija zadržava u fagosomima, a tek manji broj njih se nađe slobodan u citoplazmi (69). Nakon ingestije mikroorganizama, DC putuju iz tkiva do regionalnih limfnih čvorova, sazrijevajući u zrele imunostimulacijske DC. Listerijski se proteini prerađuju i predočavaju na membrani DC stanica u kontekstu MHC antigena razreda I i II, nakon čega dolazi do aktivacije naivnih limfocita T. Novija

istraživanja ukazuju na različitu ulogu DC u različitim tkivima; DC stanice pojedinih tkiva imaju permisivnu ulogu za umnožavanje *L. monocytogenes* dok je u drugima spriječavaju (70). Nedavno su otkrivene nove podvrste DC koje sudjeluju u antilisterijskom odgovoru. Ove stanice su nazvane TIP-DC (od engl. tumor necrosis factor and inducible nitric oxide synthase producing) budući da izlučuju TNF- α i iNOS (71,72). Pronađena je i populacija DC nazvanih IK-DC (od engl. interferon-producing killer) koje izravno uništavaju zaražene stanice mehanizmima karakterističnim za prirodno-ubilačke stanice (NK; od engl. natural killer) (73).

1.5.2. Uloga stanica stečene imunosti

Prepoznavanje antigena svojstvo je specifične, stečene imunosti i za taj su proces odgovorne dvije različite vrste molekula: receptori za antigen na limfocitima B (BCR; od engl. B cell receptor) i receptori za antigen na limfocitima T (TCR; od engl. T-cell receptor). Dok stanice prirodene imunosti (makrofagi, neutrofil i NK stanice) sudjeluju u nadzoru rane faze infekcije bakterijom *L. monocytogenes*, specifična imunost posredovana limfocitima T igra kritičnu ulogu u rezoluciji primarne infekcije i osigurava imunost na ponovnu infekciju. Premda se smatralo da humoralna imunost čiju su nositelji limfociti B ne predstavlja bitan dio protulisterijske imunosti, neka novija istraživanja ukazuju na dosada neprepoznatu ulogu protutijela u protulisterijskom odgovoru (74). *In vivo* studije na miševima pokazuju da monoklonska protutijela mogu neutralizirati listerijski toksin LLO izlučen unutar fagocitne stanice (75). U serumu i sluznici tankog cijeva intragastrično inficiranih pokusnih životinja uočena je produkcija specifičnih protulisterijskih IgA protutijela čija zaštitna uloga tek treba biti ispitana (76).

Dugi je niz godina poznato da limfociti T posreduju čišćenje organizma od infekcije listerijom (77). Premda neka istraživanja ukazuju na važnost $\gamma\delta$ limfocita T sluznice crijeva, smatra se da $\alpha\beta$ limfociti T imaju vodeću ulogu u primarnom protulisterijskom odgovoru, kao i uspostavi dugotrajne imunosti na sekundarnu infekciju (74). S obzirom na površinske biljege razlikuju se dvije subpopulacije $\alpha\beta$ limfocita T: pomagački CD4+ i citotoksični CD8+ limfociti. Pomagački CD4+ limfociti T mogu se dalje podijeliti prema funkciji, t.j. lučenju citokina: izvršne Th1 (od

engl. T helper) stanice koje luče IFN- γ te aktiviraju makrofage i pomažu djelatnost citotoksičnih T limfocita; izvršne Th2 stanice koje aktiviraju B stanični odgovor putem IL-4, IL-5 i IL-13 i regulacijske Treg limfocite (78). Upalotvorni citokini (IL-12, TNF- α , IL-6) koje luče imunopredočne stanice DC i makrofagi diferenciraju aktivirane CD4+ limfocite u Th1 pomoćničke stanice (79). Th1 stanice imaju središnju ulogu u aktivaciji makrofaga, osiguravaju zaštitu protiv virusa i unutarstaničnih bakterija te se smatraju ključnim stanicama za kontrolu listerioze (80). Povećana osjetljivost na infekciju *L. monocytogenes* veže se uz promjenu citokinskog obrasca Th1 u Th2.

Iako aktivirani makrofagi pokazuju snažan protulisterijski učinak bakterija može pobjeći iz fagocitne vezikule u citoplazmu stanice te tako izbjeći uništenje. Prisutnost bakterija u citoplazmi makrofaga može biti detektirana CD8+ limfocitima T koji liziraju inficirane makrofage. Citotoksični CD8+ limfociti sadrže specijalizirane litičke granule s preformiranim citotoksinima koji se, nakon kontakta s inficiranim ciljnim stanicama, otpuštaju izravno u stanicu što vodi do njene aktivacije ili smrti. CD8+ limfociti T također luče citokine koji mogu djelovati na citokinske receptore izražene lokalno ili na udaljenim hematopoetskim stanicama (81). Tijekom *L. monocytogenes* infekcije senzibilizirani CD8+ citotoksični limfociti uništavaju zaražene stanice izlučujući pri tom IFN- γ , TNF- α , perforin i granzime (32, 82).

Antigeni *L. monocytogenes* koji potiču izvršni CD8+ stanični odgovor su LLO i p60 hidrolaza, a *in vivo* pokusima je pokazano da je broj izvršnih limfocita T najveći osam dana nakon intravenske inokulacije bakterije (74). Perforin-ovisna citoliza nije neophodna za CD8+ T staničnu imunost protiv *L. monocytogenes*. Zanimljivo je da se zaštita putem CD8+ limfocita razlikuje u pojedinim tkivima. Tako CD8+ limfociti T u miševa s nedostatkom perforina i TNF- α omogućavaju zaštitu od *L. monocytogenes* u tkivu jetre, ali ne i u slezeni inficiranih životinja (83). Iako limfociti T izražavaju veliki broj receptora na svojoj površini, aktivacija ovih stanica stečenog imunološkog odgovora ovisi o indukciji kostimulacijskih molekula te sekreciji citokina i kemokina od strane stanica prirodnog imunološkog odgovora. Određena klinička stanja ili imunosupresivni lijekovi koji oštećuju stanicama posredovanu imunost kao što je primjena monoklonskih protutijela na TNF- α , povećavaju rizik od razvoja invazivnih oblika listerioze (84,85).

1.5.3. Upalni medijatori u kontroli listerioze

1.5.3.1. *TNF- α* i *TNF receptori*

Obitelj čimbenika nekroze tumora sastoji se od devetnaest citokina koje proizvode limfociti i monociti, a nalaze se u topljivoj formi ili kao vezane molekule smještene na površini stanica (86). Članovi TNF obitelji ostvaruju svoj biološki učinak vezanjem na TNF receptore (TNFR) koji čine veliku obitelj transmembranskih proteina. Većina izvršnih limfocita T ističe TNF proteine kao površne molekule na membrani stanice. Međustanična komunikacija između TNF i njihovih receptora ima važnu ulogu u izgradnji struktura kao što su limfatični organi ili upalna žarišta. Brza i snažna signalizacija putem ovih medijatora i njihovih receptora tijekom upalnog i imunološkog odgovora odlučujuća je za nadzor nad proliferacijom, diferencijacijom i apoptozom imunoloških stanica (87).

TNF- α svoj učinak ostvaruje vezanjem na receptore TNFR1 i TNFR2. Aktivacija TNFR1 rezultira složenom unutarstaničnom signalizacijom koja dovodi do prepisivanja upalnih gena, proliferacije, diferencijacije i aktivacije stanice, ali može inducirati i programiranu smrt stanice u kojoj je blokirana sinteza proteina (88). Primarna uloga TNF- α je djelovanje na stanice imunološkog sustava (89). TNF- α posjeduje brojne proupalne aktivnosti, uključujući indukciju citokina i aktivaciju endotelnih stanica, makrofaga i neutrofila. TNF- α je jedan od čimbenika sustavnog upalnog odgovora u sepsi, a ima ulogu i u patogenezi nekih autoimunih bolesti kao što je reumatoidni artritis (86). Luče ga makrofagi i brojne druge stanice uključujući limfoidne i endotelne stanice, fibroblaste i neurone. Lučenje TNF- α može biti potaknuto konzerviranim strukturnim molekularnim obrascima zajedničkim različitim patogenima kao što su peptidoglikan, lipopolisharid (LPS) i bakterijska DNK. Eksperimentalnim modelima infekcije u TNFR1-/- miševa pokazana je dominantna uloga ovog receptora u TNF- α signalizaciji u imunološkom odgovoru domaćina na niz patogenih bakterija, gljiva i parazita (90,91,92,93).

TNF- α je uz IL-12 i IFN- γ svrstan u tip 1 citokina koji su ključni za imunost na unutarstanične patogene uključujući mikobakterije i lišmanije. Dok je uloga IL-12 i IFN- γ u tipu 1 imunosti jasno definirana kao proupalna, rezultati novijih istraživanja sugeriraju da TNF- α djeluje i kao protuupalni medijator. U TNFR1 $^{-/-}$ animalnom modelu infekcije u tkivima inficiranih životinja uočena je izražena upalna patologija s naglašenim T limfocitnim infiltratima, TNF- α i TNFR1-deficijenti miševi inficirani mikobakterijama imaju teška oštećenja tkiva i povećane sistavne razine IL-12 (94,95). TNF- α može izravno ograničiti pretjerani odgovor limfocita T mehanizmima apoptoze ili posredno kroz regulaciju IL-12 ukoliko je prisutan funkcionalan TNFR1 receptor. TNFR1 se smatra glavnim receptorom uključenim u regulaciju IL-12. U TNFR1 $^{-/-}$ miševa inficiranih bakterijom *Citrobacter rodentium* uočeno je značajno povišenje produkcije IL-12 (96). Navedene studije sugeriraju različitu ulogu TNF- α , ovisno o vremenu nakon infekcije. U odsutnosti TNF- α ili njegovog receptora upalni odgovor je odgođen, međutim, kasnije tijekom infekcije dolazi do poremećenog i pretjeranog upalnog odgovora (94,95,96).

Brojni su *in vivo* i *in vitro* pokusi pokazali važnost TNF- α u protulisterijskom odgovoru. Ipak, dvojbeni su rezultati da li je uloga TNF- α u upalnim procesima u SŽS-u zaštitna ili destruktivna. Aktivirane mikroglija stanice (rezidentni makrofagi) i astrociti su glavni izvori TNF- α i drugih citokina u moždanom tkivu. Izlučeni TNF- α u tkivu mozga potiče lučenje kemokina MCP-1 i Crg-2/IP-10 (od engl. cytokine responsive gene/IFN- γ -inducible protein) te dovodi do apoptoze humanih neuronalnih prekursorskih stanica putem TNFR1 koji je konstitucijski izražen na neuronima (89). Rezultati drugih istraživača govore u prilog tome da je TNF- α odgovoran za kontrolu unutarstaničnog razmnožavanja *L. monocytogenes* u moždanom tkivu ali ne i za destrukciju moždanog tkiva (97). *In vivo* pokusi na laboratorijskim životinjama s nedostatkom TNF- α ili njegovog receptora TNFR1 pokazali su njihovu izrazitu osjetljivost na infekciju niskim dozama *L. monocytogenes* (98,99,100).

1.5.3.2. IFN- γ

Rana produkcija IFN- γ ključni je korak u imunološkoj obrani protiv patogena kao što su unutarstanične bakterije, virusi i gljive. Već dugi niz godina poznato je da IFN- γ ima ključnu ulogu i u protulisterijskom odgovoru (101). Poznato je da su aktivirani limfociti T i aktivirane NK stanice izvor IFN- γ . Rezultati istraživanja pokazuju da IFN- γ , nakon infekcije *L. monocytogenes* luče uglavnom NK stanice, a u manjoj mjeri limfociti CD8+ i CD4+ (102). Međutim, druge su studije pokazale da unatoč tome što NK stanice izlučuju IFN- γ , njihova uloga u protulisterijskoj zaštiti nije presudna jer su limfociti T najvažniji IFN- γ proizvođači tijekom rane faze infekcije listerijom (103,104).

Neki su *in vitro* pokusi pokazali da i APC stanice, poput makrofaga i DC, mogu nakon stimulacije listerijom izlučivati IFN- γ što doprinosi kontroli infekcije *in vivo* (105). IFN- γ je snažan modulator funkcija različitih vrsta stanica uključujući makrofage. Aktivacija makrofaga potiče seriju biokemijskih reakcija koje makrofage pretvaraju u snažne antimikrobne izvršne stanice. U aktiviranim makrofagima dolazi do učinkovitije fuzije lizosoma s fagosomom nakon čega se fagocitirani mikroorganizmi izlažu različitim mikrobicidnim lizosomnim enzimima. Aktivirani makrofagi proizvode kisikove radikale i dušikove okside (NO; od engl. nitric oxide) koji imaju snažan antimikrobni učinak, te sintetiziraju anitimikrobne peptide koji mogu djelovati i izvan stanice. Dodatno, povećano ispoljavanje MHC molekula klase II, CD40 i TNF receptora na makrofagima čini ove APC stanice efikasnijim u predočavanju antigena novopridošlim limfocitima. Aktivacija makrofaga putem IFN- γ važan mehanizam je zaštite od patogena koji se umnožavaju u vezikulama makrofaga. U miša s nedostatkom gena za IFN- γ produkcija antimikrobnih tvari u makrofagu je oštećena te životinje podliježu subletalnim dozama *Mycobacterium* i *Leishmania* vrsta (106).

1.5.3.3. IL-12p40

Interleukin-12 (IL-12) je proupalni citokin koji potiče lučenje IFN- γ , TNF- α i diferencijaciju Th1 pomoćničkih limfocita, a svojim biološkim učinkom povezuje mehanizme prirodene i stečene imunosti (107). IL-12 je heterodimer sastavljen od p35 i p40 podjedinica. Podjedinica p40 sastavni je dio još dva citokina - heterodimera IL-23, kao i homodimera IL-12p80 (108). Podjedinicu p40 uglavnom izlučuju aktivirane upalne stanice kao što su makrofagi, neutrofili, mikroglia i DC nakon stimulacije različitim patogenim ili upalnim agensima. Novijim je istraživanjima ustanovljeno da IL-12p40 ima i neovisnu intrinzičnu funkcionalnu aktivnost. IL-12p40 se izlučuje u suvišku u odnosu na ostale podjedinice koje izgrađuju IL-12 i IL-23 te pokazuje kemotaktičan učinak na makrofage i pospješuje migraciju bakterijama stimuliranih DC. U modelu murine tuberkuloze nedostatak IL-12p35 podjedinice ima znatno slabiji učinak na obranu domaćina od infekcije nego nedostatak IL-12p40 (109). Homodimer IL-12p80 potiče produkciju IFN- γ u CD8+ T limfocitima i djeluje na stanice mikroglie u kojima potiče produkciju TNF- α i NO (110). Rezultati ovih istraživanja sugeriraju da je lučenje IL-12p40 jedan od najranijih koraka u imunološkom odgovoru nakon aktivacije DC.

Budući da je mRNK za podjedinicu p35 prisutna u različitim tipovima stanica, uključujući i limfocite koji ne produciraju IL-12, ubikvitarna priroda mRNK za p35 otežava analizu njene regulacije u istraživanjima tkivne ekspresije. Za razliku od toga, ekspresija IL-12p40 ograničena je na stanice koje luče biološki aktivan heterodimer (107).

Kao što je slučaj s drugim proupalnim citokinima, produkcija IL-12p40 regulirana je pozitivnim i negativnim regulacijskim mehanizmima. Istraživanja ukazuju da TNF- α pokazuje inhibitoran učinak na IL-12p40 produkciju, a TNFR1 se smatra glavnim receptorom uključenim u regulaciju IL-12p40. TNFR1 deficijentni miševi inficirani bakterijom *Citrobacter rodentium* pretjerano luče IL-12 što ima za posljedicu snažan Th1 odgovor i nastanak teških oštećenja tkiva (96). Makrofagi bez TNFR1 pokazuju otpornost na TNF- α posredovanu inhibiciju lučenja IL-12

(111). Proučavanje uloge IL-12p40 važno je za bolje razumijevanje kako zaštitnog tako i patološkog imunološkog protulisterijskog odgovora.

1.5.3.4. IL-10

Citokini izlučeni od strane DC tijekom inicijalne faze T stanične aktivacije igraju najvažniju ulogu u procesu diferencijacije naivnih limfocita T i pokretanja stečenog imunološkog odgovora. Dok IL-12, IL-27 i IFN- γ usmjeravaju polarizaciju limfocita prema Th1 fenotipu, izlaganje naivnih limfocita T citokinima IL-4, IL-5 i IL-10 (i IL-6 u miša) rezultira indukcijom Th2 staničnog odgovora (112). IL-10 potiče i stvaranje trećeg tipa pomoćničkih limfocita T-regulacijskih (Treg) stanica. Tako Th1/Th2/Treg ravnoteža i učinkovito odstranjenje invadirajućeg patogena ovise o regulaciji lučenja citokina od strane DC tijekom njihovog djelovanja na naivne limfocite T.

IL-10 je važan čimbenik održavanja fine ravnoteže u obrani od patogena i štetne sustavne upale. Ovaj citokin inhibira kostimulacijske aktivnosti mnogih antigen predočnih stanica (makrofagi, DC), smanjuje aktivaciju limfocita T i izlučivanje IL-2 i IFN- γ . IL-10 *in vivo* inhibira lučenje TNF- α i IL-12. Kako trudnoću karakterizira fiziološka prevaga Th2 limfocitnog odgovora s produkcijom imunosupresivnih citokina IL-4 i IL-10, supresivni se učinak ovih citokina na razvoj Th1 staničnog odgovora smatra jednim od razloga povećane osjetljivosti trudnica na listeriozu (53,113,114). *In vivo* pokusima je potvrđeno da IL-10 deficijentni miševi bolje kontroliraju primarnu i sekundarnu *L. monocytogenes* infekciju u odnosu na kontrolne životinje (115). Pokusima na IL-10 deficijentnim miševima u kojima su i mužjaci i ženke pokazali jednaku osjetljivost na listeriju dokazano je da su ženke osjetljivije na infekciju zbog povišenih serumskih vrijednosti IL-10 (116). Međutim, novija istraživanja ukazuju i na zaštitnu ulogu IL-10 tijekom infektivnog procesa. Dokazano je da je ovaj citokin neophodan za spriječavanje intracerebralnog hiperinflamatornog odgovora tijekom eksperimentalnog listerijskog meningoencefalitisa (117). Također, infekcije *Bordetella burgdorferi* i *Neisseria meningitidis* u miša ukazuju na ulogu ovog imunosupresivnog citokina u inhibiciji upalnog odgovora u mikroglijiji i astrocitima mozga.

Lučenjem IL-10 rezidentne stanice glije mogu ograničiti potencijalno štetnu upalnu reakciju unutar SŽS-a u odgovoru na invadirajuće patogene (118).

1.5.3.5. Kemokini Crg-2/IP-10, MCP-1, MIP-1 α i RANTES

Kemokini pripadaju obitelji kemotaktičih citokina koji dijele homologiju u građi na osnovu četiri konzervirana cisteinska ostatka u svojoj molekuli. Funkcionalna podjela svrstava kemokine u konstitucijske (homeostatske) koji reguliraju promet leukocita tijekom hematopoeze i inflamatorne koji igraju ključnu ulogu u imunološkom i upalnom odgovoru. Na mjestu ulaska patogena u organizam dolazi do inicijacije upalnog odgovora od strane nadzornih stanica kao što su DC, makrofagi i $\gamma\delta$ limfociti T. Mikrobnii antigeni započinju kaskadu prirodnog imunološkog odgovora koja rezultira proizvodnjom brojnih upalnih kemokina od strane lokalnih imunoloških i tkivnih stanica i stvaranjem upalnog mikrookoliša. Nadzorne imunološke stanice, osim receptora kojima prepoznaju patogene, također izražavaju i receptore za proupalne citokine. Kemokini djeluju na lokalni mikrookoliš upalnih citokina privlačeći makrofage i podržavajući izvršni odgovor limfocita T, te tako imaju odlučujuću ulogu na progresiju bolesti i njezin kronicitet. Uloga kemokina značajna je ne samo u zaštitnom imunološkom odgovoru već i u angiogenezi, hematopoezi i organogenezi, a pretjerano lučenje proupalnih kemokina može imati ulogu u imunopatogenezi bolesti (119).

Crg-2/IP-10/CXCL10 (od engl. cytokine responsive gene-2/interferon-inducible 10-kDa protein/CXC chemokine ligand) pripada CXC obitelji kemokina kod kojih su dva konzervirana cisteina u molekuli odijeljena aminokiselinskim ostatkom. Dok je Crg-2 murini kemokin, IP-10 je njegov humani homolog, a pokazuju kemotaktično svojstvo na limfocite T i NK stanice (120). Crg-2/IP-10 luče monociti, fibroblasti i endotelne stanice, a njegova je sinteza inducirana IFN- γ i bakterijskim LPS-om. Ovaj kemokin ima važnu ulogu u usmjeravanju aktiviranih limfocita T na mjesto upalnog procesa i smatra se da je važan regulator IL-12 vođenog Th1 upalnog odgovora (121). Povećana ekspresija Crg-2/IP-10 zabilježena je u brojnim infektivnim i autoimunim

bolestima (122,123). Između ostalog ističe se i njegova uloga u antivirusnom odgovoru kao i u patogenezi autoimunih oboljenja SŽS-a (124).

