Antimikrobni peptidi u bronhoalveolnom ispirku djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom respiratornim sincicijskim virusom

Roglić, Srđan

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:122672

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Srđan Roglić

Antimikrobni peptidi u bronhoalveolnom ispirku djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom respiratornim sincicijskim virusom

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Klinici za infektivne bolesti „Dr Fran Mihaljević“ u Zagrebu, Kliničkom bolničkom centru „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu i Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada: Izv. prof. dr. sc. Goran Tešović, dr. med
Dr. sc. Krešo Bendelja, znanstveni savjetnik

Zahvaljujem mentorima izv. prof. dr. sc. Goranu Tešoviću i dr. sc. Kreši Bendelji na dragocjenoj pomoći pri izradi ovog rada. Zahvaljujem prof. dr. sc. Tomislavu Baudoinu i Milani Zlatić Glogoški na pomoći u prikupljanju uzoraka, a prof. dr. sc. Vladimiru Trkulji na pomoći oko statističke obrade. Svojoj obitelji zahvaljujem na ljubavi i podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA 1
1.1. RESPIRATORNI SINCICIJSKI VIRUS 1
1.1.1. GRAĐA VIRUSA 1
1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA RESPIRATORNOGA SINCICIJSKOG VIRUSA 3
1.1.3. PATOGENEZA INFEKCIJE RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM ... 4
1.1.4 KLINIČKA SLIKA INFEKCIJA RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM 5
1.1.5. DIJAGNOZA INFEKCIJA UZROKOVANIH RSV-OM 7
1.1.6. LIJEČENJE INFEKCIJA UZROKOVANIH RSV-OM 9
1.1.7. PREVENCIJA INFEKCIJA UZROKOVANIH RSV-OM 10
1.1.8. POSLJEDICE INFEKCIJE RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM 11
1.1.9. IMUNOPATOGENEZA INFEKCIJE RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM 12
1.2. ANTIMIKROBNI PEPTIDI 16
1.2.1. DEFENZINI 18
1.2.2. KATELICIDINI 19
1.2.3. ULOGA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU 20
1.2.4. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE ANTIMIKROBNIH PEPTIDA 21
1.2.5. ANTIMIKROBNI PEPTIDI I VIRUSI 23
1.2.6. ANTIMIKROBNI PEPTIDI I RESPIRATORNI SINCICIJSKI VIRUS 26
1.2.7. ANTIMIKROBNI PEPTIDI U DIŠNIM PUTOVIMA 28
1.3. SVRHA RADA 30
2. HIPOTEZA 31
3. CILJEVI RADA 32
3.1. OPĆI CILJ 32
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI 32
4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA 33
4.1. ISPITANICI 33
4.1.1. BOLESNICI 34
4.1.2. KONTROLNA SKUPINA 36
4.2. METODE ISTRAŽIVANJA 36
4.2.1. BIOKEMIJSKE, HEMATOLOŠKE I CITOLOŠKE PRETRAGE 36
4.2.2. BRONHOSKOPIJA 37
4.2.3. NE-BRONHSKOPSKI BRONHOALVEOLARNI ISPIRAK 38
4.2.4. OBRADA BRONHOALVEOLARNOGA ISPIRKA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA I CITOKINA 38

4.3. STATISTIČKA ANALIZA 39
5. REZULTATI 41
5.1. BOLESNICI 41
5.2. KONCENTRACIJE CITOKINA I ANTIMIKROBNIH PEPTIDA U BAL-U 42
5.3. KORELACIJA IZMEĐU ANTIMIKROBNIH PEPTIDA I CITOKINA 47
5.4. POVEZANOST KONCENTRACIJE CITOKINA I AMP-A U BAL-U I TEŽINE BOLESTI 48
6. RASPRAVA 51
7. ZAKLJUČAK 66
8. SAŽETAK 68
9. SUMMARY 71
10. POPIS LITERATURE 72
11. KRATKA BIOGRAFIJA 99
12. PRILOZI 100

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. RESPIRATORNI SINCICIJSKI VIRUS

Respiratorni sincicijski virus (RSV) prvi je put izoliran 1955. godine u čimpanze s infekcijom gornjih dišnih putova, a ubrzo je ustanovljeno da je patogen i za ljude (1). Svrstava se u red *Mononegavirales*, porodicu *Pneumoviridae*. Ranije je svrstavan u porodicu *Paramyxoviridae*, potporodicu *Pneumovirinae*, rod *Pneumovirus*. Međutim, 2016. godine potporodica *Pneumovirinae* izdvojena je kao posebna porodica koja sadrži dva roda: rod *Orthopneumovirus* u koji spada RSV i rod *Metapneumovirus* u koji spada humani metapneumovirus (2).

1.1.1. GRAĐA VIRUSA

RSV je izgledom polimorfan, može imati kuglasti oblik veličine 120 do 300 nm ili manji nitasti oblik koji dominira u kulturi stanica. Sadrži jednolančanu negativno orijentiranu ribonukleinsku kiselinu (RNK) s 10 gena. Obavija ga lipidna ovojnica koja potiče od stanice domaćina. Virus se naime umnožava u citoplazmi domaćina koju napušta pupanjem.

Genom RSV-a sadrži 10 gena koji se prepisuju u 10 posebnih glasničkih RNK. Svaka glasnička RNK kodira jedan protein osim M2 koja kodira proteine M2-1 i M2-2. Tako genom RSV-a kodira 11 proteina, od kojih je 9 strukturnih, a dva su nestrukturna. Tri strukturna proteina uklopljena su u virusnu ovojnicu: G (vezni, engl. *glycoprotein*), F (fuzijski, engl. *fusion*) i SH (mali hidrofobni, engl. *small hydrophobic*). Sljedeća tri strukturna proteina grade nukleokapsidu: N (nukleoprotein, engl. *nucleoprotein*), P (fosfoprotein, engl. *phosphoprotein*) i M (matriks, engl. *matrix*). Preostala tri – M2-1, M2-2 i L (veliki, engl. *large*) – sudjeluju u replikaciji virusa. Nestrukturni proteini su NS1 i NS2 (engl. *nonstructural*). Iako je genom RSV-a veličinom sličan genomu srodnih virusa iz porodice *Paramyxoviridae*, RSV ima više proteina od njih.

G-protein i F-protein su transmembranski površinski proteini. G-protein ima ulogu u prihvaćanju virusa za stanicu dok F-protein omogućuje spajanje s membranom stanice i ulazak virusa u stanicu pri čemu sam protein mijenja konfiguraciju (3). F-protein je odgovoran za stvaranje sincicija u kulturi stanica (4). Osim toga veže se za receptor sličan

tollu (TLR, engl. *toll-like receptor*) 4, započinje prijenos signala i potiče odgovor prirođene imunosti (5).

Neutralizirajuća protutijela stvaraju se na oba površinska proteina. F-protein je antigenski stabilan pa su neutralizirajuća protutijela na njega križno reaktivna između podgrupa RSV-a (6). G-protein se razlikuje u slijedu aminokiselina pa se na temelju toga RSV dijeli u tip A i B te u više podgrupa, odnosno genotipova (7). Trenutno je poznato 13 genotipova tipa A i 22 genotipa tipa B. Više podgrupa prisutno je istovremeno u populaciji, a tip A češće uzrokuje epidemije. Nedavno (2012. godine) je otkriven novi genotip tipa A RSV-a nazvan ON1 koji se brzo proširio širom svijeta i sada predstavlja dominantan genotip (8). To je potvrda da G-protein RSV-a i dalje prolazi genotipske promjene koje sigurno doprinose njegovom izbjegavanju imunološkog odgovora. Dosadašnja ispitivanja o povezanosti tipa virusa i težine bolesti su dala neujednačene rezultate. Iako ih je većina pokazala da tip A uzrokuje težu bolest, pojedina nisu našla razliku ili su pokazala da tip B uzrokuje težu bolest (9). Vjerojatno težina bolesti ovisi prvenstveno o genotipu virusa, kao što je pokazano u više istraživanja. Tako su Midulla i suradnici pokazali da genotip NA1 uzrokuje težu bolest od novoga genotipa ON1 usprkos manjem broju virusnih čestica u dišnim putovima (10).