U CC obitelj kemokina svrstavaju se kemokini kojima se prva dva konzervirana cisteinska ostatka nalaze jedan do drugoga, a djeluju kemotaktično na monocite i subpopulacije limfocita T. U CC kemokine između ostalih ubrajaju se MCP-1/CCL2 (od engl. monocyte chemotactic protein/CC kemokine ligand), MIP-1 α /CCL3 (od engl. macrophage inflammatory protein) i RANTES/CCL5 (od engl. regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted). Započinjanje imunološke reakcije migracijom nezrelih imunopredočnih DC iz cirkulacije do mjesta upale ovisi o inducibilnim kemokinima kao što su RANTES, MIP-1 α i MCP-1. Pod utjecajem ovih kemokina dolazi do sazrijevanja DC, lučenja citokina IL-1, IL-6 i TNF- α , te modulacije privlačenja i polarizacije limfocita T (125).

Osim makrofaga i nekih tkivnih stanica kao što su hepatociti, MCP-1 pretežno luče limfociti Th1 subpopulacije, a uloga mu je usmjeravanje monocita i memorijskih limfocita T kroz endotel na mjesto infekcije. MCP-1 regulira diferencijaciju limfocita T kroz CC kemokinski receptor 2 (CCR2) izražen na limfocitima T (126). Nedostatak MCP-1 u miševa inficiranih citomegalovirusom rezultira smanjenim nakupljanjem makrofaga i NK stanica, te smanjenjem produkcije MIP-1 α i IFN- γ (127). Visoki gradijenti koncentracije kemokina MCP-1 u jetri, slezeni i plućima miševa inficiranih listerijom ukazuju na njegovu vjerojatnu ulogu u regulaciji lokalnog imunološkog odgovora tijekom rane faze listerioze (128). No i pretjerano lučenje proupalnih kemokina može biti štetno. Iako neuropatološke posljedice lučenja kemokina od strane neurona nakon stimulacije citokinom TNF- α nisu potpuno istražene, za MCP-1 je pokazano da je uključen u različita oboljenja SŽS-a (129). U mozgu, kemokinski receptori su pronađeni na stanicama mikroglije (makrofagi mozga), ali i na astrocitima, oligodendrocitima i neuronima (130).

MIP-1 α luče brojne imunološke (limfociti, monociti/makrofagi, bazofili) i epitelne stanice. Humani MIP-1 α ima primaran kemoatraktivan učinak na monocite, dok murini MIP-1 α uz različite mononuklearne stanice privlači i neutrofile (131). Mikroglija producira MIP-1 α nakon stimulacije s LPS, TNF- α ili IL-1 β , a astrociti nakon stimulacije s IL-1 β (132). Iako inficirani

miševi s nedostatkom gena za MIP-1 α imaju manje izražene upalne promjene u tkivu, ove su životinje istovremeno osjetljivije na infekcije različitim patogenima (133,134). Suvišak produkcije ovog kemokina također može rezultirati povećanim oštećenjem tkiva i višom stopom mortaliteta (135). Tako i povećana, ali i nedovoljna produkcija kemokina MIP-1 α može biti štetna po domaćina.

Između ostalih pripadnika CC obitelji kemokina RANTES se ističe snažnim privlačećim učinkom na CD8+ limfocite, te nešto slabijim na CD4+ limfocite, bazofile, eozinofile i NK stanice (136). Njegov značaj u patogenezi listerioze slabo je istražen. Poznato je da ga makrofagi inficirani listerijom luče u *in vitro* uvjetima (137). Eksperimentalno uočeni izostanak lučenja kemokina RANTES u tkivima miševa inficiranih listerijom mogao bi ukazivati na manji značaj ovog kemokina u regulaciji imunološkog odgovora tijekom rane faze listerioze (128).

1.5.3.6. IDO

Indolamin 2,3-dioksidogenaza (IDO, od engl. indoleamine 2,3-dioxygenase) je enzim koji djeluje na katabolizam aminokiseline triptofan. Učinak IDO na utrošak triptofana jedan je od najznačajnijih IFN- γ induciranih antimikrobnih efektorskih mehanizama u humanim makrofagima, astrocitima, fibroblastima i epitelnim stanicama. Visoka aktivnost enzima IDO dovodi do lokalne deplecije triptofana, što može inhibirati bakterijski rast budući da je triptofan esencijalna amino kiselina za neke bakterije kao što su streptokoki grupe B i enterokoki (138). Dobro je istražen i protubakterijski učinak IDO na bakterije roda *Chlamydia* koje su unutarstanični patogeni kao i *L. monocytogenes* (139). U posljednjih desetak godina postalo je jasno da IDO uz protumikrobnu aktivnost ima i važnu ulogu u imunološkom nadzoru (140). IDO aktivnost u stanicama kao što su makrofagi i DC, suprimira lokalni odgovor limfocita T blokirajući njihovu klonalnu ekspanziju čime se potiče imunološka tolerancija u mikrookolišu tijekom različitih fizioloških i patofizioloških stanja što su trudnoća, infekcija, transplantacija organa itd. (141).

1.5.3.7. iNOS i dušikovi oksidi

Karakteristika nespecifičnih imunoloških mehanizama je produkcija kemijski reaktivnih mikromolekula poput dušikovih i kisikovih spojeva koje ne prepoznaju razliku u genomskom sadržaju njihovih kemijskih ciljeva. NO nastaje iz aminokiseline L-arginin katalitičkim učinkom enzima inducibilne sintetaze dušikova oksida (iNOS; od engl. inducible nitric oxide synthase), a ima važnu ulogu u zaštiti od infekcije unutarstaničnim mikroorganizmima (142). Reaktivni dušikovi spojevi mogu oštetiti DNK i molekule kao što su Fe-S spojevi, hem, tioeteri i alkeni o kojima ovisi replikacija i zaštita DNK molekule. Miševi s nedostatkom gena za iNOS izrazito su osjetljivi na infekciju parazitom *Leishmania major*, te razvijaju znatno jači Th1-odgovor što sugerira efektorsku ulogu NO u imunološkoj kontroli ove unutarstanične infekcije (143). iNOS deficijentne životinje također su osjetljive na infekciju *L. monocytogenes*, a listerija preživljava u makrofagima miševa kojima nedostaje iNOS i NADPH oksidaza (65,71).

Makrofagi proizvode visoke razine enzima iNOS kada su aktivirani imunološkim stimulusima poput IFN- γ , TNF- α i LPS. Nastali NO djeluje proupalno i toksičan je ne samo za mikroorganizme već i za stanicu domaćina. Tako aktivacija makrofaga *in vivo* dovodi i do lokalnog oštećenja tkiva domaćina. Dobra regulacija aktivnosti makrofaga od strane Th1 stanica omogućava usmjeravanje ovih snažnih antimikrobnih mehanizama na patogene uz minimalna oštećenja lokalnog tkiva. Brza razgradnja mRNK IFN- γ na mjestu kontakta između aktiviranih Th1 stanica i ciljnih makrofaga ograničava učinak izvršnih limfocita T na inficirane makrofage. Citokini kao što su TGF- β (od engl. transforming growth factor), IL-4, IL-10 i IL-13 značajno inhibiraju aktivaciju makrofaga. Budući da nekoliko ovih inhibitornih citokina luče Th2 stanice, indukcija Th2 subpopulacije pomoćničkih limfocita T predstavlja važan način kontrole izvršne uloge aktiviranih makrofaga. Novijim je istraživanjima otkriveno da citokinima inducirana NO sinteza nije isključivo ograničena na makrofage, već je dio aktivnosti somatskih stanica koje su uključene u staničnu imunost (142). Iako su glija stanice u moždanom tkivu glavni produktori iNOS enzima *in vivo* studije su demonstrirale iNOS ekspresiju i u neuronima (144). Uz dodatak

izravnoj efektorskoj funkciji, NO je i snažni imunoregulator: sprječava apoptozu upalnih stanica, inhibitorno djeluje na ekspresiju gena stanične proliferacije, a može i inhibirati ekspresiju citokina u različitim stanicama (145).

1.6. Imunološki odgovor novorođenčeta

Novorođenačko razdoblje života karakterizira izrazita osjetljivost na infekcije. Imunološki odgovor u neonatalnom periodu uglavnom se temelji na mehanizmima prirodene imunosti, obzirom da se novorođenče prvi put susreće s antigenima te ne posjeduje stanice imunološkog pamćenja. Istraživanja pokazuju da je cirkulirajući broj polimorfonuklearnih fagocita u novorođenčadi fiziološki povišen u odnosu na vrijednosti u odraslih osoba. Dodatno, neonatalne neutrofile karakterizira odgođena apoptotska smrt, za razliku od brzog nastupa programirane smrti cirkulirajućih neutrofila odrasle osobe do koje dolazi unutar 24-48h nakon infekcije (146). Neke studije sugeriraju da neonatalni neutrofili koji pokazuju prolongiran vijek preživljavanja zadržavaju i specifične citotoksične i upalne osobine te navedeno mogu doprinosti patogenezi kroničnih upalnih bolesti (147). Dodatno, novorođenački neutrofili posjeduju različite funkcionalne poremećaje koji utječu na kvalitetu njihovog odgovora na antigen; poremećaj endotelne adhezije, transendotelne migracije, fagocitoze i smanjenu baktericidnu sposobnost (148).

Istraživanja funkcije neonatalnih limfocita T utvrdila su postojanje nekoliko prirodnih defekata ovih stanica, kao što je njihova slaba proliferacija u odgovoru na CD3 stimulaciju, te skretanje ka Th2 citokinskom odgovoru (149,150).

In vitro pokusima na neonatalnim kulturama stanica ispitana je funkcija pojedinih imunoloških stanica nakon infekcije listerijom, značajnim patogenom tijekom neonatalnog razdoblja. Istraživanja su pokazala da protulisterijski imunološki odgovor novorođenčeta karakterizira smanjena produkcija proupalnog citokina IFN- γ i povećana produkcija imunosupresivnog citokina IL-10 što utječe na kvalitetu upalnog odgovora i sprječava eliminaciju bakterija iz tkiva (151,152,153). Na *in vitro* modelu fetalnih perifernih mononukleara inficiranih listerijom utvrđena je njihova smanjena sposobnost prepoznavanja i predočavanja antigena te

smanjeno lučenje TNF- α (154,155). Rezultati *in vivo* studija u skladu su s rezultatima navedenih *in vitro* istraživanja. Niži broj profesionalnih antigen predočnih DC u limfoidnom tkivu, te njihova manja učinkovitost u produkciji proupalnih medijatora i proliferaciji Th1 limfocita mogao bi predstavljati razlog za veću osjetljivosti mišje sisančadi na *L. monocytogenes* infekciju u odnosu na odrasle jedinke. Pokusi na životinjama također su potvrdili da visoke koncentracije protuupalnog IL-10, izlučenog tijekom neonatalne listeroze, sprječavaju optimalno izlučivanje proupalnog IL-12 i posljedično razvoj Th1 zaštitnog protulisterijskog odgovora pomoćničkih limfocita (156,157).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Unatoč velikom napretku u razumijevanju mehanizama virulencije *L. monocytogenes*, dosadašnja saznanja o patogenezi listerioze, napose u imunokompromitiranih osoba, kao i fetusa i novorođenčadi još uvijek su nepotpuna. Prethodna su istraživanja pokazala važnost TNF- α i njegovog receptora TNFR1-/- u zaštitnom odgovoru na infekcije unutarstaničnim patogenima u koje se ubraja i *L. monocytogenes*. Cilj predložene doktorske disertacije bio je ispitati ulogu TNF- α i TNFR1 u kasnoj neonatalnoj listeriozi u *in vivo* modelu koristeći genetski deficijentnu mišju sisančad s nedostatkom TNFR1 i kontrolnu imunokompetentnu C57BL/6 sisančad.

Izostanak signaliziranja preko TNFR1 rezultira izostankom većine biološkog učinka TNF- α što može dovesti do modulacije produkcije drugih upalnih medijatora. Središnji istraživački ciljevi disertacije su praćenje tijeka infekcije, analiza upalnih infiltrata i utvrđivanje lokalne produkcije upalnih medijatora. Tkiva su analizirana imunohistokemijskim tehnikama da bi se ustanovila uloga pojedinih elemenata lokalne imunosti. Ispitani su proupalni citokini: IFN- γ , TNF- α i IL-12p40; protuupalni citokin IL-10; kemokini: MCP-1, RANTES, MIP-1 α , Crg-2/IP-10 i enzimi iNOS iIDO kako bi se utvrdila njihova uloga u patogenezi bolesti. Produkcija navedenih medijatora određena je u različitim tkivima i u različitim vremenskim intervalima u pokusnoj i kontrolnoj skupini životinja.

U zadnje se vrijeme, uz dugo poznatu proupalnu ulogu u imunološkom odgovoru, citokinu TNF- α pripisuje i protuupalni učinak. Praćenje titra bakterija u tkivima, određivanje lokalnog izražaja upalnih medijatora te usporedba upalnih infiltrata u tkivima imunodostatnih i imunoneodostatnih životinja pomoći će nam da bolje upoznamo imunološke mehanizme uključene u patogenezu neonatalne listerioze.

Ovom smo disertacijom željeli rasvijetliti dio mehanizama odgovornih za razvoj listerioze u novorođenčadi te ustanoviti kakva je uloga TNFR1 u protulisterijskom zaštitnom odgovoru.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijski soj

Korišten je se EGD (serovar 1/2a) soj *L. monocytogenes* dobiven iz Klinike za infektivne bolesti Leiden, Nizozemska, kojem je virulencija očuvana pasažom kroz miša, te *actA* deficijentna mutanta *L. monocytogenes* dobivena ljubaznošću dr Dirk Schlüter (Institut za medicinsku mikrobiologiju i higijenu Mannheim, Njemačka). Nakon uzgoja na krvnom agaru i presađivanja u tripton bujon, bakterije su inkubacijom dovedene u logaritamsku fazu i raspodijeljene u alikvote od 1 ml u Eppendorf kontejnere, te smrznute do upotrebe. Bakterijski inokulum pripremljen je odleđivanjem bakterije na 37 °C tijekom 2 h uz rotaciju, nakon čega je priređena suspenzija u fosfatnom puferu (PBS; pH 7,4). Turbiditet priređene bakterijske suspenzije određen je spektrofotometrijskom analizom pri valnoj duljini od 520 nm. Na osnovu izmjerene turbiditeta, iz baždarne krivulje očitana je približan broj bakterija u 1 ml suspenzije. Broj bakterija je kontroliran nasadivanjem desetorostrukih razrijeđenja suspenzije na krvni agar, te brojanjem CFU nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 24h.

3.2. Pokusne životinje

U eksperimentalnom radu korišteni su C57BL/6 (H-2b haplotip) i TNFR1^{-/-} miševi (dobiveni delecijom gena za TNFR1 u C57BL/6 miševa) uzgojeni u uzgojnoj koloniji u Vivariju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Mišja sisančad su inficirana drugog dana života te su za čitavo vrijeme trajanja pokusa životinje čuvane u priručnom Vivariju Zavoda za mikrobiologiju. Za svaku eksperimentalnu skupinu korišteno je 3-5 životinja. Ispitivane inficirane skupine životinja uspoređene su s kontrolnom, neinficiranom skupinom. Životinje su žrtvovane u različitim vremenskim periodima.

3.3. Etički aspekti istraživanja

Pokusi na životinjama izrađeni su u skladu s hrvatskim zakonima, pravilima i principima korištenja laboratorijskih životinja prema "The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" propisan od "The Council of International Organisations of Medical Science". Ovi principi su u skladu i sa Zakonom o dobrobiti životinja kao i Pravilnikom o radu s laboratorijskim životinjama Hrvatskog društva za laboratorijske životinje. Budući da su pokusi izvedeni u sklopu istraživačkog projekta "Listerioza u trudnoći" prethodno su odobreni od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Rijeci

3.4. Monoklonska i poliklonska protutijela

Za imunohistokemijska bojenja smrznutih preparata različitih tkiva korištena su sljedeća primarna protutijela: monoklonska štakorska protu-mišja protutijela dobivena iz supernatanta hibridomskih ATCC (American Type Culture Collection) staničnih linija (Manassas, Virginia, USA) te komercijalna monoklonska štakorska protu-mišja protutijela (Tablice 2 i 3). Za detekciju bakterije u parafinskim i smrznutim preparatima korištena su poliklonska zečja protu-*L. monocytogenes* protutijela (Difco, Detroit, Michigan, USA).

Tablica 2. Štakorska protu-mišja monoklonska protutijela iz hibridomskih staničnih linija

Primarno protutijelo	Vežanje na:	Klon
LCA	leukociti	klon TIB 122
Mac-1	makrofagi, granulociti	klon TIB-128
MHC II	makrofagi, DC, mikroglia	klon TIB-120
Ly6-G	neutrofili	klon RB6-8C5

Tablica 3. Komercijalna štakorska protu-mišja monoklonska protutijela

Primarno protutijelo	Vežanje na:	Klon	Proizvođač
CD4 (L3T4)	MHC II limfociti, NK-T limfociti	GK1.5	BD Pharmingen Heidelberg, Germany
CD8a (Ly-2)	MHC I limfocitiT	klon 53-6.7	BD Pharmingen
Mac-3	makrofagi, DC, mikroglia	M3/84	BD Pharmingen
CD45	leukociti	LCA, Ly5	BD Pharmingen
F4/80	makrofagi, mikroglia, monociti	CI:A3-1	Serotec, Dusseldorf, Germany

Od sekundarnih protutijela korištena su: kozja protu-zečja IgG F(ab')₂ sekundarna protutijela - Link UND Label kit (DCS Inovative Diagnostik - System, Germany), te biotinizirana zečja protu-štakorska IgG F(ab')₂ sekundarna protutijela - Vector rat IgG Vectastain ABC kit (Vector, England).

3.5. PCR početnice i sonde

Za reakciju povratnog prijepisa i umnožavanja (RT PCR, od engl. reverse transcriptase polymerase chain reaction) i Southern blot hibridizaciju komplementarne deoksiribonukleinske kiseline (cDNK) različitih upalnih medijatora korištene su specifične početnice i sonde (Sigma-ARK, Germany) prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Setovi početnica i sonda za PCR i Southern blot hibridizaciju

Gen		Slijed nukleotida (5' → 3')
HPRT	početnica	GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT C
	početnica	GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT TAG GC
	sonda	GTT GTT GGA TAT GCC CTT GAC
IDO	početnica	GTA CAT CAC CAT GGC GTA TG
	početnica	GCT TTC GTC AAG TCT TCA TTG
	sonda	TGC ACG ACA TAG CTA CCA GT
IFN- γ	početnica	AAC GCT ACA CAC TGC ATC TTG G
	početnica	GAC TTC AAA GAG TCT GAG G
	sonda	GGA GGA ACT GGC AAA AGG A
IL-10	početnica	CGG GAA GAC AAT AAC TG
	početnica	CAT TTC CGA TAA GGC TTG G
	sonda	GGA CTG CCT TCA GCC AGG TGA AGA
iNOS	početnica	TCA CGC TTG GGT CTT GTT CAC T
	početnica	TTG TCT CTG GGT CCT CTG GTC A
	sonda	TGA CCC TAA GAG TCA CCA AA
TNF- α	početnica	CGC TCT TCT GTC TAC TGA ACT TCG
	početnica	CTC CAG CTG GAA GAC TCC TCC CAG
	sonda	CCC GAC TAC GTG CTC CTC ACC
MCP-1	početnica	CTT CTG GGC CTG CTG TTC A
	početnica	CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA
	sonda	CTC AGC CAG ATG CAG TTA ACG CCC C
MIP-1 α	početnica	CCT GCT CAA CAT CAT GAA GG
	početnica	GAA TTG GCG TGG AAT CTT CC
	sonda	TCT GTA CCA TGA CAC TCG C
RANTES	početnica	GGT ACC ATG AAG ATC TCT GC
	početnica	GGG TCA GAA TCA AGA AAC CC
	sonda	CTC TCC CTA GAG CTG CCT CG
IL-12p40	početnica	GTG AAG CAC CAA ATT ACT CCG G
	početnica	GCT TCA TCT GCA AGT TCT TGG G
	sonda	CAG TGT CCT GCC AGG AGG ATG T
Crg-2/IP-10	početnica	CCA CGT GTT GAG ATC ATT GA
	početnica	GCT TAC AGT ACA GAG CTA GG
	sonda	TCC ATC ACT CCC CTT TAC CC

3.6. Inokulacija i određivanje titra *L. monocytogenes* u organima

Broj bakterija u priredenoj suspenziji *L. monocytogenes* $\Delta actA$ u PBS-u određen je spektrofotometrom (Bio Photometer, Eppendorf). Po 150 μ l suspenzije intraperitonealno (i.p.) je inokulirano TNFR1-/- i C57BL/6 miševima. CFU bakterijskog inokuluma iznosio je 3×10^3 po ml, odnosno 450 CFU po infektivnoj dozi (150 μ l). Skupini kontrolnih životinja (TNFR1+/+ i C57BL/6 miševi) i.p. je inokulirano 150 μ l PBS. Dinamika mortaliteta miševa praćena je tijekom dva tjedna. Titar bakterija u različitim organima (jetra, slezena, mozak) određen je bakteriološkom analizom

tkiva. Broj bakterija u tkivima određen je brojanjem CFU 24 h nakon nasađivanja desetorostrukih razrijeđenja tkivnih homogenata na krvni agar.