Ima sve više dokaza da RSV koristi G-protein kako bi se branio od imunološkog odgovora. Značajan udio, oko 80%, G-proteina stvara se u solubilnoj formi za koju se vežu neutralizirajuća protutijela. Tako se smanjuje njihovo direktno djelovanje, ali i neutralizacija posredstvom stanica koje posjeduju receptor za Fc ulomak protutijela (11). Također, cisteinom bogata središnja domena G-proteina sprečava aktivaciju više TLR-a, između ostalih i TLR-4 pa tako čini protutežu učinku F-proteina koji ih aktivira (12). G-protein može ometati signalne putove u dendritičkim stanicama koji su bitni za prezentiranje antigena (13). U potrazi za veznim mjestom za G-protein na epitelnim stanicama ustanovljeno je da dio G-proteina sliči kemokinu fraktalkinu (CX3C) i da se veže za njegov receptor (14). Osim što mu to omogućava vezanje za stanicu, RSV preko receptora smanjuje stvaranje interferona (IFN) u epitelnim stanicama i stvaranje IFN i čimbenika tumorske nekroze (TNF, engl. *tumor necrosis factor*) alfa u monocitima i dendritičkim stanicama (15). Na taj način oslabljuje kako prirođeni tako i stečeni imunološki odgovor (16).

SH-protein je transmembranski protein koji u membrani stvara strukture slične porama koje vjerojatno imaju ulogu ionskih kanala (17). Smatra se da sprečava apoptozu stanica koje su zaražene RSV-om i na taj način produljuje stvaranje novih viriona i podržava infekciju (18, 19).

M-protein tvori sloj ispod virusne ovojnice, a ima ulogu tijekom sastavljanja i pupanja virusa.

N- i P-proteini tvore nukleokapsidu i nužni su za replikaciju i transkripciju. N-protein prekriva virusnu RNK tijekom transkripcije i replikacije u stanici domaćina i tako čuva njezinu strukturu i štiti od imunološkog odgovora. N-protein se može naći na površini zaraženih epitelnih stanica kao i dendritičkih stanica i ondje inhibirati aktivaciju limfocita T (20).

L-protein predstavlja RNK polimerazu neophodnu za replikaciju virusa. M2-1 protein s P-proteinom regulira transkripciju glasničke RNK, a M2-2 protein ima ulogu u prijelazu iz transkripcije u replikaciju.

Nestrukturni proteini NS1 i NS2 su mali proteini koji se nalaze u jezgri i mitohondrijima zaražene stanice. Poznata je njihova uloga u ometanju imunološkog odgovora, prvenstveno stvaranja interferona (21). Proteini NS1 i NS2 uključeni su u inhibiciju stanične apoptoze u ranoj fazi infekcije RSV-om što smanjuje izlaganje virusa imunološkom odgovoru (22). Istraživanja Munira i suradnika ukazuju da bi nestrukturni proteini mogli ometati proliferaciju i aktivaciju limfocita T na poticaj stanica koje prezentiraju antigen i na taj način suprimirati imunološki odgovor, ali i usmjeravati ga prema Th2 odgovoru (23, 24)

1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA RESPIRATORNOGA SINCICIJSKOG VIRUSA

Respiratorni sincicijski virus uzrokuje akutne respiratorne infekcije osoba svih dobnih skupina. Najvažniji je i najčešći uzročnik infekcija donjih dišnih putova u dojenčadi i male djece što za posljedicu ima veliki broj hospitalizacija (25, 26). Značajno doprinosi i smrtnosti djece do 5 godina (26). Procjenjuje se da je 2015. godine više od 30 milijuna djece preboljelo infekciju donjih dišnih putova uzrokovanu RSV-om, od kojih je više od 3 milijuna liječeno u bolnici, a oko 100000 umrlo (26). Te procjene se ne razlikuju bitno od onih za 2005. godinu što zorno pokazuje da u tom periodu nismo uspjeli poboljšati prevenciju ni liječenje infekcija uzrokovanih RSV-om (27). Gotovo se sve smrti djece zbog infekcije RSV-om (oko 99%) događaju u nerazvijenim zemljama, a glavni je razlog tome nedostupnost bolničke skrbi (28). To naglašava činjenica da u razvijenim zemljama 70% umrle djece ima neki čimbenik rizika, dok je u nerazvijenima taj udio samo 28% (28).

Znamo da RSV uzrokuje infekcije dišnih putova tijekom cijeloga života, a brojni ga izvještaji prokazuju kao uzročnika težih respiratornih infekcija u odraslih, prvenstveno starijih

od 65 godina i onih s kroničnim bolestima pluća i srca (29). Važnost RSV-a potvrđuje i činjenica da se u vrijeme epidemije RSV-a primjećuje povećani broj hospitalizacija i višak smrtnosti, po čemu se približava virusu gripe (30).

RSV je proširen po čitavom svijetu. Infekcije RSV-om se u krajevima s umjerenom klimom javljaju sporadično tijekom cijele godine, a epidemijski u hladnim mjesecima, pogotovo u periodu od studenog do travnja (25). U Hrvatskoj se svake druge godine bilježi veći broj oboljelih, a svakih 4-6 godina svjedočimo većoj epidemiji (31).

Oko 90% djece prvu infekciju RSV-om preboli do druge godine života, a gotovo sva do treće godine (32, 33). Vrhunac zaražavanja je u dobi od dva do osam mjeseci života. Primarna infekcija iznimno prolazi asimptomatski, a u više od polovine djece budu zahvaćeni i donji dišni putovi (34). Rizik infekcije veći je u djece koja pohađaju kolektiv ili čija braća ili sestre pohađaju kolektiv, djece koja su izložena onečišćenom zraku, pogotovo duhanskom dimu, blizanaca te djece koja su kraće dojena. Reinfekcije su česte tijekom života i manifestiraju se blažom kliničkom slikom. Obolijevaju starija djeca, ali i odrasli.

RSV se prenosi kontaktom s inficiranim sekretima ili kontaminiranim predmetima te kapljično. Ulazno mjesto su sluznica nosa i spojnice oka, a rjeđe sluznica usne šupljine. Virus može relativno dugo preživjeti izvan žive okoline - u kapljicama sekreta na rukama oko jedan sat, ali u osušenim kapljicama sekreta na predmetima izdrži i više od 24 sata (35). To mu olakšava širenje i čini ga značajnim uzročnikom nozokomijalnih infekcija.

RSV je uzročnik oko polovice akutnih respiratornih infekcija u djece, do 80% bronhiolitisa koji zahtijevaju hospitalizaciju i do 40% upala pluća u djece (36, 37). U odraslih RSV uzrokuje do 10% upala pluća (38).

1.1.3. PATOGENEZA INFEKCIJE RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

RSV u organizam ulazi preko sluznice nosa, usne šupljine ili spojnice oka. Potom se umnožava u nazofarinksu te nakon inkubacije koja traje četiri do šest dana uzrokuje početne simptome – seroznu sekreciju iz nosa i začepljenost nosa s posljedičnim otežanim hranjenjem u dojenčadi. RSV se potom širi prema donjim dišnim putovima, gdje dospije za jedan do tri dana (39). Širi se na dva načina: aspiracijom sekreta koji sadrži virusne čestice i direktno iz stanice u stanicu zaražavajući susjedne stanice. Inficira cilindrične epitelne stanice s trepetljikama i vrčaste stanice, a u alveolama pneumocite tip 1 i tip 2, dok su bazalne stanice pošteđene (39). Umnožavanje virusa u stanicama dovodi do njihovog propadanja, a kasnije u

tijeku infekcije i imunološki odgovor dovodi do smrti i ljuštenja stanica. Propale stanice zamjenjuju kubične stanice bez cilija što remeti mehanizam odstranjivanja stranih čestica. Dolazak virusa na sluznice i njegovo umnožavanje primarno aktivira prirođeni imunološki odgovor. To između ostaloga dovodi i do lučenja medijatora upale od kojih neki djeluju kemotaktički na limfocite i aktivirane neutrofile. Nastaje peribronhiolarna limfocitna infiltracija te edem stijenke bronhiola, a potom nekroza epitela i proliferacija epitela u lumen. Time se sužava lumen malih dišnih putova što dovodi do značajnog povećanja otpora protoku zraka (obrnuto je proporcionalan kvadratu promjera dišnog puta) čemu pridonosi i nakupljanje staničnog detritusa, fibrina i guste sluzi u lumenu. Nastaje djelomična ili potpuna opstrukcija malih dišnih putova. U inspiriju negativni intrapleuralni tlak omogućuje da zrak prođe suženje, međutim prilikom povišenog intrapleuralnoga tlaka u ekspiriju dišni put se dalje sužava. Otežani prolazak zraka u ekspiriju rezultira auskultatornim nalazom produljenog ekspirija i sipnje. Često se vidi fenomen "zarobljavanja zraka" u plućima (eng. *air-trapping*) s posljedičnom hiperinflacijom (40). Ukoliko se mali dišni put potpuno začepi distalno može doći do potpune apsorpcije zraka što za posljedicu ima područja malih atelektaza. Dijete povećanjem frekvencije disanja (tahipneja, dispneja) kompenzira smanjeni volumen udaha i održava minutni volumen disanja, a zbog brojnih područja pluća s niskim omjerom ventilacije i perfuzije nastaje hipoksija. Težina kliničke slike ovisi o proširenosti promjena. Bolest je teža u mlađe dojenčadi i zbog toga što imaju manji promjer dišnih putova.

1.1.4 KLINIČKA SLIKA INFEKCIJA RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

Respiratorni sincicijski virus uzrokuje infekcije dišnih putova tijekom cijelog ljudskoga života. Klinička slika infekcije RSV-om kao i težina bolesti ovisi o dobi, postojanju čimbenika rizika te o tome radi li se o primarnoj infekciji ili reinfekciji (32, 34). Primarna infekcija se u 90% djece zbiva do druge godine života (32). Manifestira se često kao infekcija donjih dišnih putova (traheobronhitis, sindrom krupa, bronhiolitis ili pneumonija).Sklonost težim oblicima infekcije imaju prerano rođena djeca, dojenčad mlađa od tri mjeseca, djeca koja boluju od kronične plućne bolesti, imunodeficijencije ili neuromuskularne bolesti, kao i djeca s hemodinamski značajnom prirođenom srčanom greškom (25, 41-45). Reinfekcije se ponavljaju višekratno tijekom života i uzrokuju gotovo isključivo upale gornjih dišnih putova. Iznimka su starije odrasle osobe i odrasle osobe koje boluju od kroničnih bolesti srca i pluća, u kojih infekcija može zahvatiti donje dišne putove, kao i imunokompromitirane osobe,

prvenstveno nakon transplantacije koštane srži ili pluća, u kojih bolest često zahvaća donje dišne putove. U njih bolest može završiti smrtno i oni čine glavninu mortaliteta koji uzrokuje RSV (46).

Infekcije gornjih dišnih putova rezultat su dakle reinfekcija te manjeg dijela primarnih infekcija. Manifestiraju se kao prehlada, akutna respiratorna bolest, upala srednjeg uha i/ili sinusa. Uobičajeni simptomi su hunjavica i suhi kašalj, a temperatura je većinom blago povišena tijekom nekoliko dana i ne korelira s težinom bolesti (47). Mogu biti prisutni i drugi opći simptomi, prvenstveno umor. Bolest je teško klinički razlikovati od drugih virusnih infekcija gornjih dišnih putova, osim po trajanju simptoma. Uobičajeno trajanje simptoma je desetak dana što je duže od respiratornih infekcija uzrokovanih drugim virusima. Česta komplikacija u djece je otitis koji može biti uzrokovan samim RSV-om ili bakterijskom infekcijom.

Infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om u djece manifestiraju se prvenstveno kao bronhiolitis i pneumonija, rjeđe kao laringo-traheo-bronhitis.

Bronhiolitis je akutna respiratorna infekcija koja prvenstveno zahvaća male dišne putove (bronhiole). Uzrokovan je skoro uvijek virusima, a obolijevaju gotovo isključivo djeca mlađa od dvije godine. U kliničkim ispitivanjima bronhiolitis se često definira kao prva epizoda sipnje (engl. *wheezing*) u djeteta mlađeg od dvije godine koje ima akutnu infekciju dišnih putova, a nema drugog objašnjenja za sipnju. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike.

Bronhiolitis počinje simptomima zahvaćenosti gornjih dišnih putova - začepljenost ili curenje nosa, blagi kašalj, injekcija spojnica oka, suzenje očiju. Nakon 1-3 dana javljaju se simptomi donjih dišnih putova. Kašalj postaje izraženiji, razvijaju se dispneja (širenje nosnica, uvlačenje jugulума i interkostalnih prostora, klimanje glave), tahipneja i tahikardija. Temperatura je obično blaže povišena. Djeca su često inapetentna, klonula, pospana i razdražljiva. Mogu povraćati u kašlju i imati proljev. Simptomi su najizraženiji između petog i sedmoga dana bolesti nakon čega se postupno smiruju. Prosječno trajanje bronhiolitisa je 12 dana, iako simptomi mogu trajati i do četiri tjedna.

Apneja se javlja u do 5% hospitalizirane djece, često kao prvi simptom bolesti. Češće se javlja u dojenčadi mlađe od dva mjeseca i prematurno rođene djece. Smatra se jednim od uzroka sindroma iznenadne dojenačke smrti.

Najvažnija komplikacija bronhiolitisa je respiratorna insuficijencija i razvija se u do pet posto hospitalizirane dojenčadi, te u oko 20% oboljelih s rizičnim čimbenicima. Sekundarne bakterijske infekcije su rijetke (1-5% hospitaliziranih) i obično su ograničene na

dišne putove (upala srednjeg uha, upala pluća). Dehidracija je česta zbog smanjenog unosa tekućine i povećanih gubitaka (tahidispneja, vrućica, povraćanje, proljev).

Pneumonija je upala donjih dišnih putova koju karakterizira zahvaćanje plućnoga parenhima. Dijagnoza se temelji na kliničkoj slici, a potvrđuje rendgenskom snimkom pluća na kojoj se vidi upalni infiltrat.

Klinička slika pneumonije uzrokovane RSV-om se u dojenčadi i male djece ne razlikuje bitno od kliničke slike bronhiolitisa. Upravo se zbog toga često koristi zajednički naziv infekcija donjih dišnih putova. Bolest počinje sekrecijom iz nosa i blagim kašljem nakon čega slijedi pogoršanje s izraženijim kašljem, dispnejom i inapetencijom. Temperatura je u većine djece blaže povišena.

U starije djece bolest također počinje simptomima gornjih dišnih putova, a temperatura je značajnije povišena. Kasnije se javlja kašalj, a dispneja je rijetka i često povezana s nalazom bronhoopstrukcije. Auskultatorno se obično čuju krepitacije na većem arealu.

Infekcija donjih dišnih putova uzrokovana RSV-om u odraslih je posljedica reinfekcije i manifestira se kao traheobronhitis, pneumonija i egzacerbacija kronične opstruktivne bolesti pluća. I kod njih bolest počinje simptomima infekcije gornjih dišnih putova – prvo se javljaju začepljenost i sekrecija iz nosa, rjeđe promuklost i grlobolja. Oko polovice bolesnika ima povišenu tjelesnu temperaturu. Kašalj je prisutan u gotovo svih bolesnika pa i u onih s infekcijom gornjih dišnih putova. Pneumonija je često praćena dispnejom, a auskultatorno se često čuju sipnja i/ili hropci. Rendgenske snimke nerijetko pokazuju obostrane infiltrate, koji mogu biti intersticijski ili alveolarni, a nekad se vidi lobarna pneumonija. Klinička slika u imunokompromitiranih odraslih je slična, ali teža, a dispneja je značajno češće prisutna. U odraslih povećani rizik za težu bolest predstavljaju starija dob (više od 65 godina), bolesti pluća i srca (posebno kronična opstruktivna plućna bolest i kongestivno zatajivanje srca) i imunokompromitiranost (poglavito transplantacija koštane srži ili pluća).

U djece i u odraslih infekcija RSV-om može uzrokovati pojačanu reaktivnost dišnih putova i egzacerbaciju astme, a u odraslih i egzacerbaciju kronične opstruktivne plućne bolesti (48).

1.1.5. DIJAGNOZA INFEKCIJA UZROKOVANIH RSV-OM

RSV uzrokuje infekcije gornjih i donjih dišnih putova čija se dijagnoza postavlja prvenstveno na temelju anamneze i kliničkoga pregleda. Rutinska laboratorijska obrada rijetko rezultira nalazima koji odstupaju od referentnih vrijednosti pa ne pomaže u postavljanju dijagnoze. Stoga je većina smjernica usmjerenih na bronhiolitis ne preporučuje (49). Isto vrijedi i za radiološku obradu. Iako značajan broj djece s bronhiolitisom ima patološki nalaz radiograma prsnoga koša, samo je jedna studija našla korelaciju između patološkoga nalaza (atelektaza) i težine kliničke slike (50). Naravno, kod sumnje na pneumoniju nalazom infiltrata na radiogramu prsnoga koša potvrđuje se dijagnoza pa je stoga indiciran u slučaju sumnje na pneumoniju i u djece i u odraslih.