3.7. Patohistološka i imunohistokemijska analiza

Za patohistološku analizu korišteni su parafinski preparati. Životinje su u dubokoj narkozi (Ketamin hidroklorid) intrakardijalno perfundirane 4%-tnim paraformaldehidom. Izdvojeni organi fiksirani su 4%-tnim paraformaldehidom na 4 °C kroz 24 h te uklopljeni u parafin. 5-6 µm debeli parafinski preparati bojani su po Gramu, hematoksilinom i eozinom (HE) i perjodnom kiselom Schiff-ovom otopinom (PAS). Prisutnost *L. monocytogenes* u tkivu detektirana je metodom indirektno peroksidaze nakon prethodne deparafinacije preparata i pretretmana proteinazom K. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je korištenjem Peroxidase-Blocking solution (Dako Cytomation). Nakon dodavanja primarnih protu-*L. monocytogenes* protutijela dodana su sekundarna protutijela, a za vizualizaciju reakcije korišteni su peroksidaza (Link UND Label kit) i diaminobenzidin (DAB, od engl. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) kitovi (Sigma-Aldrich, Germany).

Za imunohistokemijske pretrage organi su izrezani, te na debelom filter papiru uklopljeni u medij za uklapanje Cryomatrix (Shandon, England) i naglo smrznuti u 2-metil butanu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) pothlađenom na suhom ledu. Do upotrebe su pohranjeni na -80 °C. Rezovi debljine 10 µm tretirani su protutijelima slijedeći ABC - protokol (od engl. complex of avidine and biotin). Korištena su prethodno navedena primarna i sekundarna protutijela. Reakcija su vizualizirane biotiniziranim enzimskim kompleksom korištenjem ABC Vectastain (Standard) kita (Vector, England). Preparati su obojeni DAB-om uz kontrastno bojenje hemalaunom te pokriveni želatinom i pokrovnim stakalcem.

3.8. Određivanje mRNK u tkivima, RT-PCR i southern blot hibridizacija

Ispoljenost sljedećih glasničkih ribonukleinskih kiselina (mRNK, od engl. messenger ribonucleic acid): IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p40, Crg-2/IP-10, RANTES, MIP-1 α , MCP-1, iNOS,IDO i HPRT (hipoksantin-gvanin-fosforibozil transferaza) analizirana je u smrznutim homogenatima mozga, jetre i slezene neinficiranih i inficiranih TNFR1-/- i C57BL/6 miševa. Ukupna mRNK je izolirana RNK ekstrakcijskim kitom NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Germany). Nakon obrnute transkripcije mRNK u cDNK korištenjem Superscript TM first strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen, CA, USA) na PCR uređaju T3000 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany) provedena je amplifikacija cDNK. Umnožavanje cDNK napravljeno je u volumenu od 30 μ l u PCR uređaju. PCR uvjeti su optimizirani za svaki set početnica. Nakon razdvajanja PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu cDNA odsječci su detektirani Southern blot metodom. Mrlje prisutnih ulomaka nukleinskih kiselina prenešene su na nitroceluloznu membranu (Pharmacia, Germany) radi hibridizacije sa specifičnim oligonukleotidnim sondama obilježenim digoksigeninom (DIG) na 3'-kraju (DIG oligonucleotide 3'-end labeling kit, Roche, Mannheim, Germany). Hibridizacijski produkti su vizualizirani autoradiografijom na rentgenskom filmu.

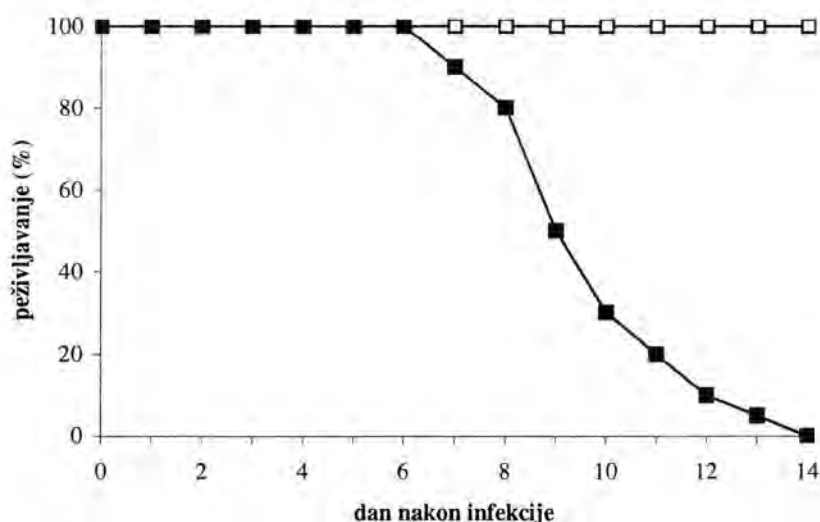
3.9. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađeni su računalnim programom za obradu podataka STATISTICA 7.1. StatSoft, Inc. (2005). Svim varijablama provjerena je normalnost distribucije rezultata. Predviđene povezanosti te njihove statističke značajnosti utvrđene su određivanjem koeficijenta korelacije. Vrijednosti su izražene kao medijana \pm interkvartilni raspon (IOR, od engl. interquartile range), a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa definirane kao $P < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Mortalitet TNFR1^{-/-} miševa inficiranih *L. monocytogenes* $\Delta actA$

Prethodnim smo pokusima ustanovili da dva dana stara TNFR1 deficijentna sisančad ugiba neposredno nakon infekcije virulentnom listerijom te je u ovom istraživanju korišten atenuirani soj bakterije *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Kako imunodeficijentni miševi ugibaju vrlo brzo i nakon primjene atenuirane listerije u dozi oko 10^4 - 10^5 CFU pokusne su životinje inficirane vrlo malom dozom bakterija. CFU bakterijskog inokuluma iznosio je 3×10^3 po ml, odnosno svega 450 bakterija po infektivnoj dozi (150 μ l).

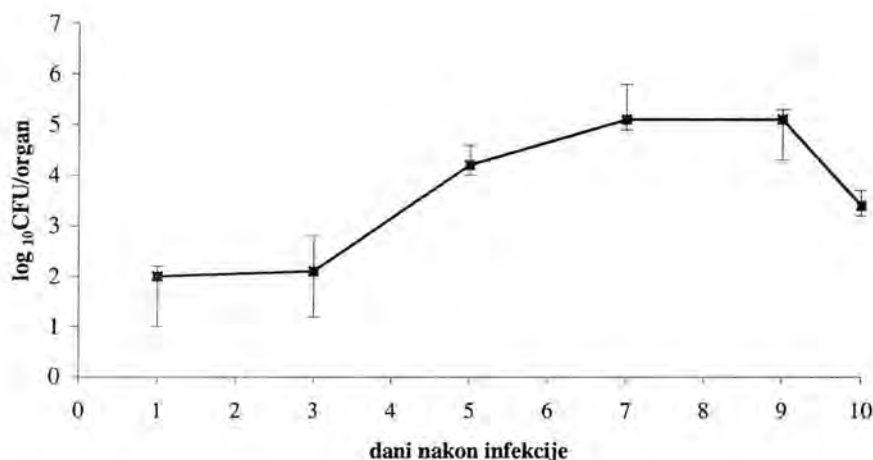


Sika 2. Preživljavanje miševa nakon intraperitonealne infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$. TNFR1^{-/-} (■) i C57BL/6 (□) miševi inficirani su i.p. (450 CFU po infektivnoj dozi). Svaka skupina sastoji se od 20 životinja.

Za razliku od imunokompetentne kontrolne skupine životinja koje nakon intraperitonealne infekcije s ~ 450 atenuiranih bakterija nisu pokazale klinički vidljive znakove bolesti, TNFR1 deficijentni miševi zaostajali su u rastu, te pokazivali znakove bolesti. Šest dana nakon infekcije imunodeficijentne životinje počele su ugibati da bi do kraja četrnaestog dana uginuli svi inficirani TNFR1^{-/-} miševi (Slika 2).

4.2. Broj bakterija u organima TNFR1^{-/-} miševa inficiranih *L. monocytogenes* $\Delta actA$

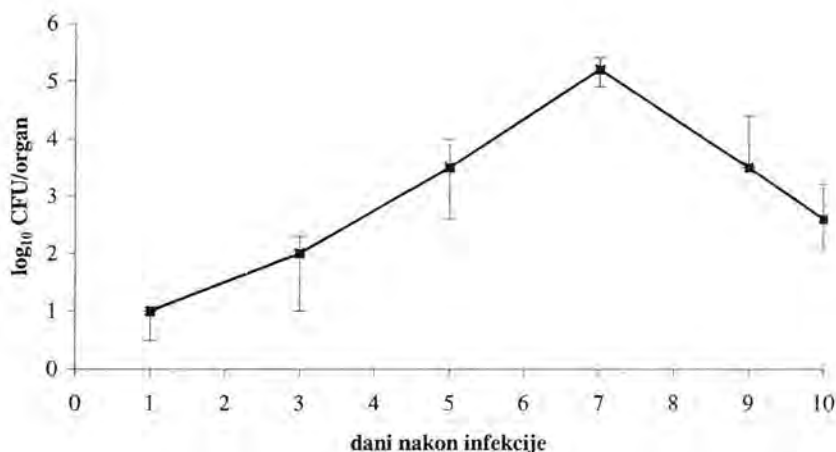
Inficirane imunodeficijentne životinje te inficirane kontrolne C57BL/6 životinje žrtvovane su 1, 3, 5, 7, 9 i 10 dana nakon intraperitonealne infekcije atenuiranom *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Iz homogenata slezene i mozga imunokompetentnih C57BL/6 miševa nasadenih na krvni agar nisu izolirane bakterije tijekom čitavog eksperimentalnog perioda.



Slika 3. Krivulja rasta *L. monocytogenes* $\Delta actA$ u jetri TNFR1^{-/-} miše sisančadi. Miševi su i.p. inficirani dozom od 450 bakterija. Rezultati predstavljaju medijane vrijednosti (n=3 po danu) \pm IQR.

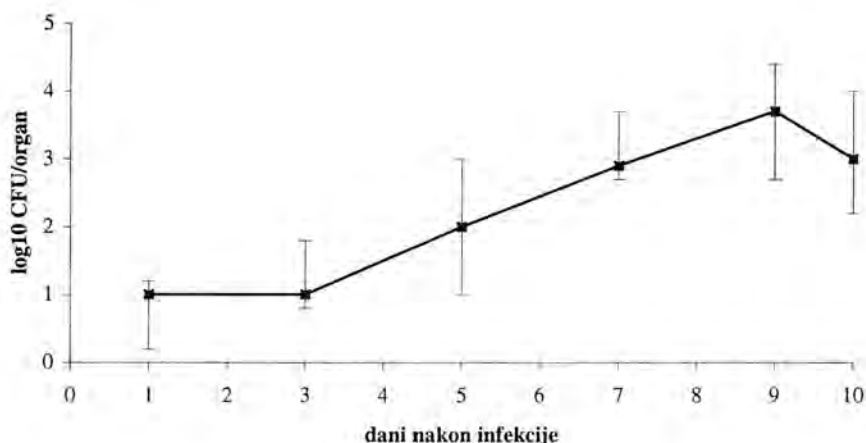
Iz jetre jednog dijela kontrolne C57BL/6 sisančadi izoliran je vrlo mali broj bakterija samo trećeg dana infekcije. Nasuprot tome, iz jetre inficiranih imunodeficijentnih životinja već je prvog dana nakon infekcije izoliran znatan broj bakterija (Slika 3). Broj bakterija u jetri postepeno se povećavao zadržavajući se na visokim vrijednostima do desetog dana nakon infekcije tj. do kraja eksperimentalnog perioda.

Iz slezene inficiranih imunodeficijentnih životinja već prvog dana nakon infekcije izoliran je manji broj bakterija koji se postepeno povećavao sve do sedmog dana nakon infekcije. Nakon toga broj bakterija se smanjivao do vrijednosti od 3 log₁₀ zabilježene na kraju eksperimentalnog razdoblja (Slika 4).



Slika 4. Krivulja rasta *L. monocytogenes* $\Delta actA$ u slezeni TNFR1^{-/-} mišje sisančadi. Miševi su i.p. inficirani dozom od 450 bakterija. Rezultati predstavljaju medijane vrijednosti (n=3 po danu) \pm IQR.

Iz mozгова inficiranih TNFR1^{-/-} miševa broj izoliranih bakterija se postupno povećavao dosegnuvši najviše vrijednosti (oko 4 log₁₀) devetog dana nakon infekcije (Slika 5). Iako se desetog dana infekcije broj bakterija u organu smanjio, ukupan broj bakterija u tkivu mozga jednak je broju bakterija u jetri i slezeni što pokazuje izrazit afinitet listerije za prodor i umnožavanje u mozgu mišje sisančadi.

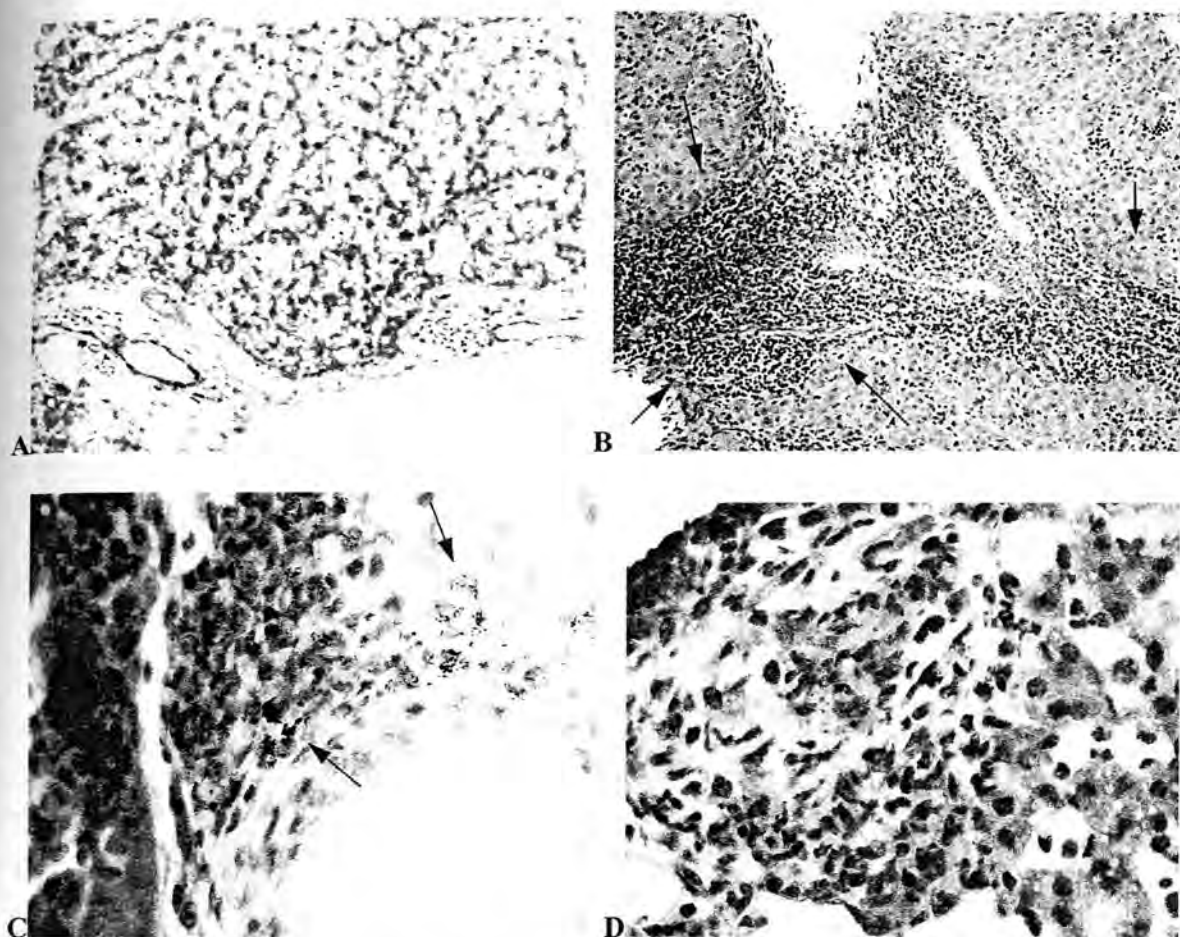


Slika 5. Krivulja rasta *L. monocytogenes* $\Delta actA$ u mozgu TNFR1^{-/-} mišje sisančadi. Miševi su i.p. inficirani dozom od 450 bakterija. Rezultati predstavljaju medijane vrijednosti (n=3 po danu) \pm IQR.

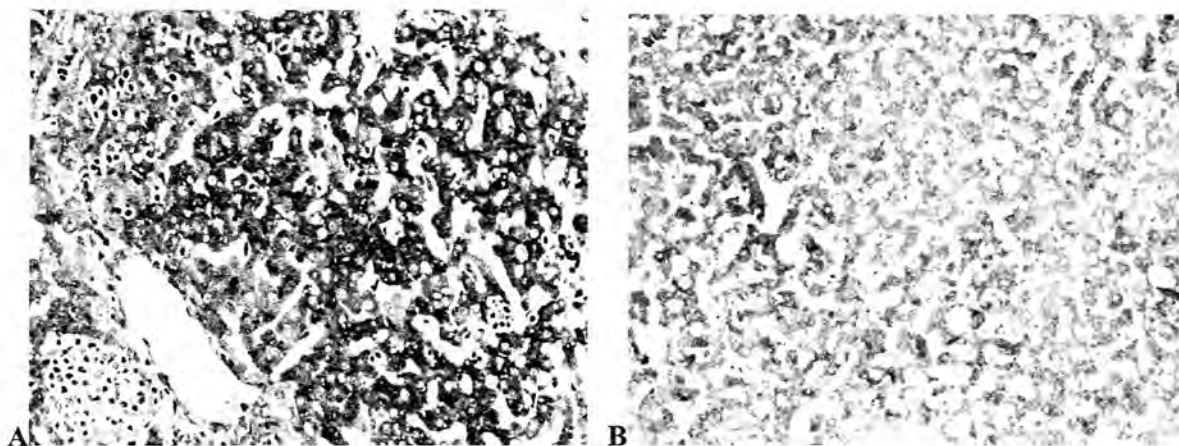
4.3. Patohistološka slika organa TNFR1^{-/-} miševa inficiranih *L. monocytogenes* $\Delta actA$

Makroskopskim pregledom jetre kontrolnih C57BL/6 životinja nisu pronađene patološke promjene. U organima imunodeficientnih TNFR1^{-/-} životinja bila je vidljiva žarišna nekroza tkiva s brojnim točkastim, sivkasto-bijelim čvorićima. Mikroskopskim pregledom preparata jetre u imunodostatnih C57BL/6 miševa nisu pronađene patološke promjene (Slika 6A), dok su u imunodeficientnih životinja pronađena brojna upalna žarišta. Napredovanjem infekcije povećavao se broj upalnih stanica i destrukcija tkiva. Većina se upalnih lezija sastojala od centralnih nekrotičnih područja okruženih neutrofilima i makrofagima. Na Slici 6B prikazan je upalni infiltrat u trigonumu jetre TNFR1^{-/-} miša u kojem se bojenjem po Gramu i specifičnim protulisterijskim bojenjem prikazuju nakupine bakterija (Slika 6C-D).