Bolesti uzrokovane RSV-om gotovo je nemoguće na temelju kliničke slike, laboratorijskih nalaza i radiograma prsnoga koša razlikovati od onih uzrokovanih drugim respiratornim virusima. Iako postavljanje etiološke dijagnoze ne mijenja bitno terapijski pristup jer ne postoji učinkovito etiološko liječenje, ipak nam u nekim situacijama omogućuje ukidanje antimikrobnoga liječenja, a i donosi nam očekivani tijek i težinu bolesti. Također je značajno radi praćenja epidemiologije RSV-a.

Etiološka dijagnoza može se postaviti izolacijom virusa, metodama dokazivanja virusnih antigena ili nukleinske kiseline i serološkim metodama. Izolacija virusa je nekad bila zlatni standard, no zbog potrebnoga vremena (2-10 dana) i visoke cijene iz kliničke prakse posve su je izbacile metode dokazivanja virusnih antigena i nukleinske kiseline. Serološke metode dokazuju protutijela na virusne antigene, no s obzirom na ranu primoinfekciju i česte reinfekcije tijekom života nisu od koristi kliničarima. Stoga se danas koriste gotovo isključivo za epidemiološke studije.

Metode kojima se uobičajeno dokazuju antigeni RSV-a su imunofluorescencija i imunoadsorpcija. Njihova prednost su dostupnost, brzina i povoljna cijena uz osjetljivost i specifičnost koje prelaze 90%. Postoje i komercijalni brzi testovi koji se mogu izvesti uz krevet bolesnika. Glavna prednost takvih testova je da ne zahtijevaju obučeno osoblje, a rezultat se dobije unutar 30 minuta. Njihova osjetljivost je oko 80%, a specifičnost prelazi 95% (51). To ih čini odličnom dijagnostičkom metodom za zdravstvene ustanove bez mikrobiološke dijagnostike.

Molekularne metode dokazivanja virusne nukleinske kiseline imaju još veću osjetljivost i specifičnost pa su posebno korisne u odraslih koji izlučuju manju količinu virusa od djece. Rezultati su dostupni većinom unutar nekoliko sati, najdulje unutar 24 sata. Prednost im je visoka specifičnost i osjetljivost, a nedostaci visoka cijena i potreba za posebnom opremom i educiranim osobljem. Sve se više koriste komercijalni multipleks testovi kojima se

istovremeno dokazuje više različitih uzročnika. Najveći značaj imaju u dijagnostičkoj obradi imunokompromitiranih bolesnika, kao i onih s težim oblicima bolesti.

Za dokazivanje RSV-a molekularnim metodama i testovima koji dokazuju virusne antigene uzimaju se materijali iz dišnih putova – ispirak ili aspirat nazofarinksa, ispirak traheje ili bronhoalveolarni ispirak (BAL). Može se koristiti i bris ždrijela, no to je lošiji uzorak jer sadrži uglavnom stanice pločastog epitela. Rutinski se koriste sekreti iz gornjih dišnih putova jer je dokaz RSV-a u njima dovoljan za potvrdu etiologije bolesti. Uzorci iz donjih dišnih putova koriste se kad u obzir dolaze i uzročnici čiji dokaz u gornjim dišnim putovima nije značajan za utvrđivanje etiologije.

Najpovoljnije vrijeme uzimanja materijala za izolaciju virusa su prva dva do tri dana bolesti, a virus se može dokazati već i dva dana prije pojave simptoma, sve do osmoga dana bolesti. Opisano je dokazivanje virusa i više mjeseci od početka bolesti, prvenstveno u imunokompromitiranih bolesnika (52).

1.1.6. LIJEČENJE INFEKCIJA UZROKOVANIH RSV-OM

Liječenje infekcija dišnih putova uzrokovanih RSV-om je gotovo isključivo simptomatsko pa se u većine bolesnika provodi kod kuće, a samo u teže bolesnih potrebna je hospitalizacija. Simptomatsko liječenje infekcija uzrokovanih RSV-om sastoji se od adekvatne hidracije, antipireze, dekongestije nosne sluznice i aspiracije sekreta iz dišnih putova. Te su mjere osnova i u liječenju infekcija donjih dišnih putova u djece uz oksigenoterapiju, koja se preporučuje kod vrijednosti zasićenosti periferne krvi kisikom (SpO2) ispod 90-92% (53, 54).

Učinkovitost inhalacija hipertonične otopine natrijevoga klorida u liječenju bronhiolitisa dokazana je samo u manjim studijama, a teoretska podloga je smanjivanje viskoznosti sluzi i edema dišnih putova (55-58).

Trenutno je jedini antivirusni lijek koji djeluje na RSV ribavirin, sintetski nukleozidni analog koji inhibira virusnu replikaciju. Koristi se u obliku aerosola, a trajanje liječenja je tri do sedam dana. Kontraindiciran je u trudnoći jer je teratogen. Studije nisu uspjele dokazati njegovu učinkovitost u liječenju bolesti uzrokovanih RSV-om, skup je i toksičan pa je problem i izlaganje osoblja (59). Stoga ga većina smjernica za liječenje bronhiolitisa ne preporučuje u standardnoj terapiji. U Hrvatskoj nije registriran, a u svijetu se koristi za

liječenje teških oblika bolesti, pogotovo u starije djece i odraslih nakon transplantacije koštane srži.

U liječenju pneumonije u bolesnika nakon transplantacije koštane srži ili pluća kombinacija ribavirina i protutijela na RSV ili kortikosteroida pokazala se učinkovitom u manjim studijama. Također, neke studije su pokazale da peroralno davanje ribavirina ima jednaki učinak kao inhalacijska primjena u bolesnika nakon transplantacije koštane srži (60). Očekujemo da studije ispitaju učinkovitost peroralnoga ribavirina u liječenju infekcija uzrokovanih RSV-om u odraslih, a potom i u djece ukoliko rezultati budu povoljni.

Trenutno je u različitim fazama pretkliničkog i kliničkoga ispitivanja veći broj lijekova od kojih se očekuje učinkovitost u sprečavanju umnožavanja RSV-a pa time i skraćivanje trajanja bolesti i ublažavanje simptoma.

1.1.7. PREVENCIJA INFEKCIJA UZROKOVANIH RSV-OM

Respiratorni sincicijski virus spada u najvažnije virusne uzročnike bolničkih infekcija pa uobičajene opće mjere prevencije imaju veliki značaj u sprečavanju širenja infekcija. Te mjere uključuju pranje ruku prije i nakon kontakta s bolesnikom, nošenje zaštitne maske, izolaciju bolesnika, dezinfekciju površina i izbjegavanje izlaganja. Od specifičnih mjera trenutno je dostupna samo pasivna imunizacija, a očekuje se da bi unutar deset godina mogli imati dostupno cjepivo (61).

Profilaksa RSV infekcije u djece s rizičnim čimbenicima za težu bolest provodi se primjenom palivizumaba. To je humanizirano monoklonsko protutijelo na F-protein, koje se proizvodi tehnologijom rekombinantne deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Primjena palivizumaba ne sprječava infekciju RSV-om, ali ublažava bolest i smanjuje broj hospitalizacija (62). Profilaksa se provodi mjesečnom primjenom tijekom pet mjeseci RSV sezone, što uglavnom obuhvaća period od studenog do ožujka. Profilaksa se ne prekida ako dijete tijekom sezone preraste indikaciju, ali se završava s krajem sezone bez obzira na broj primljenih doza. Prekida se u djeteta koje je hospitalizirano zbog RSV infekcije (53). Naime, vjerojatnost ponovne infekcije u istoj sezoni izuzetno je mala, a bolest je u tom slučaju blaža. Nuspojave palivizumaba su rijetke i jedina značajna je preosjetljivost. Primjena ni na koji način ne utječe na cijepljenje pa ga se u djece koja primaju palivizumab ne treba modificirati.

Indikaciju za profilaksu palivizumabom u Hrvatskoj imaju djeca rođena s manje od 32 tjedna gestacijske dobi koja su mlađa od šest mjeseci na početku sezone RSV-a, djeca s

kroničnom plućnom bolešću mlađa od 2 godine ako su zbog svoje bolesti bolnički liječena u zadnjih šest mjeseci i djeca koja imaju prirođenu srčanu grešku s velikim lijevo-desnim protokom uz pridruženu plućnu hipertenziju ako su mlađa od godinu dana ili ako usprkos započetom kirurškom liječenju perzistira plućna hipertenzija ili miokarditis u dobi do dvije godine. U većini razvijenih zemalja indikacije za davanje palivizumaba su šire i dodatno uključuju imunokompromitiranu djecu, djecu s kongenitalnom anomalijom dišnih putova ili cističnom fibrozom te neuromuskularnom bolešću.