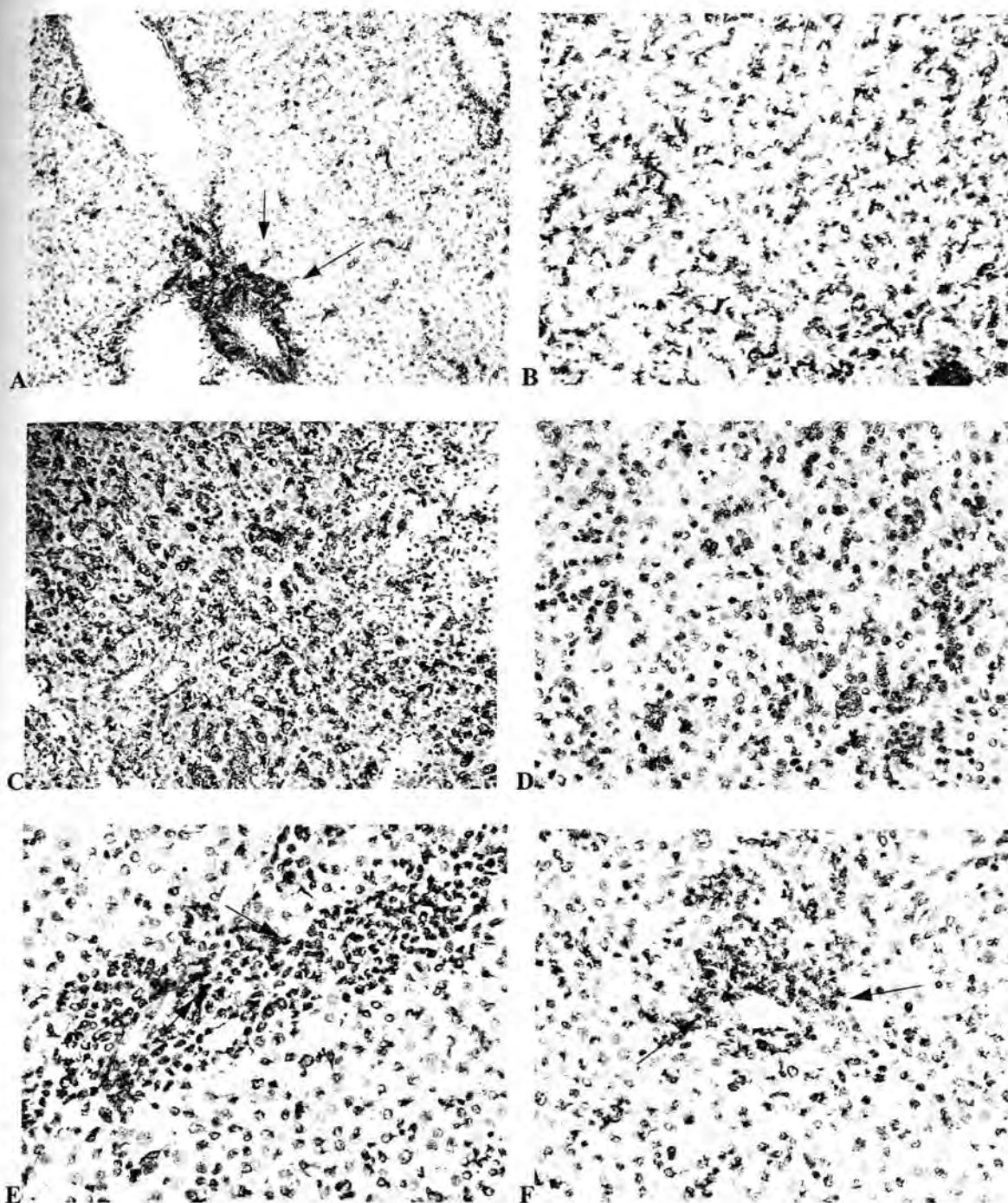
Nakupljanje unutarstaničnog glikogena u jetrenim stanicama analizirano je PAS bojenjem kojim se glikogen oboji žarko ružičasto-crveno, a jezgre stanica plavo. Iz Slike 7A može se uočiti da je jetra kontrolnih životinja obojena žarko crveno, dok je kod imunodeficientnih miševa preparat jetre obojene PAS-om blijedo ružičaste boje (Slika 7B). Ovo ukazuje na smanjenje zaliha glikogena i metabolički poremećaj u jetri inficiranih imunodeficientnih životinja u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 6. Mikromorfologija tkiva jetre miše sisančadi 7. dan nakon infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$.
 A. Tkivo bez patoloških promjena; C57BL/6 miš (HE bojenje na parafinskom rezu, povećanje 100 \times) B. Difuzni infiltrati upalnih stanica u trigonumu; TNFR1^{-/-} miš (HE bojenje na parafinskom rezu, povećanje 100 \times) C. Nakupine gram pozitivnih bakterija u tkivu; TNFR1^{-/-} miš (Gram bojenje na parafinskom rezu, povećanje 400 \times) D. Smeđe obojene nakupine bakterija u apscesu, TNFR1^{-/-} miš (imunohistokemijsko bojenje na listeriju na parafinskom rezu, povećanje 400 \times).



Slika 7. Mikromorfologija tkiva jetre miše sisančadi 7. dan nakon infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$.
 A. Žarko crveno obojene zalihe glikogena u hepatocitima, C57BL/6 miš (PAS bojenje, povećanje 200 \times) B. Blijedo ružičasto obojena jetra TNFR1^{-/-} miša (PAS bojenje, povećanje 200 \times).

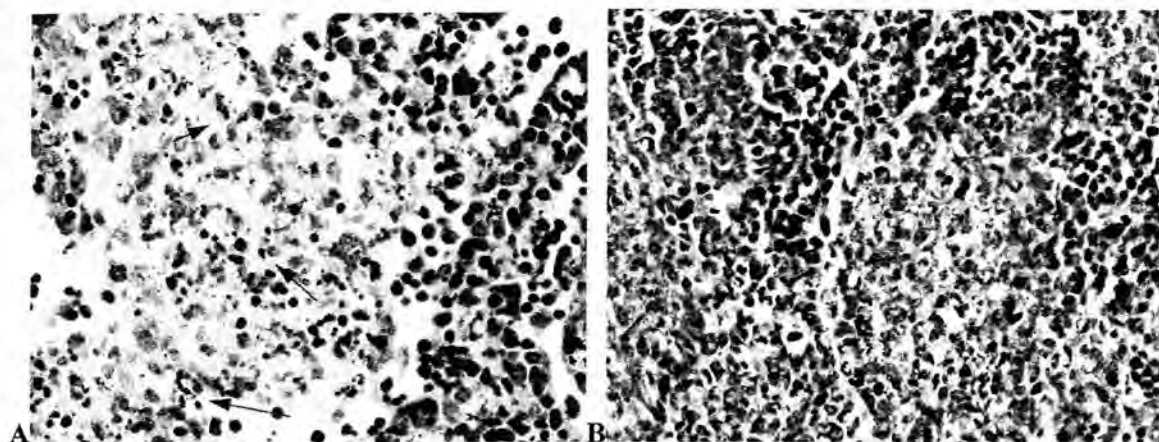


Slika 8. Upalni infiltrati u jetri TNFR1^{-/-} miševa 9. dan nakon infekcije *L. monocytogenes* Δ actA.

A. Difuzni infiltrati i nakupine makrofaga i granulocita oko sinusa (LCA bojenje, povećanje 100 \times) B. Brojni makrofagi i granulociti u nekrotičnom parenhimu (Mac1 bojenje, povećanje 200 \times). C. Difuzni infiltrati makrofaga (F4/80 bojenje, povećanje 100 \times) D. Brojni granulociti u parenhimu (RB6-8C5 bojenje, povećanje 200 \times). E. Manji broj CD8⁺ limfocita u upalnom infiltratu (CD8 bojenje, povećanje 200 \times) F. Nekoliko CD4⁺ limfocita u manjem upalnom žarištu (CD4 bojenje, povećanje 200 \times).

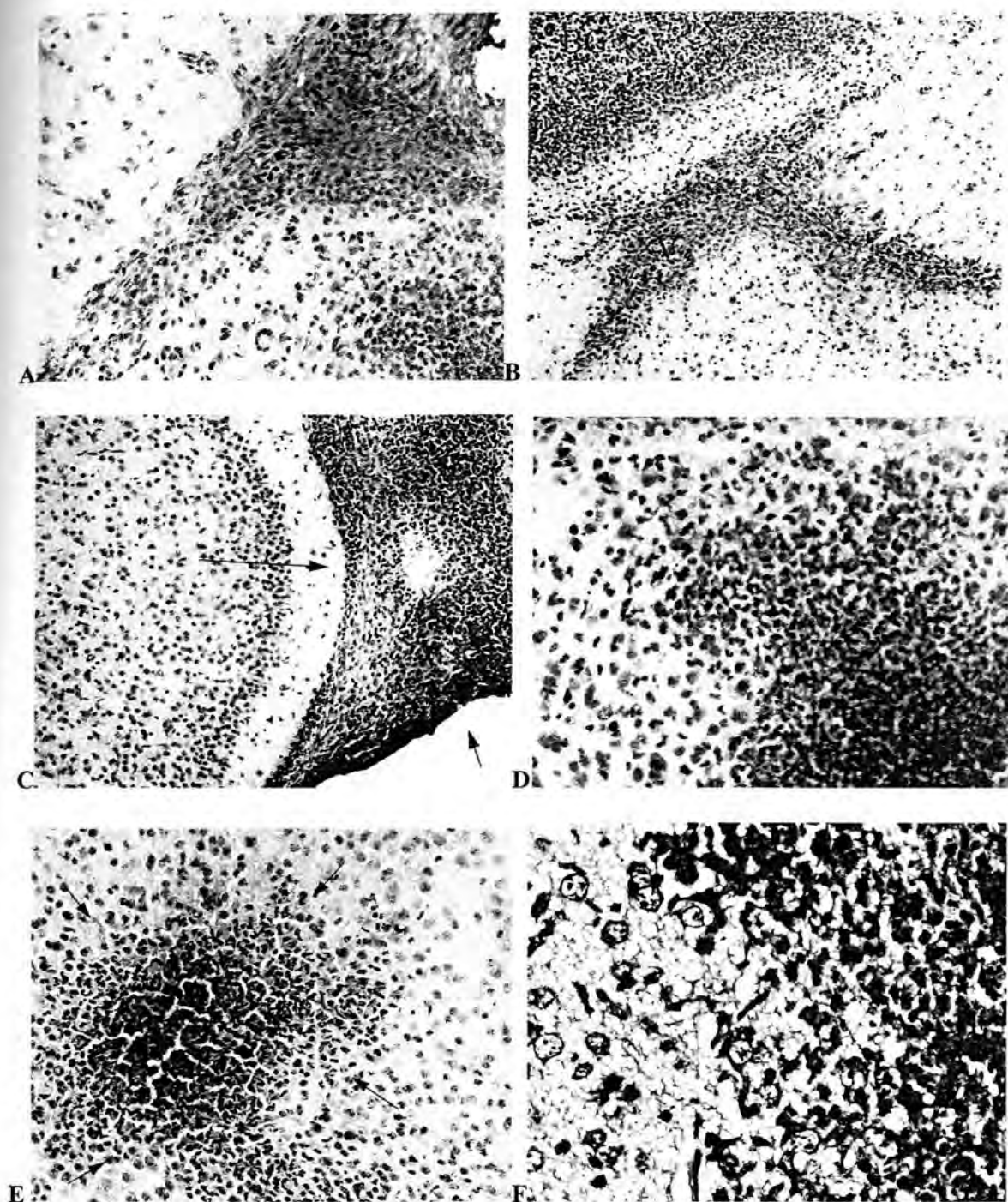
Imunohistokemijska analiza (LCA i Mac1) pokazala je da se upalni tkivni infiltrati sastoje od brojnih makrofaga i granulocita (Slika 8A,B). Daljnja analiza upalnih stanica specifičnim protutijelima pokazala je da se upalni infiltrati sastoje pretežno od makrofaga (Slika 8C), a RB6-

8C5 bojenjem prikazan je i veliki broj neutrofila u upalnim žarištima (Slika 8D). U upalnim se infiltratima specifičnim imunohistokemijskim bojenjima prikazao tek manji broj limfocita T CD8+ (Slika 8E) i CD4+ (Slika 8F).

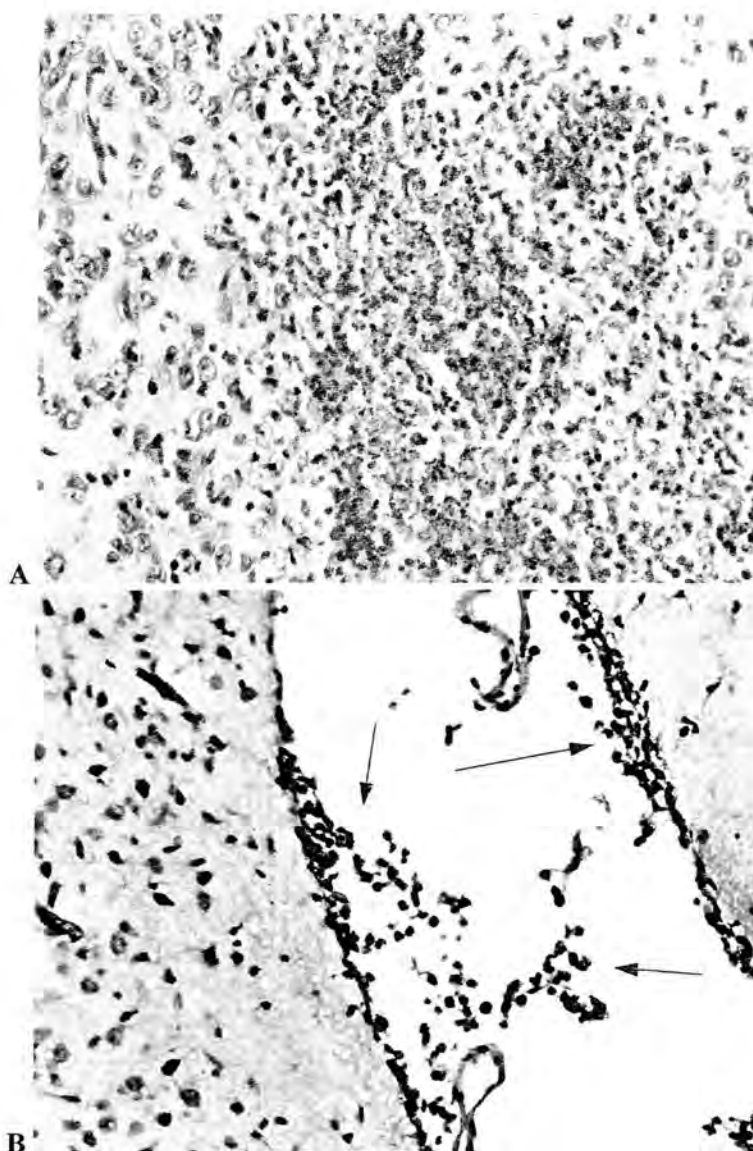


Slika 9. Bakterije u tkivu slezene TNFR1^{-/-} miševa inficiranih *L. monocytogenes* ΔactA. A. Strelice pokazuju plavo obojene bacile u nekrotičnom tkivu (Gram bojenje, povećanje 400×) B. Smeđe obojene nakupine bakterija (antilisterijsko bojenje, povećanje 400×).

Iako su makroskopskim pregledom slezene TNFR1^{-/-} miševa bile bez vidljivih patoloških promjena mikroskopski je nalaz pokazao da je i ovaj organ zahvaćen upalnim procesom. Slezena je prožeta brojnim nekrotičnim žarištima u kojima su se nespecifičnim i specifičnim bakterijskim bojenjem dokazale nakupine listerija (Slika 9A,B). Niti makroskopski niti mikroskopski pregled slezene C57BL/6 miševa nije pokazao prisustvo patoloških promjena niti nalaz bakterija u tkivu. Makroskopske promjene nisu bile uočljive ni u mozgovima inficiranih pokusnih životinja, dok su mikroskopskom patohistološkom pretragom uočene brojne patološke promjene u tkivu mozga i moždanih ovojnica TNFR1^{-/-} miševa. Gotovo sve imunodeficientne životinje, počevši od šestog dana nakon infekcije, imale su slabije ili jače prisutne upalne infiltrate u subarahnoidalnim i ventrikularnim prostorima (Slika 10A-C). U manjeg su dijela životinja, uz meningitis bili prisutni i manji ili veći pojedinačni apscesi u parenhimu, naročito u području produžene moždine i moždanog drška (Slika 10D-F). Protulisterijskim je bojenjem prikazano da se veliki broj listerija nalazi u upalnim žarištima, a osobito subarahnoidalno i u ventrikularnim prostorima (Slika 11A,B).

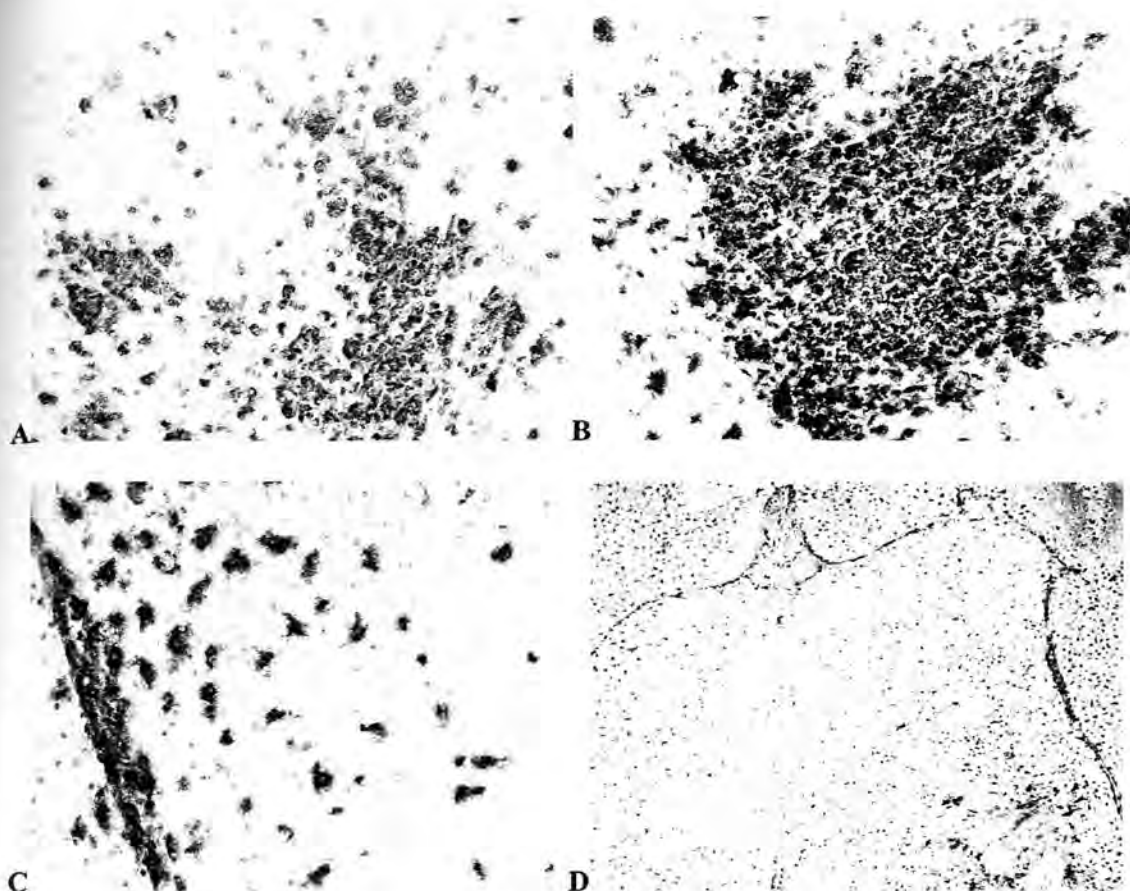


Slika 10. Mikrofotografije tkiva mozga TNFR1^{-/-} miševa inficiranih *L. monocytogenes* $\Delta actA$; 7 d.p.i. (HE bojenje na parafinskim rezovima) A. Meningitis s hemoragijskom nekrozom meningealnih krvnih žila (povećanje 200 \times) B. Meningitis s krvarenjem unutar komora, BG=bazalni ganglij, V=ventrikul (povećanje 200 \times) C. "Hauba meningitis" na površini mozga, lijevo korteks, desno strelice pokazuju upalne infiltrate (povećanje 200 \times) D. Veliki apsces u parenhimu (povećanje 200 \times) E. Strelice pokazuju veliki apsces u korteksu mozga (povećanje 200 \times) F. Infiltrati mononuklearnih leukocita u apscesu (povećanje 400 \times)



Slika 11. Mikrofotografije tkiva mozga TNFR1^{-/-} miševa inficiranih *L. monocytogenes* $\Delta actA$; 7. d.p.i. (protulisterijsko bojenje na parafinskim rezovima, povećanje 200 \times) A. Smeđe obojene bakterije u apscesu B. Nakupine bakterija u ventrikularnom prostoru (protulisterijsko bojenje, povećanje 200 \times)

Tipične patohistološke promjene očitovale su se nalazom meningealnih i perivaskularnih infiltrata, sastavljenim prvenstveno od makrofaga i neutrofila te krvarenja u moždano tkivo (Slika 12A-C). Aktivacija rezidentnih moždanih makrofaga (mikroglije) uzrokovala je difuznu proliferaciju stanica i formaciju nodula. Nekroza neurona bila je praćena infiltratima mikroglije i polimorfonuklearnih leukocita. Na Slici 12D prikazan je rombencefalitis s difuznom aktivacijom mikroglije u parenhimu moždanog drška.