U tijeku su klinička ispitivanja dva nova monoklonska protutijela usmjerena na F-protein RSV-a, no prvenstveno namijenjena sprječavanju progresije bolesti u imunokompromitiranih bolesnika zaraženih RSV-om (63).

Nedugo nakon otkrića RSV-a pokušalo se infekcije prevenirati cijepljenjem. 1960-ih je ispitano cjepivo koje je sadržavalo formalinom inaktivirani virus. Međutim rezultat je bio porazan – ukoliko bi došlo do infekcije RSV-om cijepljena djeca imala bi težu bolest i veću smrtnost. To je praktički zaustavilo daljnji razvoj cjepiva. Srećom, uslijed novih spoznaja o patogenezi infekcije, potraga za cjepivom je ponovno intenzivirana pa je trenutno skoro 20 cjepiva u raznim fazama kliničkog ispitivanja, a još i više njih u pretkliničkim. Kandidatska cjepiva razlikuju se prema formulaciji s obzirom na cilju skupinu, a namijenjena su djeci, trudnicama i/ili odraslima. Budući da RSV najviše ugrožava malu dojenčad, dio istraživača priklonio se taktici koja se koristi kod hripavca i osmislio cjepiva namijenjena trudnicama. Tako se djetetu pruža zaštita od rođenja, a izbjegava se cijepljenje u trenutku kad je imunološki sustav nezreo, posebno zbog nedovoljnog afiniteta protutijela i neučinkovite prezentacije antigena (64). Glavni izazov kod cijepljenja trudnica predstavlja potaknuti stvaranje zaštitnih protutijela u količini koja je dovoljna da budu prenesena djetetu i da ga štite cijelo vrijeme sezone RSV-a.

1.1.8. POSLJEDICE INFEKCIJE RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

Infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om u djece mogu ostaviti dugoročne posljedice na dišne putove (65). Brojne su studije dokazale povezanost infekcije RSV-om u dojenačkoj dobi i pojačane reaktivnosti dišnih putova (66). Dojenčad hospitalizirana zbog bronhiolitisa uzrokovanoga RSV-om ima značajno povišen rizik za ponavljanje epizode bronhospazma. Infekcija RSV-om u miševa rezultira pojačanom reaktivnošću dišnih putova (67). Iako je početna teza bila da je astma posljedica infekcije RSV-om, sada se vjerojatnijim

čini da predispozicija za astmu predstavlja i predispoziciju za težu infekciju RSV-om (68, 69). Vjerojatnu podlogu predstavlja izmijenjen imunološki odgovor u te djece temeljen na protutijelima razreda IgE (70, 71).

Kao što je već navedeno, i u odraslih infekcija RSV-om može dovesti do sklonosti bronhoopstrukciji i do nekoliko mjeseci nakon infekcije, a i kod njih protutijela razreda IgE vjerojatno igraju važnu ulogu (72).

1.1.9. IMUNOPATOGENEZA INFEKCIJE RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

Uloga imunološkoga sustava u patogenezi infekcija donjih dišnih putova uzrokovanih RSV-om nije razjašnjena budući da nije moguće jednoznačno ustanoviti tko je odgovoran za oštećenje dišnih putova kao i za težinu kliničke slike – virus ili imunološki odgovor. Tijekom vremena nanizala su se brojna istraživanja čiji su rezultati ukazivali na važnost uloge virusa ili imunološkoga odgovora, a istraživanja su nerijetko davala kontradiktorne rezultate.

Koji argumenti ukazuju na važnost RSV-a u patogenezi? Primarna infekcija u trenutku kada ne postoji specifična stečena imunost rezultira najtežom kliničkom slikom, dok su sve kasnije infekcije blaže i gotovo uvijek ograničene na gornje dišne putove, osim u starijih i imunokompromitiranih. Imunokompromitirane osobe imaju težu bolest uz prisutnu veliku količinu virusa u dišnom putovima (73). Imunosupresivno liječenje ne utječe na tijek bolesti. Neke studije su pokazale povezanost veće količine virusa u dišnim putovima s težom bolešću i duljom hospitalizacijom (74, 75). Pogoršanje simptoma (izraženiji kašalj, dispneja, tahipneja) povezuje se s dolaskom RSV-a u donje dišne putove. T-limfocitni odgovor u primarnoj infekciji javlja se oko petoga dana bolesti, kada se količina virusa u dišnim putovima smanjuje, a simptomi se većinom povlače pa se smatra da ne doprinosi patološkim promjenama (76, 77). To su potvrdili obdukcijski nalazi djece umrle zbog teške infekcije uzrokovane RSV-om koji su imali mali broj limfocita u dišnim putovima (78).

Koji argumenti naglašavaju važnost imunološkoga sustava u patogenezi? RSV je umjereno citopatogen virus *in vivo*. Neka su ispitivanja pokazala da je količina virusa u padu u vrijeme pogoršanja simptoma (79, 80). Vrhunac bolesti korelira s razvijenim odgovorom limfocita T i B pa neki smatraju da stečeni stanični odgovor pri odstranjivanju virusa uzrokuje oštećenje tkiva i pogoršanje simptoma (70). Tijekom bolesti se oslobađa velika količina topivih medijatora upale (interleukini, kemokini, leukotrieni) (81). Djeca cijepljena formalinom inaktiviranim RSV-om su pri infekciji divljim virusnom imala težu bolest s

većom smrtnošću u odnosu na necijepljenu djecu (82). Neki autori opisuju patohistološki nalaz upalnih promjena s obilnim infiltratom neutrofila, monocita i limfocita T u plućima djece umrle zbog infekcije RSV-om (39). Studije na miševima ukazuju da previše izraženi imunološki odgovor domaćina doprinosi težini bolesti (83).

Takvi suprotstavljeni argumenti navode na zaključak da je istina negdje u sredini. Dakle, vjerojatno dio štete radi sam virus, a dio imunološki sustav. Također, činjenica da brojna istraživanja nisu našla jednoznačni odgovor na ovo pitanje navodi na zaključak da u patogenezi infekcija donjih dišnih putova izazvanih RSV-om ne postoji jedan vodeći mehanizam oštećenja, već da više sitnih učinaka virusa i odstupanja u imunološkom odgovoru zajedno dovodi do teške kliničke slike infekcije. Osim toga, izvjesno je da razlike u imunološkom odgovoru između jedinki pojedine vrste pa i ljudi (genetske, a vjerojatno dijelom i okolišne) utječu na težinu i ishod bolesti.

U zadnje je vrijeme dominantna teza o imunopatogenezi infekcije RSV-om da je teža bolest posljedica neadekvatne stečene imunosti i to neravnoteže između Th1 i Th2 tipa imunološkog odgovora (84-86). Stanice koje prezentiraju antigen potiču naivne CD4+ limfocite T na sazrijevanje, a ovisno o citokinima i drugim medijatorima upale limfociti T mogu se razviti u smjeru Th1 i Th2 fenotipa. Tako diferencirani limfociti T razlikuju se po površinskim biljezima, ali i po citokinima koje produciraju. To posljedično aktivira različite izvršne mehanizme imunološkog odgovora. Th1 fenotip dovodi do dominantno staničnog odgovora, ključnoga za odstranjivanje unutarstaničnih patogena. Potaknut je interleukinom (IL) 12 i u slučaju infekcije RSV-om uključuje aktivaciju CD8+ citotoksičnih limfocita T (4, 87). Dovodi do oslobađanja IFN-γ, IL-2 i TNF-α iz pomoćničkih limfocita T. Th2 fenotip potiče humoralni odgovor, pojačavaju ga IL-2 i IL-4, a posredovan je interleukinima -4, -5, -6, -10 i -13. Dovodi do produkcije specifičnih protutijela usmjerenih prvenstveno na izvanstanične patogene. U infekciji RSV-om povećano lučenje IL-4 i IL-13 se povezuje s infiltracijom eozinofila i otpuštanjem aktivnih čimbenika posredstvom IgE s posljedičnom pojačanom reaktivnošću dišnih putova (85, 88, 89). To se klinički manifestira pojavom sipnje i razvojem teže bolesti. Znamo da Th1 odgovor potiču živi virusi i F protein, a Th2 inaktivirani virusi i protein G (90-93). Ipak, neka istraživanja nisu potvrdila ovisnost težine bolesti o intenzitetu Th2 odgovora (94-96).