Slika 12. Upalni infiltrati u tkivu mozga TNFR1^{-/-}-miševa inficiranih *L. monocytogenes* $\Delta actA$ prikazani imunohistokemijskim bojenjima. A. Nakupine smeđe obojenih upalnih stanica u apscesu 7.d.p.i. (LCA, povećanje 200 \times) B. Nakupine smeđe obojenih makrofaga u apscesu unutar moždanog drška, 7.d.p.i. (F4/80 bojenje, povećanje 200 \times) C. Smeđe obojeni pojedinačni makrofagi u meningealnim ovojnicama i parenhimu moždanog drška, 7.d.p.i. (F4/80 bojenje, povećanje 400 \times) D. Smeđe obojena mikroglija u moždanom dršku, 10. d.p.i. (F4/80 bojenje, povećanje 200 \times)

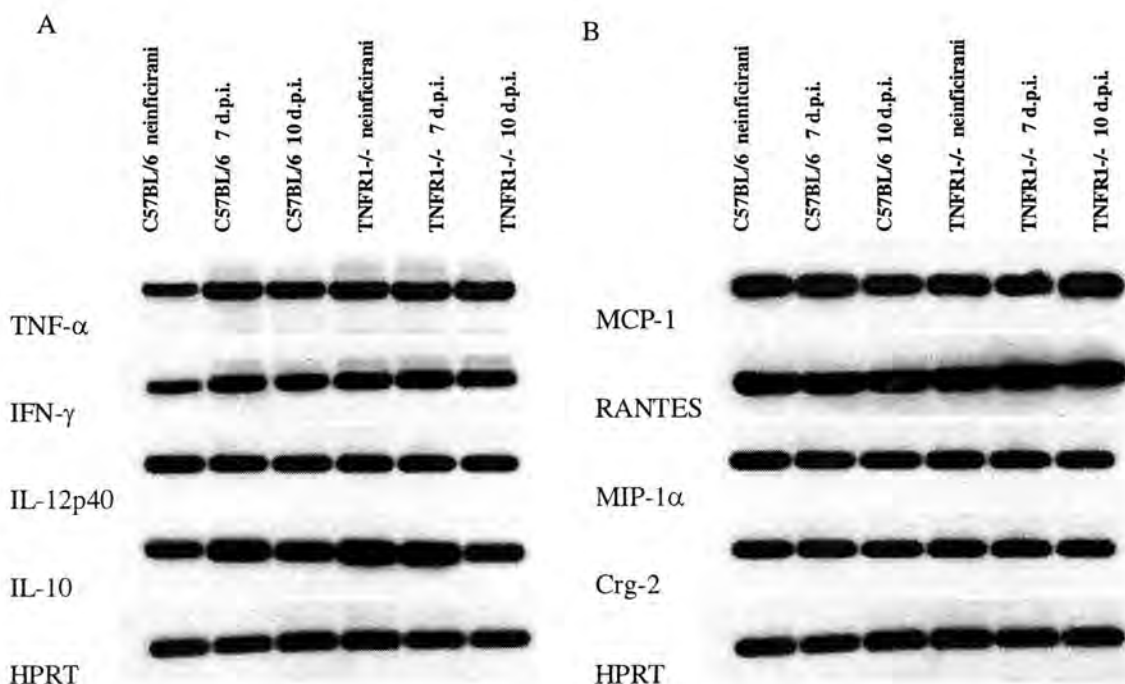
4.4. Izražaj mRNK citokina TNF- α , IFN- γ , IL-12p40 i IL-10; kemokina MCP-1, RANTES, MIP-1 α i Crg-2 te enzima iNOS i IDO u tkivima TNFR1^{-/-} miševa inficiranih *L. monocytogenes* $\Delta actA$

U svrhu određivanja uloge pojedinih upalnih medijatora u nadzoru infekcije ispitan je izražaj mRNK u tkivima TNFR1^{-/-} i kontrolnih C57BL/6 miševa. Budući da su broj bakterija u organima kao i upalni infiltrati u tkivima bili najveći počevši od sedmog dana nakon infekcije analizirani su uzorci jetre, slezene i mozga sedmog i desetog dana nakon infekcije listerijom. RT-PCR metodom određen je izražaj mRNK citokina koji imaju ulogu u usmjeravanju imunološkog

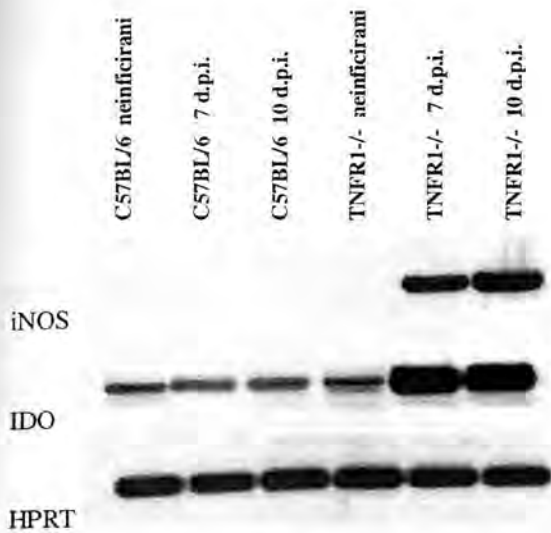
odgovora (Th1/Th2), kemokina te upalnih enzima. Za usporedbu mjerenja uporabljena je mRNK za HPRT.

4.4.1. Izražaj mRNK upalnih medijatora u jetri

Iz Slike 13A uočava se da su u neinficiranih miševa obju skupina svi ispitivani citokini i kemokini fiziološki izraženi. Nakon infekcije, u kontrolnih životinja dolazi do pojačane ekspresije proupalnih TNF- α i IFN- γ , te IL-10 dok se indukcija mRNK IL-12 ne mijenja niti u jednoj skupini. mRNK za IL-10 ima više bazalne vrijednosti u TNFR1-/- miševa, a desetog se dana infekcije njen izražaj smanjuje. Nakon infekcije ne dolazi do promjene u izražaju mRNK ispitivanih kemokina u jetri kontrolnih niti TNFR1-/- miševa (Slika 13B). Infekcija TNFR1-/- miševa rezultira *de novo* sintezom mRNK enzima iNOS u jetri (Slika 14). Razine mRNA zaIDO jednake su u neinficiranih i inficiranih C57BL/6 miševa, ali se nakon infekcije izražaj ovog enzima u jetri TNFR1-/- životinja višestruko povećava (Slika 14).



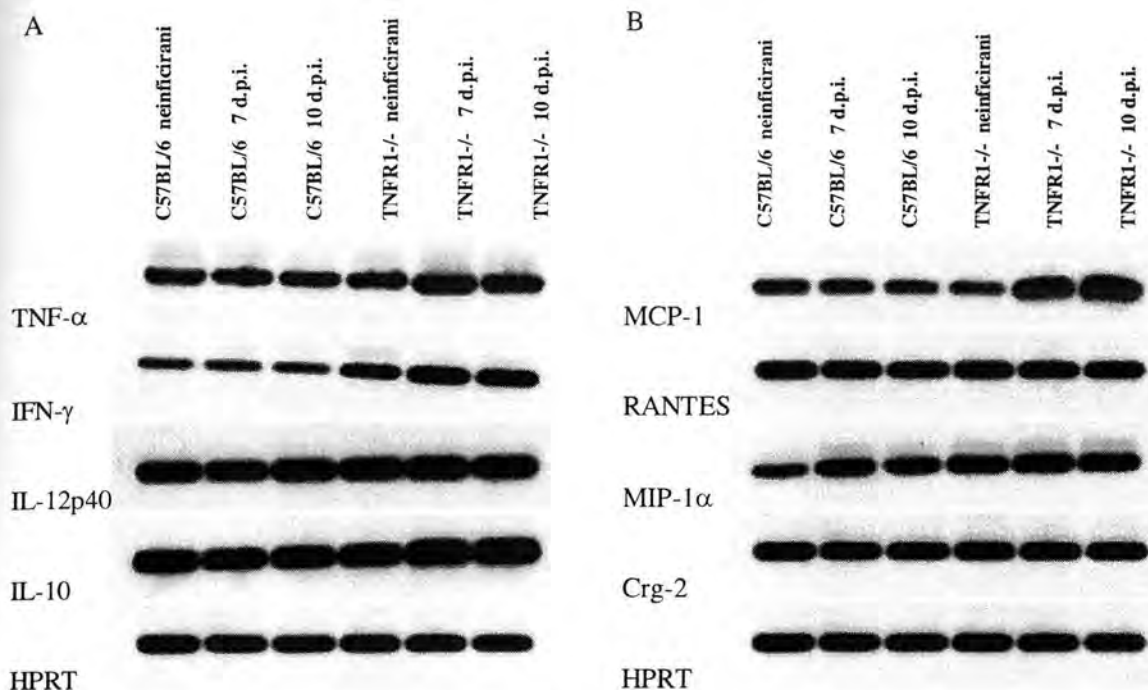
Slika 13. Southern blot analiza izražaja mRNK citokina (A) i kemokina (B) u jetri miševa prije i nakon i.p. infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Izražaj mRNK u određen je za C57BL/6 i TNFR1-/- životinje, a korištena su tri miša po grupi. Vrijednosti su određene prije infekcije, te sedmog i desetog dana nakon infekcije. Izražaj mRNK za HPRT uporabljen je za usporedbu mjerenja.



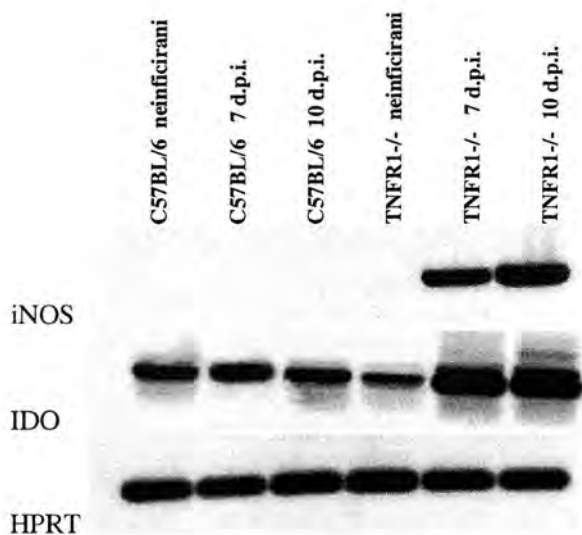
Slika 14. Southern blot analiza izražaja mRNK enzima INOS i IDO u jetri miševa prije i nakon i.p. infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Izražaj mRNK određen je za C57BL/6 i TNFR1^{-/-} životinje, a korištena su tri miša po grupi. Vrijednosti su određene prije infekcije, te sedmog i desetog dana nakon infekcije. Izražaj mRNK za HPRT uporabljen je za usporedbu mjerenja.

4.4.2. Izražaj mRNK upalnih medijatora u slezeni

Svi ispitivani upalni medijatori fiziološki su izraženi u slezeni neinficiranih kontrolnih i KO miševa s izuzetkom iNOS. Nakon infekcije nisu uočene promjene u izražaju citokina u kontrolnih životinja, dok u TNFR1^{-/-} miševa dolazi do izražene indukcije TNF- α , IFN- γ i IL-10 (Slika 15A). Od ispitivanih kemokina izražaj MCP-1 bio je znatno veći u inficiranih imunodeficientnih miševa u odnosu na bazalne vrijednosti, kao i ekspresiju u inficirane kontrolne skupine životinja (Slika 15B). Najveće se promjene mogu uočiti u ekspresiji mRNK enzima iNOS i IDO u KO životinja. iNOS nije izražen u fiziološkim uvjetima u slezeni neinficiranih TNFR1^{-/-} miševa, dok je nakon infekcije ekspresija mRNK upečatljiva. Izražaj mRNK enzima IDO također je višestruko veći u inficiranih TNFR1^{-/-} miševa nego prije infekcije (Slika 16).



Slika 15. Southern blot analiza izražaja mRNA citokina (A) i kemokina (B) u slezeni miševa prije i nakon i.p. infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Izražaj mRNA određen je za C57BL/6 i TNFR1 $^{-/-}$ životinje, a korištena su tri miša po grupi. Vrijednosti su određene prije infekcije, te sedmog i desetog dana nakon infekcije. Izražaj mRNA za HPRT uporabljen je za usporedbu mjerenja.



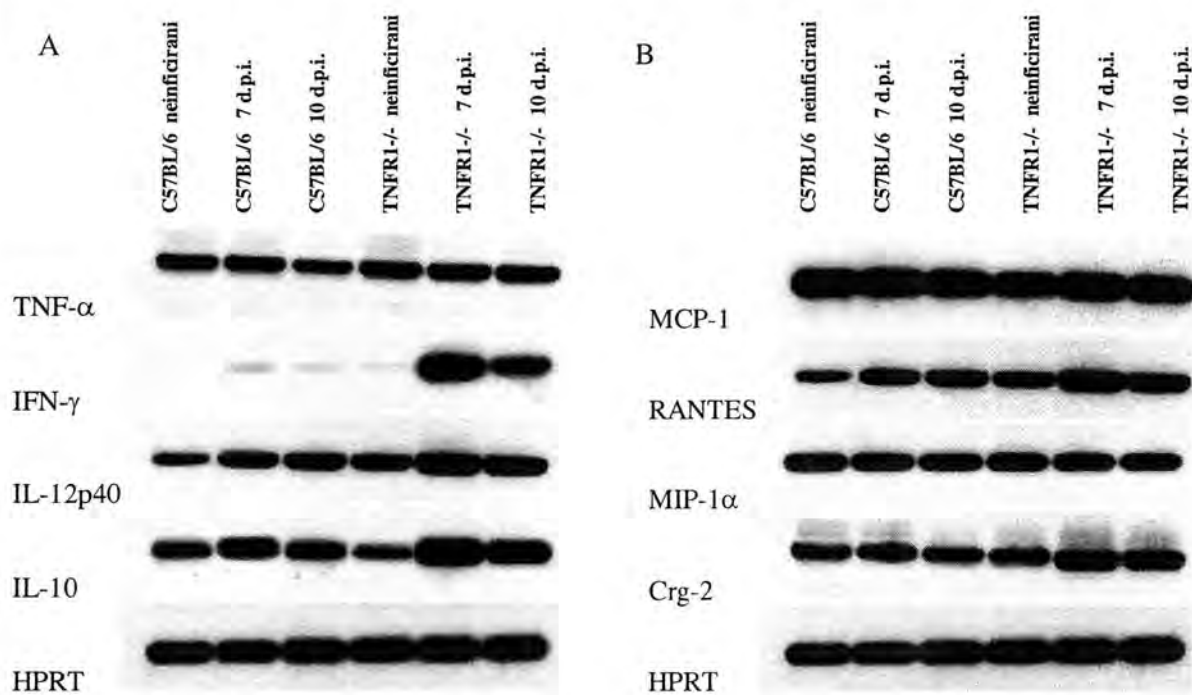
Slika 16. Southern blot analiza izražaja mRNA enzima INOS i IDO u slezeni miševa prije i nakon i.p. infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Izražaj mRNA određen je za C57BL/6 i TNFR1 $^{-/-}$ životinje, a korištena su tri miša po grupi. Vrijednosti su određene prije infekcije, te sedmog i desetog dana nakon infekcije. Izražaj mRNA za HPRT uporabljen je za usporedbu mjerenja.

4.4.3. Izražaj mRNK upalnih medijatora u mozgu

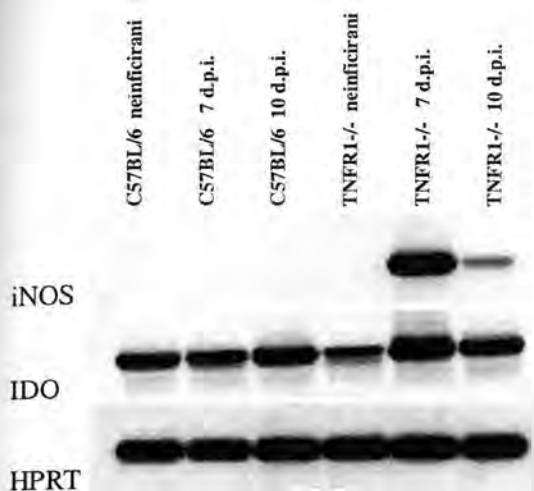
Izuzev enzima iNOS svi su ispitivani upalni medijatori fiziološki izraženi u mozgovima neinficiranih kontrolnih i TNFR1 KO miševa.

U kontrolnih C57BL/6 životinja može se uočiti nešto jači izražaj mRNK za INF- γ i IL-12 nakon infekcije. Uz iznimku citokina TNF- α , mRNK ostalih ispitivanih citokina (INF- γ , IL-12 i IL-10) višestruko su izraženije u inficiranih TNFR1 $^{-/-}$ miševa u odnosu na kontrolni soj (Slika 17A).

U inficiranih TNFR1 $^{-/-}$ životinja uočava se indukcija mRNK kemokina RANTES-a i Crg-2 (Slika 17B), dok je ekspresija mRNK za MCP-1 i MIP-1 α nepromijenjena.



Slika 17. Southern blot analiza izražaja mRNK citokina (A) i kemokina (B) u mozgu miševa prije i nakon i.p. infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Izražaj mRNK određen je za C57BL/6 i TNFR1 $^{-/-}$ životinje, a korištena su tri miša po grupi. Vrijednosti su određene prije infekcije, te sedmog i desetog dana nakon infekcije. Izražaj mRNK za HPRT uporabljen je za usporedbu mjerenja.



Slika 18. Southern blot analiza izražaja mRNK INOS i IDO u mozgu miševa prije i nakon i.p. infekcije *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Izražaj mRNK određen je za C57BL/6 i TNFR1^{-/-} životinje, a korištena su tri miša po grupi. Vrijednosti su određene prije infekcije, te sedmog i desetog dana nakon infekcije. Izražaj mRNK za HPRT uporabljen je za usporedbu mjerenja.

Iz Slike 18 može se uočiti da u fiziološkim uvjetima u moždanom tkivu obiju skupina miševa, nema izražaja mRNK za iNOS. mRNK za IDO u tkivu mozga nešto je slabije izražena u neinficiranih TNFR1^{-/-} miševa u odnosu na C57BL/6 skupinu. Nakon infekcije, u imunokompetentnih C57BL/6 životinja i dalje nije izražena mRNK za iNOS, a ekspresija mRNK za IDO ostaje nepromijenjena. U tkivu mozga imunodeficientnih miševa sedmog dana nakon infekcije dolazi do snažne indukcije mRNK za enzime IDO i iNOS, da bi se desetog dana nakon infekcije ekspresija mRNK ovih enzima smanjivala, što je osobito naglašeno u slučaju enzima iNOS.

5. RASPRAVA

Listerioza je u većini slučajeva oportunistička infekcija u rizičnih skupina kao što su imunokompromitirani i starije osobe, fetusi i novorođenčad. Infekcija imunokompetentnog domaćina obično je bez simptoma bolesti ili se očituje kao kratkotrajni febrilni gastroenteritis, dok se u rizičnih skupina listerioza najčešće očituje kao sustavna bolest praćena visokom stopom mortaliteta. Smatra se da su osnovni razlozi ovakvih razlika u kliničkoj slici listerioze kvantiteta i kvaliteta imunološkog odgovora inficirane osobe. Imunološki sustav ljudske novorođenčadi, jednako kao i novorođenih miševa i brojnih drugih životinjskih vrsta, nema isti stupanj razvijenosti kao kod odraslih jedinki. Ograničena sposobnost indukcije zaštitnog imunološkog odgovora čini novorođenčad osjetljivijima na različite virusne i neke gljivične infekcije (158). Infekcije inkapsuliranim bakterijama kao što su streptokoki grupe B, *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* također su učestalije i teže u novorođenačkom razdoblju (159).

Obzirom da se novorođenče prvi put susreće s brojnim potencijalno patogenim mikroorganizmima i okolišnim antigenima, burna imunološka reakcija bila bi štetna po novorođenče. Prejak odgovor spriječen je relativno malenim brojem stanica koje sudjeluju u upalnom procesu. Istraživanja funkcije neonatalnih limfocita T utvrdila su postojanje nekih prirodnih nedostataka, kao što su manjak zrelih CD4+ stanica, slaba proliferacija u odgovoru na CD3 stimulaciju i slab izražaj površinskih CD40 molekula nakon aktivacije (149,150). Manjkavost staničnog odgovora potvrđena je i *in vivo*, *Pneumocystis carinii* infekcijom u mišje sisančadi (158) u koje do trećeg tjedna starosti nije došlo do infiltracije limfocita T u plućno tkivo, a sisančad nije bila sposobna savladati infekciju prije šestog tjedna života, što je nekoliko tjedana duže u odnosu na odrasle miševe. Izlaganje antigenu tijekom neonatalnog razdoblja često rezultira Th2-dominantnim odgovorom (156,159,160). Istraživanja su pokazala da su neonatalne imunopredočne stanice deficijentne u broju i funkciji, te manje učinkovite u proizvodnji proupalnih medijatora i proliferaciji Th1 limfocita, zbog čega se povećava osjetljivosti mišje sisančadi na infekciju (157). No, nedavno je utvrđeno da su neonatalne DC ipak sposobne potaknuti Th1 odgovor (161). Razlog za skretanje ka Th2 obrascu tijekom protulisterijskog odgovora novorođenčeta, istraživači tumače istovremenom proizvodnjom visokih koncentracija IL-10 od strane limfocita B čime se spriječava optimalno izlučivanje IL-12 od strane DC te posljedično i Th1 polarizacija.