U imunološkom odgovoru sudjeluju još dva tipa limfocita T – regulacijski i pomoćnički 17. Regulacijski limfociti T (Treg), ranije zvani supresorski, populacija su CD4+ limfocita T koji oblikuju imunološki odgovor. Mogu utjecati na brojne efektorske mehanizme imunološkog odgovora, uključujući Th1 i Th2 odgovor, a smatra ih se odgovornima za

imunološku toleranciju prema vlastitim antigenima i sprečavanje autoimunih bolesti. Tijekom virusnih infekcija Treg ograničavaju opseg upalne reakcije. Treg tip odgovora potiču IL-12 i transformirajući čimbenik rasta (TGF, engl. *transforming growth factor*) beta, a imunosupresija je posredovana putem TGF-β, IL-10, IL-35 i IL-37 citokina odnosno staničnih receptora (CTL4, GITR, CD39, PD-1).

Pokusi na mišjem modelu infekcije RSV-om pokazali su da deplecija Treg dovodi do boljeg odstranjivanja virusa, ali i do teže bolesti (97). S druge strane pojačavanje odgovora Treg ne utječe na količinu virusa, ali smanjuje upalne promjene u tkivu pluća miševa. Čini se da se taj učinak ostvaruje pomoću CD8+ limfocita T (97). Također, teža bolest izazvana RSV-om nakon cijepljenja formalinom inaktiviranim virusom mogla bi biti posljedica značajnoga gubitka funkcije Treg. To proizlazi iz ispitivanja na miševima koji su nakon cijepljenja inaktiviranim virusom imali težu bolest što se moglo povezati s gubitkom Treg (98). Složenost interakcija između protektivnih antivirusnih i imunoregulatornih mehanizama u akutnoj infekciji RSV-om naglašava primjer ekspresije TGF-β1 u respiratornim epitelnim stanicama potaknute RSV-om koja dovodi do zaustavljanja staničnoga ciklusa i povećavanja replikacije virusa (99).TGF-β je imunomodulatorni citokin kojim RSV može negativno kontrolirati imunološki antivirusni odgovor.

Pomoćnički 17 limfociti T (Th17) su u početku smatrani proupalnom populacijom limfocita T. Nastaju pod utjecajem IL-1β, IL-6 i TGF-β, a proizvode IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22. Važni su za uklanjanje patogena na sluznicama i njihov manjak povezuje se s kroničnom infekcijom. Smatra se da njihova prevelika aktivnost dovodi do oštećenja tkiva i autoimunih bolesti.

Mukherjee i suradnici su na mišjem modelu pokazali da IL-17 doprinosi težoj infekciji RSV-om na barem tri načina: dovodi do povećane produkcije sluzi, smanjuje odgovor CD8+ limfocita T i smanjuje odstranjivanje virusa (100). Učinak je vidljiv i u primarnoj infekciji, ali i u RSV-om izazvanoj egzacerbaciji alergijske bolesti pluća. Isti autori su izmjerili povišene koncentracije IL-17 u trahealnom aspiratu djece oboljele od bronhiolitisa uzrokovanoga RSV-om (100). Rezultati Newcomba i suradnika tvrde suprotno – oni su pokazali da nedostatak IL-17 dovodi do pojačane reaktivnosti dišnih putova na mišjem modelu infekcije RSV-om (101). Protektivna ulogu IL-17 u infekciji RSV-om dokazana je u ispitivanju živog atenuiranog cjepiva protiv hripavca na mišjem modelu (102). Da bi Th17 odgovor mogao biti protektivan pokazuje i istraživanje Fabera i suradnika koji su određivali koncentracije IL-17 u ispirku nazofarinksa djece oboljele od bronhiolitisa uzrokovanoga RSV-om pri prijemu i otpustu iz bolnice (103).Značajno više koncentracije IL-17 izmjerene su pri otpustu nego pri prijemu u

djece koja nisu bila mehanički ventilirana, dok u mehanički ventiliranih nije bilo značajne razlike između koncentracije IL-17 pri prijemu i otpustu. Očito je uloga Th17 odgovora u infekciji RSV-om izrazito složena, a vjerojatno ovisi o raznim čimbenicima uključujući i druge medijatore.

Nejasna je uloga protutijela u imunopatogenezi infekcije RSV-om. Profilaktičko davanje specifičnih protutijela (palivizumab) djeci s rizičnim čimbenicima za težu infekciju značajno smanjuje rizik od infekcije i teže bolesti (104-106). Koncentracija neutralizirajućih protutijela specifičnih za RSV u umbilikalnoj krvi novorođenčeta obrnuto je proporcionalna dobi u kojoj dijete bude hospitalizirano zbog primarne infekcije RSV-om (107, 108). To jasno ukazuje na zaštitnu ulogu protutijela. Međutim, postoje dokazi da protutijela pospješuju umnožavanje virusa kao i da mogu dovesti do teže bolesti uslijed stvaranja imunokompleksa i posljedične aktivacije komplementa (109). Također, primjena specifičnih protutijela je uglavnom neučinkovita u liječenju teških infekcija uzrokovanih RSV-om.

Uloga prirođene imunosti u imunopatogenezi infekcije RSV-om sve se više istražuje. Neka istraživanja ukazala su na važnost receptora. Tal i suradnici su pokazali da mutacije TLR-4 predstavljaju rizik za teži bronhiolitis uzrokovan RSV-om (110). RSV povećava ekspresiju TLR-4 u kulturi ljudskih respiratornih epitelnih stanica i tako omogućava lipopolisaharidu da potakne upalni odgovor (111). Uloga TLR-3 ispitana je na mišjem modelu infekcije RSV-om. Nedostatak TLR-3 u miševa doveo je do veće produkcije Th2 citokina, značajno veće produkcije sluzi i izraženije infiltracije eozinofila u dišnim putovima, a bez promjena u količini virusnih čestica (112). Učinak na povećanu produkciju sluzi gubio se deplecijom IL-13, što ukazuje da je to izvršni citokin. Uz činjenicu da mikroorganizmi mogu modulirati ekspresiju TLR-a, ovo dodatno naglašava složenost imunopatogeneze infekcije RSV-om.

Novija istraživanja upućuju da mehanizmi prirođene imunosti koji imaju ključnu ulogu u ranoj obrani od virusa mogu pretjeranom aktivnošću doprinijeti razvoju bolesti. Patogenezi RSV-infekcije doprinosi povećana koncentracija kemokina, naročito CXCL8, CCL3 i CCL5, čija je uloga privlačenje i migracija leukocita na mjesto upale, zatim pro-upalnih citokina, naročito IL-1β, TNF-α i IL-6, koji aktiviraju epitel, fibroblaste te stanice urođene i stečene imunosti, te leukotrijena koji pridonose pojačanoj reaktivnosti dišnih putova (81, 113-119).

1.2. ANTIMIKROBNI PEPTIDI

Prirođena imunost prva je crta obrane organizma od mikroorganizama. Akteri prirođene imunosti prvi dolaze u doticaj s mikroorganizmom, većinom na sluznicama i na koži te ih različitim mehanizmima pokušavaju uništiti. Glavna odrednica prirođene imunosti je nespecifičnost u prepoznavanju antigena, za razliku od stečene imunosti. Na površini stanica prirođene imunosti nalaze se receptori za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptors*), koji prepoznaju molekularne obrasce patogena (engl. *pathogen associated molecular* patterns). Ti molekularni obrasci su dobro sačuvani unutar i između vrsta i stoga zajednički za različite mikroorganizme. Primjer su glikoproteinske ovojnice virusa, dvolančana RNK virusa, odnosno pojedini ugljikohidrati, lipopolisaharidi ili lipoproteini bakterija i gljiva. Primjer receptora su TLR-i, važni u odgovoru na RSV. Takav sustav omogućuje da ograničen broj stanica može prepoznati veliki broj antigena, odnosno mikroorganizama. Po prepoznavanju antigena stanice prirođene imunosti aktiviraju mehanizme prirođene imunosti za njegovo odstranjivanje i informaciju prenose limfocitima T i B, stanicama stečene imunosti. Iz toga proizlazi da je važna prednost prirođene imunosti pred stečenom brzina odgovora.

Prirođena se imunost sastoji od staničnog i humoralnoga dijela. Stanični dio čine većina leukocita: neutrofili, eozinofili, bazofili, mastociti, makrofagi, dendritičke stanice i prirodno ubilačke (NK, engl. *natural killer*) stanice. Humoralni dio je raznolik i u njega između ostalih spadaju sustav komplementa, reaktanti akutne faze, interferoni i antimikrobni peptidi.

Antimikrobni peptidi (AMP) predstavljaju veliku skupinu peptida i čine važan i razgranat dio prirođene imunosti (120, 121). Prirođena imunost prva dolazi u dodir s mikrorganizmima i započinje imunološki odgovor, a AMP-i su jedan od inicijalnih mehanizama obrane. Postoje milijunima godina, posjeduju ih i beskralježnjaci i kralježnjaci, a danas za više od 2500 znamo građu i ulogu. AMP-i su po građi peptidi, polipeptidi i mali proteini. Većina ih ima manje od 50 aminokiselina, a najveći imaju oko 150 aminokiselina. Uglavnom ih kodira jedan gen, a mogu biti konstitutivni (stalno se luče, odnosno stalno su prisutni na nekom mjestu) ili inducibilni (luče se samo na poticaj). Većinu stvaraju i luče leukociti (neutrofili, monociti i makrofagi) i epitelne stanice (kože, dišnih putova, gastrointestinalnog i urogentalnoga trakta) (122-126). Uglavnom se luče u obliku prekursora, a potom djelovanjem proteaza prelaze u aktivni oblik s antimikrobnim (i ostalim)

djelovanjima. Različita mjesta proteolize na prekursoru mogu proizvesti peptide s različitim djelovanjem (127).

Antimikrobni peptidi inicijalno su prepoznati po njihovom djelovanju na bakterije i gljive, a kasnija su istraživanja pokazala da imaju sposobnost neutralizacije i inaktivacije velikoga broja patogenih mikroorganizama, uključujući i virusa. Ustanovljeno je i da sudjeluju u brojnim aspektima prirođenog i stečenog imunološkog odgovora kao što su upala, apoptoza i regulacija stečene imunosti. Imaju ulogu u cijeljenju tkiva, a iskazuju i protutumorski učinak (128-130). Neodgovarajuće lučenje pojedinog AMP-a ne samo da može remetiti obranu od infekcije, već može dovesti i do bolesti (131). Neki mikroorganizmi imaju mehanizme izbjegavanja imunološkog odgovora djelovanjem na AMP-e (132-135). S obzirom na njihove mnogobrojne učinke AMP-e se pokušava iskoristiti za antimikrobno liječenje, ali i za liječenje drugih bolesti i tumora (136, 137).

Koliko je ekspresija AMP-a složen proces i ovisan o različitim utjecajima zorno pokazuje istraživanje na žabama koje su proveli Mangoni i suradnici (138). Oni su pokazali da se tip i količina AMP-a na koži razlikuje između žaba koje su bile u sterilnim uvjetima i žaba iste vrste koje su bile izložene prirodnim uvjetima. Iz toga možemo zaključiti da količina i vrsta AMP-a na nekom mjestu u/na tijelu ne ovisi samo o genetskim uputama toga organizma, već i o izloženosti toga mjesta mikroorganizmima, a vjerojatno i drugim antigenima. Proces je naravno dvosmjeran, jer i AMP-i „odlučuju“ tko se od mikroorganizama može trajnije nastaniti. Iz toga proizlazi da je ono što zovemo mikrobiota rezultat složene interakcije između genetske predispozicije i utjecaja okoline.

Postoji više internetskih baza podataka koje prikupljaju podatke o antimikrobnim peptidima i čine svojevrsne registre AMP-a. Prema *The antimicrobial peptide database* (http://aps.unmc.edu/AP/), *online* bazi podataka koja od 2003. godine bilježi sve AMP-e za koje su građa i funkcija poznati, postoji 125 ljudskih AMP-a (139). Veličinom sežu od 5 aminokiselina (katepsin G) do 149 aminokiselina (RegIIIalpha), no oko polovice njih ima manje od 50 aminokiselina. Prvi je otkriven lizozim još davne 1922. godine, a svi ostali otkriveni su nakon 1985. godine (140).

Antimikrobni peptidi se prema ionskome naboju, sastavu aminokiselina i strukturi mogu podijeliti u više grupa, od kojih su nam za ovo istraživanje bitni defenzini i katelicidini pa će o njima i biti više rečeno (141).

1.2.1. DEFENZINI

Defenzini su velika obitelj antimikrobnih peptida prisutnih u ljudi i drugih sisavaca. Oni su kationske molekule koje sadrže šest cisteinskih ostataka povezanih s tri disulfidne veze. Prema smještaju cisteinskih ostataka dijele se na alfa, beta i theta-defenzine. U ljudi su otkriveni alfa i beta-defenzini. Iako čovjek posjeduje gene za theta-defenzine stop kodon sprečava sintezu odgovarajućih peptida. Neki se defenzini proizvode konstitutivno (ljudski alfa-defenzini i ljudski beta-defenzin 1) dok se drugi sintetiziraju kao odgovor na infekciju (ljudski beta-defenzini 2-4).

Od ljudskih defenzina prvi su otkriveni alfa-defenzini i to 1985. godine u krvi. Kako su otkriveni u granulama polimorfonukleara nazvani su ljudski neutrofilni peptidi (HNP, engl. *human neutrophil peptide*) (142). Tada su otkrivena tri (HNP1-3) s gotovo identičnim slijedom aminokiselina. Kasnije su otkrivena još tri ljudska alfa-defenzina: HNP4, HD-5 i HD-6 (143, 144). Ljudski alfa-defenzini imaju oko 30 aminokiselina i poprimaju strukturu beta-nabrane ploče. Ljudske alfa-defenzine HNP1 do 4 nalazimo u azurofilnim granulama neutrofilnih granulocita i odgovorni su za ubijanje fagocitiranih mikroorganizama. Na poticaj preko TLR-a oslobađaju se u ekstracelularni prostor degranulacijom u obliku zrelih peptida. HNP1 do 3 nalazimo i u eozinofilima, limfocitima B i NK-stanicama (145). Pokazano je da makrofagi mogu fagocitirati propadajuće neutrofile i na taj način doći do HNP-a koje koriste u endosomima (146).Panethove stanice tankoga crijeva i epitelne stanice urogenitalnoga trakta u žena sintetiziraju HD-5 i HD-6, a otpuštaju se nakon stanične aktivacije putem TLR-a (143, 144). Nakon otpuštanja proteolizom nastaju zreli peptidi. Zabilježeno je stvaranje HD-5 u epitelnim stanicama sluznice nosa i bronha, što pobuđuje pretpostavku da sudjeluju u obrani dišnih putova (147).

Prvi ljudski beta-defenzini (HBD) otkriveni su između 1995. i 2001. godine i redom su im pripisani brojevi od 1 do 4 (123, 148-150). Kasnije su otkriveni geni za druge beta-defenzine (HBD5, HBD6, HBD26-28, DEFB114 i DEFB118), za koje je pokazano da imaju antimikrobna svojstva, a nalaze se gotovo isključivo u epididimisu i testikularnom tkivu (151-155). Zadnji otkriveni ljudski beta-defenzini su DEFB126 i DEFB130, koji su slični HBD26, odnosno HBD3, a imaju antimikrobno djelovanje na bakterije, gljive i protozoe (156, 157). Humani beta-defenzini imaju nešto više aminokiselina od alfa-defenzina (oko 40), a poprimaju sličnu beta-nabranu strukturu (158). Spektar stanica koje luče ljudske beta-defenzine puno je raznolikiji nego za alfa-defenzine, no glavninu produciraju epitelne stanice. HBD1 nalazimo u epitelu izloženom okolišu ili flori mikroorganizama: pluća, mliječnih

žlijezda, žlijezda slinovnica, bubrega i prostate (148, 159). HBD2 je prisutan u epitelnim stanicama (kože, pluća, gastrointestinalnoga trakta, urogenitalnoga trakta i gušterače) i stanicama koštane srži. Ipak, najviše ga ima u plućima (160). To je neobično s obzirom da epitelne stanice traheje i bronha trebaju za jedan logaritam veću koncentraciju mikroorganizama za produkciju jednake količine HBD2 kao epitelne stanice nosne sluznice (161). HBD1 i HBD2 stvaraju i otpuštaju još i monociti, makrofagi te dendritičke stanice (126). HBD3 je također nađen u epitelnim stanicama, ali i u stanicama kože, srca, jetre i posteljice (162). Prisutnost HBD4 je dokazana u epitelu pluća i želuca, neutrofilima, testisu i epididimisu (163, 164). HBD1 je konstitutivan u epitelnim stanicama i monocitima, a lipopolisaharid i peptidoglikan povećavaju njegovo stvaranje (126, 165, 166). HBD4 je također konstitutivan u epitelnim stanicama, a ostali ljudski beta-defenzini su inducibilni. Produkciju HDB2 između ostalih povećavaju bakterije, lipopolisaharid, IFN-γ, TNF-α, IL-1β i IL-22, a čini se da najveći učinak ima IL-17 (131, 135, 167, 168). IFN-γ, TNF-α i IL-1β također potiču stvaranje HBD1 i HBD3 (169, 170). Virus humane imunodeficijencije (HIV, engl. *human immunodeficiency virus*) potiče stvaranje HBD2 i HBD3 (171). Lipopolisaharid potiče i produkciju HBD4 (163). Kortikosteroidi smanjuju produkciju HBD3, ali ne i HBD1 i HBD2 u kulturi ljudskih epitelnih stanica (172). Humani beta-defenzini se većinom oslobađaju u zrelom obliku.