Posljednjih su godina ispitani i djelomično objašnjeni nedostaci/promjene u imunološkom odgovoru koje dovode do predispozicije za razvoj listerioze. Veliki doprinos ovim otkrićima omogućilo je postojanje "knock-out" miševa s izbačenim genima za pojedine čimbenike imunološkog dogovora. Infekcijom deficijentnih životinja potvrđena je važnost stanične imunosti, CD4+ i CD8+ limfocita T (162), IFN- γ (163) i IFN- γ receptora (164), kemokina MCP-1 (165) i IL-8 (166) u protulisterijskoj imunosti. *In vitro* istraživanja na kulturama stanica fetalnog porijekla su pokazala da protulisterijski imunološki odgovor novorođenčeta karakterizira smanjena produkcija proupalnog IFN- γ , te povećana produkcija imunosupresivnog IL-10 u odnosu na odrasle osobe (151,152,153). Ohara i suradnici su pokazali da makrofagi dobiveni od mišje sisančadi nemaju sposobnost ubijanja fagocitirane *L. monocytogenes* (167). Također je ustanovljeno da fetalni periferni mononukleari inficirani listerijom imaju smanjenu sposobnost prepoznavanja i predočavanja antigena te smanjeno luče TNF- α (154,155). Novijim je istraživanjima ustanovljeno da plazma novorođenčeta sadrži adenzin, endogeni purinski metabolit s imunomodulacijskim učinkom koji inhibira produkciju TNF- α u neonatalnim monocitima nakon izlaganja bakterijama, uključujući listeriju (168). *In vitro* aktivacija novorođenačkih monocita različitim mikrobnim agensima rezultira produkcijom IL-6, a visok IL-6/TNF- α omjer u serumima novorođenčadi vjerojatno modulira kako prirodni tako i stečeni neonatalni imunološki odgovor (169).

S ciljem da se ispita patogeneza listerioze i imunološki odgovor u neonatalnom periodu te objasni uloga citokina TNF- α u protulisterijskoj obrani, korišteni su dva dana stari miševi s nedostatkom receptora 1 za TNF- α preko kojega se ostvaruje većina bioloških učinaka ovog citokina. Analizirani su molekularni odnosno stanični mehanizmi zaštitne imunosti u neonatalnom "knock-out" modelu infekcije. Intraperitonealna infekcija se, uz intravensku, pokazala visoko reproducibilnom te je ovaj način aplikacije primijenjen u istraživanju.

Rezultati naših prethodnih pokusa pokazali su da je sisančad TNFR1-/- miševa izuzetno osjetljiva na infekciju virulentnim sojem *L. monocytogenes*, sa 100% -tnim mortalitetom vrlo brzo nakon inokulacije. Stoga je u radu korišten atenuirani soj *L. monocytogenes*, actA deficijentna bakterijska mutanta, koja uzrokuje jednak imunološki odgovor, ali zbog nemogućnosti širenja iz

stanice u stanicu sporije diseminira u tkiva te je smrtnost u pokusnih životinja znatno niža (170). Nakon infekcije analizirano je preživljavanje mišje sisančadi, broj bakterija, patološke promjene i imunološki odgovor, te izražaj mRNA različitih upalnih medijatora u jetri, slezeni i mozgu - organima u kojima se listerija razmnožava. Svi su rezultati, pa tako i tkivni izražaj mRNA odabranih Th1 i Th2 citokina, kemokina i enzima u TNFR1^{-/-} sisančadi, uspoređeni s vrijednostima dobivenim u imunokompetentnih C57BL/6 miševa.

Unatoč tome što su neonatalni miševi povećane osjetljivosti na infekciju listerijom, u našim pokusima C57BL/6 sisančad nije pokazala kliničke znakove oboljenja nakon i.p. infekcije atenuiranom mutantom *L. monocytogenes* Δ actA. Mikrobiološkim pretragama izoliran je tek mali broj bakterija iz jetre trećeg dana nakon infekcije, dok su ostala ispitivana tkiva ostala sterilna, a u tkivima jetre, slezene i mozga nisu uočene patološke promjene. Sterilnost organa u C57BL/6 mišje sisančadi i izostanak patoloških promjena u tkivima u kojima se listerija primarno umnožava nakon prodora iz probavnog sustava, svjedoči o dostatnom imunološkom odgovoru i nadzoru nad infekcijom u imunokompetentne sisančadi. Naša je pretpostavka da brz i korektan imunološki odgovor, za koji je neophodna prisutnost TNF- α , odnosno njegovog receptora 1, ograničava širenje bakterija već tijekom početnog prodora bakterija u jetru te dovodi do sterilizacije organa neposredno nakon inicijalne infekcije. Izražaj mRNA za većinu ispitivanih upalnih medijatora u C57BL/6 sisančadi ostao je na bazalnoj razini, izuzev laganog povećanja vrijednosti TNF- α i IFN- γ u jetri, te mRNA za IFN- γ i IL-12 u mozgu. Za spomenute je citokine poznato da imaju ključnu ulogu u protulisterijskoj obrani u *in vitro* i *in vivo* modelima infekcije (101,171). Dobro kontrolirani urođeni imunološki odgovor ograničio je širenje bakterije. Izostanak upalnih žarišta i sukladno tome vrlo mali broj infiltriranih makrofaga u ispitivanim organima rezultirali su nedostatkom signala mRNA za iNOS u ispitivanim tkivima. Iz istog razloga u imunokompetentne sisančadi nije došlo niti do indukcije mRNA zaIDO, te se ne mogu uočiti nikakve razlike u odnosu na fiziološku ekspresiju mRNA za ovaj enzim.

Izostanak patoloških promjena i upalnih infiltrata u tkivu jetre, slezene i mozga u C57BL/6 miševa u skladu je sa slabom indukcijom kemoatraktanata poput RANTES, MCP-1, MIP-1 α i Crg-

2 na lokalnoj razini. Dodatno, u imunokompetentne sisančadi uočili smo lagano povećanje ekspresije mRNA za IL-10 u tkivu jetre i mozga, što je mogući razlog izostanka daljnje aktivacije upalnih stanica. Naime, poznato je da je IL-10 citokin Th2 obrasca sa snažnim protuupalnim učinkom koji sprječava makrofagnu produkciju proupalnih citokina, antagonizira proupalne učinke IFN- γ i IL-12 te sprječava daljnju aktivaciju Th1 staničnog odgovora. Zaštitna uloga IL-10 u protulisterijskom odgovoru istaknuta je i u rezultatima Deckert i sur. koji su pokazali da IL-10 sprječava imunološki uvjetovane patološke promjene u tkivu mozga tijekom listerijskog meningoencefalitisa (117). Da IL-10 može posredovati oštećenju tkiva, dokazano je u animalnom modelu autoimunih bolesti, u kojem IL-10 deficijentni miševi razvijaju teški kronični enterokolitis (172). Međutim, povećana produkcija IL-10 u mišje sisančadi se smatra i jednim od glavnih razloga njihove osjetljivosti na infekciju listerijom (153). Rezultati istraživanja na transgeničnim životinjama s nedostatkom gena za IL-10 pokazuju da su IL-10 KO miševi rezistentniji na primarnu i sekundarnu infekciju listerijom u odnosu na kontrolu (115).

Iako je imunološki odgovor mišje sisančadi nešto slabijeg intenziteta uz nedovoljno jasnu definiciju Th1/Th2 polarizacije stanica, u našim je pokusima C57BL/6 sisančad uspješno kontrolirala i savladala infekciju bakterijom smanjenjene virulencije. Dobiveni rezultati u skladu su s navodima da novorođenčad zapravo nije imunološki nedostatna već se radi o slabijem intenzitetu imunološkog odgovora u odnosu na odrasle jedinke, čiji krajnji rezultat u stvari ovisi o vrsti i količini antigena, te načinu infekcije/imunizacije (173,174,175).

Za razliku od C57BL/6 miševa, kod kojih se atenuirana listerijska mutanta $\Delta actA$ pokazala gotovo avirulentnom, infekcija imunone dostatne TNFR1 $^{-/-}$ sisančadi malim dozama ove bakterije rezultira teškom sustavnom bolešću s fatalnim ishodom. Patohistološkom pretragom tkiva jetre otkriven je veliki broj bakterija unutar nekrotičnih apscesa, sačinjenih uglavnom od makrofaga i neutrofila, s iznenađujuće malim brojem CD4 $^{+}$ i CD8 $^{+}$ limfocita. Kako neonatalni i diferencirani hepatociti skladište veće zalihe glikogena, PAS bojenjem smo prikazali bogate nakupine glikogena u jetri kontrolnih C57BL/6 i neinficiranih TNFR1 $^{-/-}$ miševa, dok je nedostatak glikogena u jetri inficirane imunone dostatne sisančadi dokaz težine metaboličkog poremećaja jetre tijekom neonatalne listerioze. Unatoč aktivacije mehanizama prirođenog imunološkog odgovora

(makrofagi, neutrofili) na razini jetre i slezene, TNFR1 deficijentni miševi ne uspijevaju kontrolirati infekciju. Upalne lezije u jetri TNFR1^{-/-} miševa navode na zaključak da oštećenje tkiva posredovano neutrofilima i makrofagima nastaje i u nedostatku proupalnog TNF- α , odnosno signalizacije preko TNFR1. S druge strane, TNF- α ima ključnu ulogu u aktivaciji limfocita. Naime, listerioza je karakterizirana stvaranjem upalnih granuloma u kasnijoj fazi infekcije usljed aktivacije stanicama T posredovane imunosti, a u TNFR1^{-/-} miševa izostalo je stvaranje organiziranih granuloma u tkivima. Slične je rezultate, tj. dezintegraciju granuloma u tkivima TNFR1^{-/-} miševa, praćenu letalnim ishodom, pokazala grupa istraživača na modelu infekcije bakterijom *Mycobacterium avium* koja je kao i *L. monocytogenes* unutarstanični patogen (94).

Da bi ispitali ulogu pojedinih upalnih medijatora u regulaciji nespecifičnog i specifičnog staničnog odgovora tijekom infekcije, odredili smo profil izražaja mRNK u različitim tkivima. Citokinski obrazac detektiran u tkivu jetre inficiranih imunoneдостatnih miševa - potpuni izostanak indukcije IFN- γ i IL-12 te snažna indukcija IL-10, pripada Th2 citokinskom odgovoru koji nije zaštićen u listeriozi. I u ostalim tkivima prevladava indukcija mRNK protuupalnog IL-10 citokina u odnosu na proupalne citokine Th1 obrasca. Upravo visoke bazalne vrijednosti IL-10 te njegova snažna indukcija nakon infekcije mogle bi biti dodatnim razlogom izostanka veće infiltracije limfocita T u upalna žarišta u TNFR1^{-/-} miševa. Uz IL-10 i snažna indukcija mRNK enzimaIDO u tkivu jetre i slezene doprinosi izostanku T limfocitnih infiltrata. Zadnjih desetak godina postalo je jasno da IDO ima ključnu ulogu u kontroli upalnog odgovora budući da njegova produkcija modulira staničnu imunost (176,177), potiskujući lokalni odgovor limfocita T (141). Otprije je poznato da je IDO, kao konstitutivan ili inducibilan enzim, eksprimiran unutar stanica placente, pluća, crijeva, slezene, jetre i mozga. Nakon stimulacije IFN- γ njegova je produkcija utvrđena i u DC, monocitima, makrofagima, epitelnim stanicama, fibroblastima i endotelu (178). Uz makrofage, IDO pozitivne DC čine glavne sastavnice granuloma u antilisterijskom odgovoru (72). Dok Popov i sur. navode da je IDO indukcija ovisna o TNF- α (72), rezultati naše studije to ne potvrđuju, već su u skladu s rezultatima onih autora koji tvrde da TNF- α nema značajniju ulogu u indukciji IDO (178), jer i pored nedostatka TNF receptora 1 dolazi do snažne indukcije mRNK za ovaj enzim. U

našem je istraživanju nakon infekcije u TNFR1^{-/-} miševa došlo do indukcijeIDO, ali su fiziološke razine ovog enzima niže u odnosu na kontrolni soj C57BL/6. Iako izražaj mRNK zaIDO nije uvjetovan prisutnošću TNFR1, niže razine enzima u KO životinja mogle bi biti odgovorne za izostanak baktericidnog učinka makrofaga i nesmetanog razmnožavanja bakterija unutar njih.

Nekroza i destrukcija uočena u tkivima TNFR1^{-/-} miševa vjerojatno je posljedica infiltracije velikog broja fagocitnih stanica, produkcije dušikovih oksida i drugih toksičnih oksidirajućih spojeva. Nakon infekcije, u tkivima imunodeficientnih miševa, zabilježena je snažna *de novo* sinteza iNOS, enzima koji sudjeluje u stvaranju NO koji je toksičan ne samo za mikroorganizme već i za eukariotske stanice.

U posljednje se vrijeme sve više istražuje uloga kemokina kao specifičnih leukocitnih aktivatora i kemoatraktanata koji sudjeluju u kontroli migracije upalnih stanica tijekom infektivnog procesa. Mehanizmi kojim unutarstanični patogeni potiču mobilizaciju monocita na mjesto infekcije slabo su poznati. Dokazano je da limfociti izloženi *Mycobacterium tuberculosis* otpuštaju MCP-1, CC kemokin s kemotaktičnim učinkom na monocite i limfocite (179). U adultnih miševa inficiranih gljivom *Cryptococcus neoformans* također je pokazano da je MCP-1 kritičan regulator privlačenja pomoćničkih CD4⁺ limfocita u tkivo (180). Značaj CC kemokina u kontroli infekcije bakterijom *L. monocytogenes* ustanovili smo u našim prethodnim istraživanjima na *in vivo* modelu listerioze u odraslih miševa (128). Uočili smo značajno povećanje koncentracije kemokina MIP-1 α i MCP-1 u jetri i slezeni inficiranih imunokompetentnih miševa te potvrdili pretpostavku da se tijekom infekcije razine kemokina znatno više povećavaju na lokalnoj razini u usporedbi s vrijednostima u krvi. Za razliku od spomenutog, nedostatak MIP-1 α u tkivu jetre TNFR1^{-/-} životinja vjerojatno je posljedica malog broja infiltriranih limfocita koji su odgovorni za produkciju ovog kemokina. I u moždanom tkivu TNFR1^{-/-} sisančadi izostala je indukcija mRNK za MIP-1 α , iako je prisutna snažna aktivacija mikroglije, stanica za koje je utvrđeno da izlučuju ovaj kemokin. S druge strane, mRNK ovog kemokina bila je pojačano izražena u slezeni inficiranih C57BL/6 miševa, što upućuje na zaključak da je izražaj MIP-1 α ovisan o signalizaciji putem TNFR1.

Povećana ekspresija mRNK za MCP-1 u slezeni imunoneosustatne miše sisančadi uočena je sedmog i desetog dana infekcije, neovisno o prisustvu TNFR1. U isto vrijeme, također smo uočili pojačanu indukciju mRNK za RANTES u moždanom tkivu inficiranih C57BL/6 i TNFR1 deficijenti životinja. Za razliku od neonatalnog modela, u adultnih miševa u ranoj fazi eksperimentalne listerioze nismo uočili statistički značajno povećanje koncentracijskog gradijenta za RANTES. Pretpostavljamo da je razlog slaba infiltracija leukocita, dominantnih produktora ovog kemokina, u imološki privilegirano tkivo mozga. Obzirom da su TNFR1 deficijenti miševi na infekciju *L. monocytogenes* odgovorili pojačanom ekspresijom mRNK za MCP1 i RANTES, očito je da njihova produkcija nije isključivo ovisna o TNF- α , odnosno signalizaciji putem TNF receptora 1.

Nakon infekcije u TNFR1 KO sisančadi, zapažena je i indukcija mRNK za Crg-1/IP-10 u tkivu mozga. Crg-2 je kemokin s kemotaktičnim učinkom na limfocite T i monocite. Luče ga astrociti i mikroglia mozga, nakon *in vitro* stimulacije LPS-om, IFN- γ i/ili TNF- α (124,181). Ovi *in vitro* nalazi u skladu su s našim rezultatima *in vivo*, obzirom da smo istovremeno s Crg-2, u mozgu TNFR1-/- sisančadi zabilježili i snažnu indukciju mRNK za IFN- γ . Dobiveni rezultati pokazuju da osim za MCP-1 i RANTES, signalizacija preko TNF receptora 1 nije neophodna niti za indukciju kemokina Crg-2/IP-10.

Pretpostavljamo da je u TNFR1-/- sisančadi, izostanak indukcije mRNK proupalnih citokina IFN- γ i IL-12, TNF- α i CC kemokina MIP-1 α i RANTES u primarnim ciljnim organima kao što su jetra i slezena, doveo do neadekvatne rezolucije infekcije u ovim organima, što je omogućilo umnožavanje i daljnji rasap bakterija do tkiva mozga. Jednom kada listerija prođe do ovog imunološki zaštićenog organa, na sličan način kao što je to opisano u kolonizaciji placente (182), dolazi do nekontroliranog razmnožavanja bakterije i teških oštećenja tkiva sa smrtonosnim posljedicama. Patohistološke promjene u mozgovima TNFR1-/- sisančadi sedam dana nakon infekcije varirale su od meningitisa do rombencefalitisa, a u nekih su životinja pronađeni i konfluirajući intraparenhimalni apscesi s krvarenjem u moždanom tkivu i moždanim komorama. Aktivacija rezidentnih makrofaga mozga uzrokovala je difuznu proliferaciju stanica uz formaciju

brojnih mikroglijalnih nakupina, a nekroza neurona bila je praćena infiltratima mikroglije i rijetkih polimorfonuklearnih leukocita. Iz mozгова inficiranih miševa izolirane su bakterije čiji se broj postupno povećavao dosegnući vrijednosti od $4 \log_{10}$. Ukupan broj bakterija u tkivu mozga jednak je broju bakterija u jetri i slezeni što pokazuje izrazit afinitet listerije za prodor i umnožavanje u mozgu mišje sisančadi. Visok broj i perzistencija bakterija u SŽS sve do letalnog ishoda, posljedica je neadekvatnog imunološkog odgovora. Iako je imunološki odgovor u tkivu mozga, sudeći po indukciji mRNK upalnih medijatora, snažnoj aktivaciji mikroglije i upalnim infiltratima bio prisutan, vjerojatno nije dobro usmjeren. Moguće je da protulisterijska funkcija endogenih glijalnih stanica kao rezultat kompetitivnih proupalnih i protuupalnih medijatora nije bila dovoljna za iščišćavanje bakterija iz likvora i moždanog tkiva. Jednom kada su aktivirane, rezidentne stanice mozga - mikroglija, astrociti i endotelne stanice mogu postati APC, producirati citokine, kemokine, dušikove okside, te postaju sposobne za fagocitozu. Mikroglija, predočavajući antigene stimulira proliferaciju limfocita T i sekreciju citokina, koji onda povratno podstiču ove neprofesionalne fagocite na fagocitozu i efikasnije ubijanje mikroorganizama (183).

Budući da $\text{TNF-}\alpha$ ima ulogu kao dodatni aktivator makrofaga, nedostatak nadzora nad infekcijom u $\text{TNFR1-}/-$ sisančadi mogao bi se objasniti i poremećajem u fagocitozi bakterijskih stanica. Međutim, u prilog zrelosti neonatalnih makrofaga u $\text{TNFR1-}/-$ miševa govore imunohistokemijskim tehnikama detektirani brojni makrofagi s fenotipskim markerima kao što su Mac-1, F4/80 i MHC II. Za detaljniji uvid u mehanizme fagocitoze trebalo bi napraviti daljnje studije unutarstanične prerade i predočavanja antigena listerije od strane makrofaga i DC. U ovoj je studiji uočena i naglašena infiltracija neutrofila u kasnijem tijeku infekcije, kao i snažna produkcija enzima iNOS iIDO koji su znak aktivacije makrofaga. Sedmi dan nakon infekcije u tkivu mozga dolazi do snažne indukcije enzima iNOS koji sudjeluje u proizvodnji NO, no deseti dan infekcije mRNA za iNOS je bila gotovo ispod razine detekcije. Ovo se zapažanje može objasniti nedostatkom $\text{TNF-}\alpha$ ali i snažnoj indukciji IL-10 koji ima inhibitoran učinak na iNOS. NO je citotoksičan i u visokim koncentracijama može uzrokovati degeneraciju neurona, a u imunološkim stanicama pretvara se u peroksinitrite koji su visoko toksični za mikroorganizme (184). Paradoksalna supresija iNOS uočena je isključivo u mozgu, dok se je u jetri i slezeni njegova

indukcija povećavala s napredovanjem infekcije. Iako neki istraživači navode da se iNOS i IDO uzajamno kontroliraju te da produkti učinka jednog enzima inhibiraju lučenje drugog (185,186), iz naših se rezultata ne bi moglo isto zaključiti, budući da je istovremeno uočena indukcija oba enzima u svim ispitivanim tkivima.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji u skladu su s radovima drugih autora koji su pokazali povećanu osjetljivost miševa bez TNFR1 gena na različite patogene. Nakon sustavne infekcije bakterijom *Klebsiella pneumoniae* ovi miševi imaju visok mortalitet i poremećenu produkciju citokina (93). Infekcija unutarstaničnim parazitom *Trypanosoma cruzi* karakterizirana je višom parazitemijom i stopom smrtnosti u odnosu na kontrolnu skupinu miševa (187). TNFR1^{-/-}-miševi inficirani unutarstaničnom bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* pokazuju značajno kraće preživljavanje, veći titar bakterija te izraženu nekrozu tkiva (188). Međutim, dok je u modelu infekcije *M. tuberculosis* u imunodeficientnih životinja uočena odgođena produkcija reaktivnih dušikovih spojeva i iNOS-a u našem je modelu infekcije vidljivo da dolazi do snažne indukcije mRNA za iNOS što znači da produkcija NO nije pod izravnim utjecajem TNF- α odnosno da je regulirana o TNFR1 receptoru neovisnim putevima.

Iako je prethodnim pokusima na adultnim miševima s nedostatkom receptora 1 za TNF- α dokazana izuzetna važnost ovog citokina, odnosno njegovog receptora u nadzoru infekcije *L. monocytogenes* mehanizmi nadzora tek su djelomično poznati (100,189). Poznato je da TNF- α uz IFN- γ može dodatno aktivirati makrofage i stimulirati fagocitozu sudjelujući tako u mehanizmima prirodene imunosti. Uz to TNF/TNFR obitelj regulira aktivaciju limfocita T i koordinira međusobnu komunikaciju stanica koja omogućuje limfocitima da maksimalno odgovore na patogen što im daje ulogu i u stečenom imunološkom odgovoru (190). Parenteralna inokulacija listerije u imunološki normalnih, odraslih miševa rezultira sustavnom infekcijom ali nema uvijek za posljedicu prodor bakterija u mozak te se razvoj meningoencefalitisa može uočiti u kasnijoj fazi infekcije samo u manjem broju pokusnih životinja (31). U našoj su studiji, već sedam dana nakon infekcije mozgovi sve inficirane TNFR1^{-/-} sisanačadi zahvaćeni patološkim promjenama u većoj ili manjoj mjeri. Ova, ali i druge studije upućuju na to da bi TNFR1 imao značajnu ulogu u zaštiti

moždanog tkiva od patoloških lezija nastalih kao posljedica različitih uzroka. TNF- α štiti neurone stimulirajući antioksidativne puteve. Bruce i suradnici u svom istraživanju navode da je oštećenje neurona uzrokovano žarišnom cerebralnom ishemijom i epileptičkim napadima pogoršano u TNFR1-/- miševa, što ukazuje na neuroprotektivnu ulogu TNF- α (191). Rezultati novijih istraživanja sugeriraju da bi TNF- α , uz poznatu proupalnu ulogu, mogao djelovati i kao protuupalni medijator koji sprječava imunološka oštećenja tkiva (95,97,111).

Značajna uloga TNF- α u kontroli humane listerioze ustanovljena je višom incidencijom ove infekcije u bolesnika pod terapijom TNF- α inhibitorima. Sve se češće susrećemo s pojavom sustavne listerioze u bolesnika kojima su u terapiji reumatoidnog artritisa i Crohnove bolesti primijenjeni antagonisti TNF- α kao što su infliximab ili etanercept (84,85,192). Iako je poznato da usljed mutacije receptora TNFR1 u ljudi može doći do pojave autoimunog sindroma TRAPS (od engl. TNF-receptor-associated periodic syndrome), nasljedne bolesti karakterizirane ponovljenim napadima povišene tjelesne temperature, nije istraženo da li je u ovih osoba veća učestalost listerioze i drugih infekcija unutarstaničnim mikroorganizmima (193).

Naši su rezultati u skladu s dosadašnjim saznanjima o TNFR1 receptoru kao dominantnom efektoru u biološkoj sposobnosti citokina TNF- α da inducira apoptozu, nekrozu tkiva i nespecifičnu imunost. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji doprinose razumijevanju imunopatofiziološkog odgovora na ovu infekciju, posebice razjašnjavajući važnu ulogu TNF- α u zaštitnoj imunosti kod infekcije *L. monocytogenes*, te ulogu stanica specifične imunosti. Pokazali smo da je TNFR1 esencijalan za kontrolu listerioze u neonatalnih miševa.

6. ZAKLJUČCI

1. Brz i korektan imunološki odgovor u C57BL/6 mišje sisančadi ograničio je širenje *L. monocytogenes* $\Delta actA$ već tijekom njenog početnog prodora u jetru te doveo do sterilizacije organa neposredno nakon inicijalne infekcije.
2. Izostanak patoloških promjena i upalnih infiltrata u tkivu jetre, slezene i mozga u inficiranih C57BL/6 miševa u skladu je sa slabo izraženom indukcijom kemoatraktanata poput RANTES, MCP-1, MIP-1 α i Crg-2 na lokalnoj razini.
3. U C57BL/6 sisančadi došlo je do laganog povećanja ekspresije mRNK proupalnih citokina za koje je poznato da imaju ključnu ulogu u protulisterijskoj obrani (TNF- α i IFN- γ u jetri, te mRNK za IFN- γ i IL-12 u mozgu), dok je istovremena indukcija mRNK za IL-10 u tkivu jetre i mozga vjerojatno spriječila daljnju aktivaciju upalnih stanica.
4. U inficirane TNFR1-/- sisančadi dolazi do brze kolonizacije i nekontroliranog umnožavanja bakterija u različitim tkivima, a miševi ugibaju unutar dva tjedna s kliničkom slikom teškog hepatitisa, splenitisa i meningoencefalitisa te apscesa mozga. Povećana osjetljivost TNFR1 deficitarnih miševa na infekciju unutarstaničnim patogenom, kao što je listerija, ukazuje na ključnu ulogu TNF- α odnosno njegovog TNFR1 receptora u nespecifičnoj imunosti.
5. Izostanak stvaranja granuloma, a prisustvo dezintegriranih lezija s nekrotičnim infiltratima miješane celularnosti u tkivima inficiranih TNFR1-/- miševa ukazuju na značaj TNFR1 u aktivaciji i mobilizaciji stanica specifične imunosti u inficirano područje.
6. Signalizacija putem TNFR1 nije neophodna za indukciju proizvodnje kemokina MCP-1, RANTES i Crg-2 ali je njihova regulacija u pojedinim tkivima poremećena u odsutnosti ovog receptora.

7. Izostanak izražaja mRNK za MIP-1 α u tkivima inficiranih TNFR1 $^{-/-}$ miševa ukazuje na to da je za produkciju ovog kemokina neophodna prisutnost TNF- α , odnosno TNFR1 signalizacija.

8. Iako izražaj mRNK zaIDO nije uvjetovan prisutnošću TNFR1 receptora, niže fiziološke razine ovog enzima u TNFR1 $^{-/-}$ životinja mogle bi biti odgovorne za slabiji baktericidni učinak makrofaga i preživljavanje fagocitiranih bakterija.

9. U tkivu jetre i slezene TNFR1 KO životinja dolazi do *de novo* sinteze te snažnog izražaja mRNK za iNOS tijekom infekcije, dok je u tkivu mozga uočeno potiskivanje izražaja ove mRNK u kasnijoj fazi infekcije. Izostanak mRNK za iNOS može se objasniti inhibicijskim učinkom imunosuprimirajućeg IL-10 na produkciju iNOS u ovom imunološki privilegiranom organu.

10. Rezultati naših pokusa ukazuju na to da je za kvalitetan protulisterijski odgovor u novorođenačkom razdoblju neophodna prisutnost TNF- α odnosno njegovog receptora 1. Pretjerane imunopatološke promjene u tkivima inficiranih imunodeficientnih životinja ukazuju na kompleksnu proupalnu i imunoregulatornu ulogu ovog receptora u kasnijoj fazi listerioze.

7. LITERATURA

1. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Pathol Bacteriol* 1926;29:407-39.
2. Burn CG. Clinical and pathological features of an infection caused by a new pathogen of the genus *Listerella*. *Am J Pathol* 1936;12:341-8.
3. Roberts AJ, Wiedmann M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:904-18.
4. Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA i sur. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 1983;308:203-6.
5. Hamon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* 2006;6:423-34.
6. Nishikawa S, Miura T, Sasaki S, Nakane A. The protective role of endogenous cytokines in host resistance against an intragastric infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;16:291-8.
7. Cousens LP, Wing EJ. Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunol Rev* 2000;174:150-9.
8. McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol* 2004;92:15-33.
9. Gillespie IA, McLauchlin J, Grant KA i sur. Changing pattern of human listeriosis, England and Wales, 2001-2004. *Emerg Infect Dis* 2006;12: 1361-6.
10. Thevenot D, Dernburg A, Vernozy-Rozand C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J Appl Microbiol* 2006;101:7-17.
11. CFSAN/Office of Food Additive Safety. FDA Approval of *Listeria*-specific Bacteriophage Preparation on Ready-to-Eat (RTE) Meat and Poultry Products: U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C., 2006. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/>.
12. Uhtil S, Jakšić S, Petrak T, Medić H, Gumhalter-Karolyi L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. *Food Control* 2004;15:213-6.
13. Kozačinski L, Hadžiosmanović M. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in home-made dairy products. *Tierarztl Umsch* 2001;56:590-4.
14. Kozačinski L, Hadžiosmanović M, Zdolec N. Microbial quality of poultry meat on the Croatian market. *Vet arhiv* 2006;76:305-13.
15. Husu JR. Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 1990; 37:276-82.
16. Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:169-83.
17. Hof H. *Listeria monocytogenes*: a causative agent of gastroenteritis? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:369-73.
18. Munk ME, Kaufmann SH. *Listeria monocytogenes* reactive T lymphocytes in healthy individuals. *Microb Pathog* 1988; 5:49-54.
19. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 Sites, United States, 2004. *MMWR* 2005;54:352-6.
20. de Valk H, Jacquet C, Goulet V i sur. Surveillance of listeria infections in Europe. *Euro Surveill* 2005;10:251-5.
21. Koch J, Stark K. Significant increase of listeriosis in Germany-epidemiological patterns 2001-2005. *Euro Surveill* 2006;11:85-8.
22. Hardy J, Francis KP, DeBoer M, Chu P, Gibbs K, Contag CH. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science* 2004;303:851-3.

23. Karunasagar I, Senghaas B, Krohne G, Goebel W. Ultrastructural study of *Listeria monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. *Infect Immun* 1994;62:3554-8.
24. Corr S, Hill C, Gahan CG. An in vitro cell-culture model demonstrates internalin- and hemolysin-independent translocation of *Listeria monocytogenes* across M cells. *Microb Pathog* 2006;41:241-50.
25. Pron B, Boumaila C, Jaubert F i sur. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol* 2001;3:331-40.
26. Niedergang F, Didierlaurent A, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. Dendritic cells: the host Achilles's heel for mucosal pathogens? *Trends Microbiol* 2004;12:79-88.
27. Dalton CB, Austin CC, Sobel J i sur. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med* 1997;336:100-5.
28. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D i sur. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* 2000;342:1236-41.
29. Schlech WFIII, Schlech WFIV, Haldane H i sur. Does sporadic *Listeria* gastroenteritis exist? A 2-year population-based survey in Nova Scotia, Canada. *Clin Infect Dis* 2005;41:778-84.
30. Schuchat A. Listeriosis and pregnancy: food for thought. *Obstet Gynecol Surv* 1997;52:721-2.
31. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P i sur. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:584-640.
32. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis* 2002;185:S18-24.
33. Bakardjiev AI, Theriot JA, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. *PLoS Pathog* 2006;2:e66.
34. Ross DS, Jones JL, Lynch MF. Toxoplasmosis, Cytomegalovirus, Listeriosis, and Preconception Care. *Matern Child Health J* 2006;10:189-93.
35. Pejaver RK, Watson AH, Mucklow ES. Neonatal cross-infection with *Listeria monocytogenes*. *J Infect* 1993;26:301-3.
36. Colodner R, Sakran W, Miron D, Teitler N, Khavalevsky E, Kopelowitz J. *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery. *Am J Infect Control* 2003;31:322-4.
37. Heath PT, Nik Yusoff NK, Baker CJ. Neonatal meningitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:173-8.
38. Pattarino G, Arrigoni S, Grazioli R, De Palma A, di Natale B. A case of *Listeria monocytogenes* meningitis in an immunocompetent infant. *Minerva Pediatr* 2006;58:391-4.
39. Gray MJ, Freitag NE, Boor KJ. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infect Immun* 2006;74:2505-12.
40. Vazquez-Boland JA, Dominguez-Bernal G, Gonzalez-Zorn B, Kreft J, Goebel W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect* 2001;3:571-84.
41. Jaradat ZW, Wampler JW, Bhunia AW. A *Listeria* adhesion protein-deficient *Listeria monocytogenes* strain shows reduced adhesion primarily to intestinal cell lines. *Med Microbiol Immunol* 2003;192:85-91.
42. Dramsi S, Bourdichon F, Cabanes D, Lecuit M, Fsihi H, Cossart P. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* 2004;53:639-49.
43. Chakraborty T, Leimeister-Wachter M, Domann E i sur. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* 1992;174:568-74.
44. Kim H, Boor KJ, Marquis H. *Listeria monocytogenes* sigmaB contributes to invasion of human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2004;72:7374-8.
45. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996;84:923-32.

46. Lecuit M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:430-6.
47. Braun L, Ghebrehwet B, Cossart P. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 2000;19:1458-66.
48. Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 2003;13:23-31.
49. Wheeler PR, Ratledge C. Phospholipase activity of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected armadillo tissue. *Infect Immun* 1991;59:2781-9.
50. Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 1995;63:4231-7.
51. Domann E, Wehland J, Rohde M i sur. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 1992;11:1981-90.
52. Gouin E, Gantelet H, Egile C i sur. A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci* 1999;112:1697-708.
53. Unanue ER. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev* 1997;158:11-25.
54. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005;54:1182-93.
55. Way SS, Kollmann TR, Hajjar AM, Wilson CB. Cutting edge: protective cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 2003;171:533-7.
56. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-95.
57. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A i sur. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
58. Flo TH, Halaas O, Lien E i sur. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* 2000;164:2064-9.
59. Torres D, Barrier M, Bihl F i sur. Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 2004;72:2131-9.
60. Edelson BT, Unanue ER. MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity. *J Immunol* 2002;169:3869-75.
61. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 1997;186:1757-62.
62. Morris JGJr, Potter M. Emergence of New Pathogens as a Function of Changes in Host Susceptibility. *Emerg Infect Dis* 1997;3:433-41.
63. Rakhmilevich AL. Neutrophils are essential for resolution of primary and secondary infection with *Listeria monocytogenes*. *J Leukoc Biol* 1995;57:827-31.
64. Tam MA, Wick MJ. Dendritic cells and immunity to *Listeria*: TipDCs are a new recruit. *Trends Immunol* 2004;25:335-9.
65. Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S i sur. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 1999;10:29-38.
66. Bancroft GJ, Sheehan KC, Schreiber RD, Unanue ER. Tumor necrosis factor is involved in the T cell-independent pathway of macrophage activation in scid mice. *J Immunol* 1989;143:127-30.
67. Dunn PL, North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun* 1991;59:2892-900.
68. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.

69. Kolb-Maurer A, Gentschev I, Fries HW i sur. *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect Immun* 2000;68:3680-8.
70. Neuenhahn M, Kerksiek KM, Nauwerth M i sur. CD8alpha+ dendritic cells are required for efficient entry of *Listeria monocytogenes* into the spleen. *Immunity* 2006;25:619-30.
71. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 2003;19:59-70.
72. Popov A, Abdullah Z, Wickenhauser C i sur. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J Clin Invest* 2006;116:3160-70.
73. Chan CW, Crafton E, Fan HN i sur. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006;2:207-13.
74. Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 2004;10:812-23.
75. Edelson BT, Unanue ER. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity* 2001;14:503-12.
76. Manohar M, Baumann DO, Bos NA, Cebra JJ. Gut colonization of mice with actA-negative mutant of *Listeria monocytogenes* can stimulate a humoral mucosal immune response. *Infect Immun* 2001;69:3542-9.
77. McGregor DD, Koster FT, Mackaness GB. The short lived small lymphocyte as a mediator of cellular immunity. *Nature* 1970;228:855-6.
78. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:253-7.
79. Sundquist M, Johansson C, Wick MJ. Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity in vivo. *APMIS* 2003;111:715-24.
80. Kaufmann SH. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993;11:129-63.
81. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*. New York and London: Garland Science, 2001.
82. San Mateo LR, Chua MM, Weiss SR, Shen H. Perforin-mediated CTL cytotoxicity counteracts direct cell-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2002;169:5202-8.
83. White DW, Badovinac VP, Kollias G, Harty JT. Cutting edge: antilisterial activity of CD8+ T cells derived from TNF-deficient and TNF/perforin double-deficient mice. *J Immunol* 2000;165:5-9.
84. Slifman NR, Gershon SK, Lee JH, Edwards ET, Braun MM. *Listeria monocytogenes* infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum* 2003;48:319-24.
85. Bowie VL, Snella KA, Gopalachar AS, Bharadwaj P. *Listeria* meningitis associated with infliximab. *Ann Pharmacother* 2004;38:58-61.
86. McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol* 2001;47:619-35.
87. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45-65.
88. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005;115:1-20.
89. Sheng WS, Hu S, Ni HT, Rowen TN, Lokensgard JR, Peterson PK. TNF-alpha-induced chemokine production and apoptosis in human neural precursor cells. *J Leukoc Biol* 2005;78:1233-41.
90. Deckert Schluter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, Schluter D. Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol* 1998;160:3427-36.
91. Kanaly ST, Nashleanas M, Hondowicz B, Scott P. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens. *J Immunol* 1999;163:3883-9.

92. Allendoerfer R, Deepe GS Jr. Regulation of infection with *Histoplasma capsulatum* by TNFR1 and -2. *J Immunol* 2000;165:2657-64.
93. Moore TA, Perry ML, Getsoian AG, Monteleon CL, Cogen AL, Standiford TJ. Increased mortality and dysregulated cytokine production in tumor necrosis factor receptor 1-deficient mice following systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect Immun* 2003;71:4891-900.
94. Ehlers S, Kutsch S, Ehlers EM, Benini J, Pfeffer K. Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55^{-/-} mice is dependent on T cells and IL-12. *J Immunol* 2000;165:483-92.
95. Zganiacz A, Santosuosso M, Wang J i sur. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest* 2004;113:401-13.
96. Goncalves NS, Ghaem-Maghani M, Monteleone G i sur. Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of luminal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. *Infect Immun* 2001;69:6651-9.
97. Virna S, Deckert M, Lutjen S i sur. TNF is important for pathogen control and limits brain damage in murine cerebral listeriosis. *J Immunol* 2006;177:3972-82.
98. Havell EA. Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *J Immunol* 1987;139:4225-31.
99. Nakane A, Minagawa T, Kato K. Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 1988;56:2563-9.
100. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM i sur. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993;73:457-67.
101. Buchmeier NA, Schreiber RD. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7404-8.
102. Thale C, Kiderlen AF. Sources of interferon-gamma (IFN-gamma) in early immune response to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* 2005;210:673-83.
103. Bancroft GJ. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr. Opin. Immunol.* 1993;5: 503-10.
104. Berg RE, Crossley E, Murray S, Forman J. Relative contributions of NK and CD8 T cells to IFN-gamma mediated innate immune protection against *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2005;175:1751-7.
105. Suzue K, Asai T, Takeuchi T, Koyasu S. In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur J Immunol* 2003;33:2666-75.
106. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 1995;148:5-18.
107. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:133-46.
108. Cooper AM, Khader SA. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol* 2007;28:33-8.
109. Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol* 2002;168:1322-7.
110. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G i sur. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 2006;203:1805-15.
111. Zakharova M, Ziegler HK. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 2005;175:5024-33.
112. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;349:108-17.

113. Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem Soc Trans* 2000;28:212-5.
114. Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Kim CE. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chem Immunol Allergy* 2005;88:64-79.
115. Dai WJ, Kohler G, Brombacher F. Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10 deficient mice. *J Immunol* 1997;158:2259-67.
116. Pasche B, Kalaydjiev S, Franz TJ i sur. Sex-Dependent Susceptibility to *Listeria monocytogenes* Infection Is Mediated by Differential Interleukin-10 Production. *Infect Immun* 2005;73:5952-60.
117. Deckert M, Soltek S, Geginat G i sur. Endogenous interleukin-10 is required for prevention of a hyperinflammatory intracerebral immune response in *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. *Infect Immun* 2001;69:4561-71.
118. Rasley A, Tranguch SL, Rati DM, Marriott I. Murine glia express the immunosuppressive cytokine, interleukin-10, following exposure to *Borrelia burgdorferi* or *Neisseria meningitidis*. *Glia* 2006;53:583-92.
119. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004;25:75-84.
120. Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukocyte Biol* 1997; 61:246-57.
121. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 2002;168:3195-204.
122. Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol* 1996;157:4511-20.
123. Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *Eur J Immunol* 1999;29:203-14.
124. Vanguri P, Farber JM. IFN and virus-inducible expression of an immediate early gene, crg-2/IP-10, and a delayed gene, I-A alpha in astrocytes and microglia. *J Immunol* 1994;152:1411-8.
125. Olszewski MA, Huffnagle GB, McDonald RA i sur. The role of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 in regulation of T-cell-mediated immunity to *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol* 2000;165:6429-36.
126. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001;2:102-7.
127. Hokeness KL, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol* 2005;174:1549-56.
128. Bubonja M, Wraber B, Brumini G, Gobin I, Veljkovic D, Abram M. Systemic and local CC chemokines production in a murine model of *Listeria monocytogenes* infection. *Mediators Inflamm* 2006;2006:54202.
129. Kielian T. Immunopathogenesis of brain abscess. *J Neuroinflammation* 2004;1:16.
130. Kielian T. Microglia and chemokines in infectious diseases of the nervous system: views and reviews. *Front Biosci* 2004;9:732-50.
131. Danforth JM, Strieter RM, Kunkel SL, Arenberg DA, VanOtteren GM, Standiford TJ. Macrophage inflammatory protein-1 expression in vivo and in vitro: the role of lipoteichoic acid. *Clin. Immunol. Immunopathol* 1995;74:77-83.
132. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:455-81.
133. Huffnagle GB, Traynor TR, McDonald RA i sur. Leukocyte recruitment during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Immunopharmacology* 2000;48:231-6.

134. Domachowske JB, Binvill CA, Gao JL, Murphy PM, Easton AJ, Rosenberg HF. The chemokine macrophage-inflammatory protein-1 α and its receptor CCR1 control pulmonary inflammation and antiviral host defense in paramyxovirus infection. *J. Immunol* 2000;165:2677-82.
135. Haeberle HA, Kuziel WA, Dietrich HJ, Casola A, Gatalica Z, Garofalo RP. Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: role of MIP-1 α in lung pathology. *J Virol* 2001;2:878-90.
136. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-28.
137. Flesch IEA, Barsig J, Kaufmann SH. Differential chemokines response of murine macrophages stimulated with cytokines and infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunol* 1998;10:757-65.
138. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 1991;11:2516-22.
139. Pantoja LG, Miller RD, Ramirez JA, Molestina RE, Summersgill JT. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Infect Immun* 2000;68:6478-81.
140. Munn DH, Zhou M, Attwood JT i sur. Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* 1998;281:1191 - 3.
141. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000;164:3596-9.
142. Hibbs JBJr. Infection and nitric oxide. *J Infect Dis* 2002;185:9-17.
143. Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997;352:1311-5.
144. Heneka MT, Feinstein DL. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol* 2001;114:8-18.
145. Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:469-87.
146. Luo D, Schowengerdt KO, Stegner JJ, May WS, Koenig JM. Decreased functional caspase-3 expression in umbilical cord blood neutrophils is linked to delayed apoptosis. *Pediatr Res* 2003;53:859-64.
147. Koenig JM, Stegner JJ, Schmeck AC, Saxonhouse MA, Kenigsberg LE. Neonatal neutrophils with prolonged survival exhibit enhanced inflammatory and cytotoxic responsiveness. *Pediatr Res* 2005;57:424-9.
148. Petrova A, Mehta R. Dysfunction of innate immunity and associated pathology in neonates. *Indian J Pediatr* 2007;74:185-91.
149. Adkins B, Ghanei A, Hamilton K. Up-regulation of murine neonatal T helper cell responses by accessory cell factors. *J Immunol* 1994;153:3378-85.
150. Durandy A, De Saint Basile G, Lisowska-Grospierre B i sur. Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol* 1995;154:1560-8.
151. Lewis DB, Larsen A, Wilson CB. Reduced interferon-gamma mRNA levels in human neonates. Evidence for an intrinsic T cell deficiency independent of other genes involved in T cell activation. *J Exp Med* 1986;163:1018-23.
152. Kelly JP, G.J. B. Administration of interleukin-10 abolishes innate resistance to *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol* 1996;26:356-64.
153. Genovese F, Mancuso G, Cuzzola M i sur. Role of IL-10 in a neonatal mouse listeriosis model. *J Immunol* 1999;163:2777-82.
154. Serushago B, Issekutz AC, Lee SH, Rajaraman K, Bortolussi R. Deficient tumor necrosis factor secretion by cord blood mononuclear cells upon in vitro stimulation with *Listeria monocytogenes*. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16:381-7.
155. Chheda S, Palkowetz KH, Garofalo R, Rassin DK, Goldman AS. Decreased interleukin-10 production by neonatal monocytes and T cells: relationship to decreased production and expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptors. *Pediatr Res* 1996;40:475-83.

156. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol* 2002;128:118-23.
157. Dakic A, Shao QX, D'Amico A i sur. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol*. 2004;172:1018-27.
158. Garvy BA, Harmsen AG. Susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection: host responses of neonatal mice from immune or naive mothers and of immune or naive adults. *Infect Immun* 1996;64:3987-92.
159. Marodi L. Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infect Immun* 2006;74:1999-2006.
160. Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol* 2006;118:137-44.
161. Sun CM, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* 2005;22:467-77.
162. Kaufmann SH, Ladel CH. Role of T cell subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Immunobiology* 1994;191:509-19.
163. Harty JT, White D. A knockout approach to understanding CD8+ cell effector mechanisms in adaptive immunity to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* 1999;201:196-204.
164. Haring JS, Badovinac VP, Olson MR, Varga SM, Harty JT. In vivo generation of pathogen-specific Th1 cells in the absence of the IFN-gamma receptor. *J Immunol* 2005;175:3117-22.
165. Gu L, Rutledge B, Fiorillo J i sur. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leukoc Biol* 1997;62:577-80.
166. Czuprynski CJ, Brown JF, Steinberg H, Carroll D. Mice lacking the murine interleukin-8 receptor homologue demonstrate paradoxical responses to acute and chronic experimental infection with *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog* 1998;24:17-23.
167. Ohara R, Mitsuyama M, Miyata M, Nomoto K. Ontogeny of macrophage-mediated protection against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1985;48:763-8.
168. Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, Roy RM, Desai A, Wessels MR. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. *J Immunol* 2006;177:1956-66.
169. Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M i sur. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo. *Pediatr Res* 2006;60:205-9.
170. Goossens PL, Milon G. Induction of protective CD8+ T lymphocytes by an attenuated *Listeria monocytogenes* actA mutant. *Int Immunol* 1992;4:1413-8.
171. Harty JT, Bevan MJ. Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma. *Immunity* 1995;3:109-17.
172. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.
173. Fadel SA, Ozaki DA, Sarzotti M. Enhanced type 1 immunity after secondary viral challenge in mice primed as neonates. *J Immunol* 2002;169:3293-300.
174. Ito S, Ishii KJ, Gursel M, Shirotra H, Ihata A, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides enhance neonatal resistance to *Listeria* infection. *J Immunol* 2005;174:777-82.
175. Hofstettera HH, Kovalovskya A, Shivea CL, Lehmann PV, Forsthuber TG. Neonatal induction of myelin-specific Th1/Th17 immunity does not result in experimental autoimmune encephalomyelitis and can protect against the disease in adulthood. *J Neuroimmunol* 2007;doi:10.1016/j.jneuroim.2007.04.001.
176. Mellor AL, Baban B, Chandler P i sur. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 2003;171:1652-5.
177. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Rev Immunol* 2004;10:762-74.
178. Mackler AM, Barber EM, Takikawa O, Pollard JW. Indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated by IFN-gamma in the mouse placenta during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2003;170:823-30.

179. Ferrero E, Biswas P, Vettoretto K i sur. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on $\gamma\delta$ cells. *Immunology* 2003;108:356-74.
180. Huffnagle GB, Strieter RM, Standiford RA i sur. The role of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 1995;155:4790-7.
181. Hua LL, Lee SC. Distinct patterns of stimulus-inducible chemokine mRNA accumulation in human fetal astrocytes and microglia. *Glia* 2000;30:74-81.
182. Abram M, Schluter D, Vuckovic D, Wraber B, Doric M, Deckert M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35:177-82.
183. Xiao BG, Link H. Immune regulation within the central nervous system. *J Neurol Sci* 1998;157:1-12.
184. Licinio J, Prolo P, McCann SM, Wong ML. Brain iNOS: current understanding and clinical implications. *Mol Med Today* 1999;5:225-32.
185. Thomas SR, Stocker R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep* 1999;4:199-220.
186. Thomas SR, Stocker R. Antioxidant activities and redox regulation of interferon- γ -induced tryptophan metabolism in human monocytes and macrophages. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:541-52.
187. Castanos-Velez E, Maerlan S, Osorio LM i sur. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:2960-8.
188. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J i sur. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995;2:561-72.
189. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H i sur. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1993;364:798-802.
190. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
191. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS i sur. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996;2:788-94.
192. Schett G, Herak P, Graninger W, Smolen JS, Aringer M. *Listeria*-associated arthritis in a patient undergoing Etanercept therapy: case report and review of the literature. *J Clin Microb* 2005;43:2537-41.
193. Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O'Shea JJ, Kastner DL. TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Immunol* 2000;12:479-86.

POPIS KRATICA

actA	aktin A (od engl. actin A)
APC	antigen predočna stanica (od engl. antigen presenting cell)
ATCC	Američka zbirka bioloških kultura (od engl. American Type Culture Collection)
CD	stanična diferencijacija (od engl. cluster of differentiation)
CDC	Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (od engl. Center for Disease Control and Prevention)
cDNK	komplementarna DNK (od engl. complementary)
CFU	broj bakterijskih kolonija (od engl. colony forming units)
C57BL/6	soj pokusnih miševa, H-2b haplotip
Crg-2/IP-10	od engl. cytokine responsive gene/IFN- γ -inducible protein
DAB	diaminobenzidin (od engl. diaminobenzidine)
DC	dendritičke stanice (od engl. dendritic cells)
DIG	digoksin
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
FDA	Uprava za hranu i lijekove (od engl. Food and Drug Administration)
GALT	limfatično tkivo sluznice probavnog sustava (od engl. gut associated lymphoid tissue)
HE	hematoksin i eozin
HGF	čimbenik rasta hepatocita (od engl. hepatocyte growth factor)
HPRT	hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaza (od engl. hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)
i.p.	intraperitonealan
IDO	indolamin 2,3-dioksigenaza (od engl. indoleamine 2,3-dioxygenase)
IFN- γ	gama interferon (od engl. interferon gamma)
IK-DC	ubilačke DC koje izlučuju interferon (od engl. interferon-producing killer DC)
IL	interleukin
InIA	internalin A
InIB	internalin B
iNOS	inducibilna dušikova sintetaza (od engl. inducible NO synthase)
IQR	interkvartilni raspon (od engl. interquartile range)
KO	oznaka za izbačeni gen (od engl. knock out)
LAP	listerijski protein za adheziju (od engl. <i>Listeria</i> adhesion protein)
LIPI-1	genetički lokus <i>L. monocytogenes</i> odgovoran za izražaj činitelja virulencije (od engl. <i>Listeria</i> pathogenicity island)
LLO	listeriolizin O
LPS	lipopolisharid
MCP-1	monocitni kemotaktički protein (od engl. monocyte chemotactic protein)
MHC	glavni sustav gena tkivne snošljivosti u miša (od engl. major histocompatibility complex)
MIP-1 α	od engl. macrophage inflammatory protein
mRNK	glasnička RNK (od engl. messenger)
NK	prirodenoubilačke stanice (od engl. natural killer)
NO	dušikov oksid (od engl. nitric oxide)
PAS	perjodna kiselina Schiff-ova otopina (od engl. periodic acid Schiff)
PBS	fosfatni pufer (od engl. phosphate buffered saline)
PC-PLC	fosfatidil-kolin PLC (od engl. phosphatidylcholin PLC)
PCR	lančana reakcija polimerazom (od engl. polymerase chain reaction)
PI-PLC	fosfatidil-inozitol PLC (od engl. phosphatidylinositol PLC)
PLC	fosfolipaza C (od engl. phospholipase C)
PrfA	aktivator izražaja gena virulencije A (od engl. positive regulatory factor A)

PRR	receptori prirodene imunosti (od engl. pattern-recognition receptors)
RANTES	od engl. regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
RNK	ribonukleinska kiselina
RT-PCR	reakcija povratnog prijepisa (od engl. reverse-transcription PCR)
SŽS	središnji živčani sustav
TGF- β	čimbenik transformacije rasta β (od engl. transforming growth factor)
TIP-DC	DC koje izlučuju TNF- α i iNOS (od engl. tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase producing DC)
TLR	receptori prirodene imunosti (od engl. toll-like receptors)
TNF- α	čimbenik nekroze tumora (od engl. tumour necrosis factor)
TNFR1 ^{-/-} KO	životinje s izbačenim genom za TNFR1
TRAPS	od engl. TNF-receptor-associated periodic syndrome
Treg	regulacijski limfociti T

ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME

Marina Bubonja

DATUM I MJESTO ROĐENJA

10. listopada 1970. Knin, Republika Hrvatska

ZAPOSLENJE

Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet (MF) Sveučilište u Rijeci

ŠKOLOVANJE

1977-1985 Osnovna škola Knin

1985-1989 Srednjoškolsko obrazovanje, Zdravstveni obrazovni centar, Split

1989-1996 Studij medicine na MF-u, Sveučilište u Rijeci

1997-1998 Obvezatni pripravnički staž za doktore medicine, KBC Rijeka

2000- Položen državni ispit

2000-2002 Poslijediplomski znanstveni magistarski studij "Biomedicina" na MF-u, Sveučilište u Rijeci

2002-2006 Specijalizacija iz Medicinske mikrobiologije s parazitologijom

2004. Obranjen magisterij iz područja Biomedicine i zdravstva

2004-2006 Poslijediplomski stručni studij Medicinske mikrobiologije s parazitologijom, MF, Sveučilište u Zagrebu

2005. Znanstveno usavršavanje na Institutu za neuropatologiju, Univerzitetska klinika Keln, Njemačka

2006. Položen specijalistički ispit pri Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske

AKADEMSKI STUPNJEVI

1996. Doktor medicine, MF Sveučilište u Rijeci

2004. Magistar znanosti, MF Sveučilište u Rijeci

ZNANSTVENI STUPNJEVI

Od 2000. znanstveni novak na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju MF, Sveučilište u Rijeci

ČLANSTVA U STRUKOVNIM UDRUŽENJIMA

Hrvatska liječnička komora (od 2000.)

Hrvatski liječnički zbor (od 2000.)

Hrvatsko mikrobiološko društvo, FEMS (Federation of European Microbiological Societies) (od 2000)

Hrvatsko društvo za medicinsku mikrobiologiju (od 2003.)

NAGRADE I PRIZNANJA

2004. Nagrada za najbolji poster na 4. hrvatskom kongresu o infektivnim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska, 2-6.10. 2004.

2005. Stipendija FEMS Research Fellowship

A. NASTAVNA DJELATNOST

Od 2000. god. aktivno sudjelovanje u izvođenju različitih oblika nastave iz kolegija koji se održavaju na Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju MF u Rijeci za studije medicine, stomatologije i diplomirane sanitarne inženjere, kao i za stručne studije medicinsko laboratorijska dijagnostika i sestринство

B. STRUČNA DJELATNOST

Od 08.09.2006. Specijalist Medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Od 2000. god. sudjelujem u rutinskom stručnom radu bakteriološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju, MF u Rijeci, za potrebe Klinike za ortopediju Lovran.

C. ZNANSTVENA DJELATNOST

1. Izvorni znanstveni radovi

1. Bedenić B, Topić M, Budimir A, Bubonja M. Urinary bactericidal activity of oral antibiotics against common urinary tract pathogens in ex vivo model. *Chemotherapy*. 2006; 52(6): 293-7 (CC).

2. Bubonja M, Wraber B, Brumini G, Gobin I, Veljković D, Abram M. Systemic and Local CC Chemokines Production in a Murine Model of *Listeria monocytogenes* Infection. *Mediators Inflamm*. 2006; (3):54202 (CC).

3. Vučković D, Abram M, Bubonja M, Wraber B, Dorić M. Host resistance to primary and secondary *Campylobacter jejuni* infections in C57BL/6 mice. *Microb Pathog*. 2006; 40(1):35-9 (CC).

2. Pregledni rad

1. Bubonja M, Vučković D, Rubeša-Mihaljević R, Abram M. Činitelji bakterije i domaćina u patogenezi listerioze. *Medicina*. 2007; 43(1):15-20.

3. Znanstvena kongresna priopćenja (sažeci u CC časopisu)

1. Bubonja M, Abram M, Stenzel W, Rubesa-Mihaljevic R, Deckert M. Patohistological changes in the liver and brain of neonatal TNFR1 knock out mice during *Listeria monocytogenes* infection. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 58(3): 218.

2. Bubonja M, Abram M, Stenzel W, Rubeša-Mihaljević R, Deckert M. Indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA expression in different tissues of neonatal mouse during *Listeria monocytogenes* infection. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 57(6): 457.

3. Bedenić B, Tonkić M, Goić-Barišić I, Mihaljević Lj, Bubonja M, Šuto S, Punda V, Kalenić S, Bošnjak Z. Results from Meropenem Yearly Susceptibility testing Information (MYSTIC) Programme: Reports from two Croatian hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12, Suppl 4: R1936.

4. Bedenić B, Bubonja M, Šuto S, Budimir A, Plečko V, Jarža-Davila N. Metallo-beta-lactamase production and susceptibility to antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11, Suppl. 2: 103.

4. Sudjelovanje na domaćim i međunarodnim skupovima

1. Bačić G, Marušić S, Bubonja M, Rubeša-Mihaljević R. Dynamics of the *Listeria monocytogenes* infection monitored by phospholipids fatty acids in the liver of BALB/c mice. 3 rd. International Croatian student summit, Zagreb, Hrvatska, 29.03.-01.04.2007.

2. Abram M, Vučković D, Bubonja M, Dorić M. Immunohistopathological study of *Listeria monocytogenes* infection in pregnant mice. 1st Central European Forum for Microbiology (CEFORM). Keszthely, Mađarska, 26-28.10.2005. (*pozvano predavanje*)

3. Tepšić T, Krajcar I, Bubonja M. Dissemination of *Listeria monocytogenes*. 1st International CROatian Student Summit for biomedical students and young scientists. Zagreb, Hrvatska, 17-20.03.2005.

4. Bubonja M, Wraber B, Brumini G, Abram M. Local versus systemic chemokine concentrations in mice infected intragastrically with *Listeria monocytogenes*. 3. hrvatski mikrobiološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem Poreč, Hrvatska, 4-7.10.2004.
5. Bubonja M, Wraber B, Brumini G, Abram M. Chemokine concentrations in mice infected intragastrically with *Listeria monocytogenes*. 4th Croatian Congress on Infectious Diseases with international participation. Opatija, Hrvatska, 2-6.10.2004.
6. Bubonja M, Wraber B, Brumini G, Dorić M, Abram M. Changes in the liver of BALB/c mice challenged intragastrically with *Listeria monocytogenes*. FEMS Symposium: The Versatility of *Listeria* Species. Izmir, Turska, 10-11.10.2002.
7. Bubonja M, Dorić M, Abram M. Growth of *Listeria monocytogenes* in different organs of BALB/c mice after intragastric infection. Croatian, Hungarian and Slovenian Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology: Power of Microbes in Industry and Environment. Opatija, Hrvatska, 7-9.06.2002.
8. Bubonja M, Dorić M, Abram M. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection following intragastric inoculation in mice. Croatian and Slovenian Symposium on Microbiology and Infections Diseases "Zoonoses today and tomorrow". Plitvička jezera, Hrvatska, 21-23.06.2001.