1.2.2. KATELICIDINI

Katelicidini su jedna od obitelji antimikrobnih peptida. Sintetiziraju se u obliku prekursora koji imaju sačuvanu N-terminalnu domenu s oko sto aminokiselina i C-terminalnu domenu koja se izrazito razlikuje između vrsta. Proteolizom se oslobađa C-terminalni kraj i tako nastaje aktivni oblik peptida. U ljudi je dokazan samo jedan katelicidinski peptid, ljudski kationski antimikrobni peptid (hCAP, engl. human cationic antimicrobial peptide) 18, od kojeg proteolizom nastaje aktivni oblik nazvan LL-37 (173, 174). Sadrži 37 aminokiselina (*nomen est omen*) i linearne je strukture jer ne sadrži cistein. U hidrofilnom okruženju ima strukturu zavojnice i promjenjiva je oblika, a u hidrofobnom okružju ima strukturu alfa-uzvojnice. Ljudski katelicidin može se cijepati i na druge načine pa osim LL-37 nastaju i drugi polipeptidi koji imaju drugačiji spektar aktivnosti (127). Na taj način od jednoga gena dobijemo više različitih peptida s različitim učincima. Katelicidin nalazimo u leukocitima (neutrofili, monociti, NK stanice, limfociti T i B) i epitelnim stanicama kože, dišnih putova,

gastrointestinalnoga trakta i testisa (173, 175, 176). U granulocitima se nalazi u specifičnim granulama u obliku prekursora. LL-37 je dokazan i u stanicama kože novorođenčeta, ali i u verniksu (177). Infekcija i upalni podražaji potiču stvaranje LL-37, kao i bakterije, TNF-α, IL-1α i IL-6 te leukotrien B4 (178-180). Vitamin D važan je u regulaciji stvaranja LL-37. Epitelne stanice dišnih putova pretvaraju vitamin D u aktivni metabolit, koji pojačava ekspresiju gena za LL-37 (181).

1.2.3. ULOGA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU

Povezanost između prirođene i stečene imunosti dugo je poznata, a s vremenom otkrivamo sve više mehanizama njihove interakcije. Antimikrobni peptidi, kao dio prirođene imunosti, prvi dolaze u doticaj s mikroorganizmom, što uglavnom povećava njihovu produkciju. Oni mogu imati direktno antimikrobno djelovanje, što je kasnije detaljno opisano, i/ili potaknuti imunološki odgovor. Više je mehanizma kojima AMP-i utječu na druge aspekte prirođene imunosti. Na stečenu imunost mogu djelovati direktno (npr. privlačenjem limfocita T) ili indirektno, aktivirajući druge mehanizme prirođene imunosti koji potiču stečenu imunost (npr. aktivacijom stanica koje prezentiraju antigen). Ovdje navodim neke od načina kojima defenzini utječu na prirođenu i stečenu imunost.

Brojni su primjeri kemotaksije i aktivacije leukocita posredovane AMP-ima. Koncentracije AMP-a potrebne za kemotaksiju značajno su niže od onih potrebnih za antimikrobni učinak. HNP1, HNP2 i HNP3 stimuliraju otpuštanje IL-8 iz epitelnih stanica dišnih putova i na taj način potiču kemotaksiju neutrofila (182). HNP1 i HNP2 privlače limfocite T i monocite (183, 184). HBD1 i HBD2 putem kemokinskoga receptora (CCR, engl. *chemokine receptor*) 6 privlače ljudske nezrele dendritičke stanice i memorijske limfocite T (185). Također, HBD2 u miša putem TLR-4 potiče sazrijevanje dendritičkih stanica i tako pojačava imunološki odgovor (186). HNP1 i HBD1 potiču aktivaciju i sazrijevanje dendritičkih stanica i stvaranje proupalnih citokina (187). HBD3 aktivira stanice koje prezentiraju antigen putem TLR-1 i TLR-2 (188).HBD2 i HBD3 potiču kemotaksiju preko CCR2, koji se nalazi na površini monocita, makrofaga i neutrofila (189). LL-37 djeluje kemotaktički na dendritičke stanice, monocite i neutrofile, utječe na ekspresiju gena u makrofagima i potiče izlučivanje histamina iz mastocita (175, 190, 191). Kao i ljudski alfa-defenzini, potiče lučenje IL-8 koji potom privlači neutrofile (192).

Spoznali smo da AMP-i imaju utjecaj na apoptozu leukocita. Tako mišji beta-defenzini mogu dovesti do smrti stanica koje prezentiraju antigen nakon tri dana izloženosti, a čini se da i HBD3 ima tu sposobnost (193). S druge strane, HNP1 i HBD3 inhibicijom kaspaze 3 suprimiraju apoptozu neutrofila, što produljuje imunološki odgovor (194, 195).

AMP-i utječu na druge efektore prirođene imunosti. Primjer je aktivacija klasičnoga puta komplementa koju HNP1, HNP2 i HNP3 ostvaruju vezanjem za C1q (196).

Kim i suradnici su pokazali da HBD2 pojačava odgovor na antigen i putem prirođene imunosti (veća količina interferona i citokina TNF-α, IL-1β, IL-6 i drugih) i putem stečene (veća količina specifičnih protutijela) (197). To je odličan primjer u kojem AMP potiče obje sastavnice imunološkog odgovora.

Međutim, ima dokaza i da AMP-i imaju suprotan učinak, dakle da suprimiraju imunološki odgovor. Naveden je primjer mišjih beta-defenzina koji dovode do apoptoze stanica koje prezentiraju antigen. Pretpostavlja se da stalna prisutnost HBD1 na površini epitela smanjuje imunološki odgovor na mikroorganizme koji čine fiziološku floru, ali posljedično i na novopridošle mikroroganizme kojima je epitel izložen (198). Tome u prilog govori činjenica da HBD3 može smanjiti produkciju proupalnih citokina u ljudskim i mišjim makrofagima kao odgovor na lipopolisaharid (199). Količina HBD3 kojom se to ostvaruje bitno je manja od one koja aktivira makrofage putem TLR i one koja neutralizira HIV. LL-37 u mišjem modelu sprečava apoptozu endotelnih stanica malih krvnih žila kao i apoptozu hepatocita i endotelnih stanica u jetri uzrokovanu lipopolisaharidom (200). Na taj način LL-37 štiti miša od endotoksičnoga šoka.

Iz svega navedenog jasno je da je uloga AMP-a u imunološkom odgovoru složena, ali i da nemaju samo stimulativni učinak, već i suprimirajući, odnosno stabilizirajući. Pretpostavljam da dobra ravnoteža između ta dva učinka dovodi do poželjnog odgovora na infekciju – odstranjenje mikroorganizma uz najmanju moguću upalnu reakciju (i oštećenje tkiva), pogotovo na primarno sterilnim mjestima. Na mjestima koja su stalno naseljena mikroorganizmima, kao što su koža, sluznica gastrointestinalnoga trakta i gornjih dišnih putova AMP-i vjerojatno imaju važnu ulogu u održavanju fiziološke flore. Moguće je i da upravo AMP-i određuju našu mikrobiotu na pojedinim lokacijama pa i na taj način utječu na zdravlje pojedinca.

1.2.4. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE ANTIMIKROBNIH PEPTIDA

Kao što sam njihov naziv sugerira, AMP-i su inicijalno prepoznati upravo po svome antimikrobnom djelovanju, a tek smo kasnije spoznali njihovu ulogu u modulaciji imunološkog odgovora. To je neobično s obzirom da su koncentracije u kojima AMP-i ostvaruju antimikrobni učinak značajno više od onih potrebnih za imunomodulaciju. Prvo je otkriven njihov antimikrobni učinak na bakterije i gljive, a potom na viruse i parazite. Većina poznatih ljudskih AMP-a može zaustaviti razmnožavanje bakterija (bakteriostatski učinak), a njih oko polovice iskazuje i fungicidni učinak. Za sada samo za manji broj ljudskih AMP-a znamo da djeluju na viruse ili parazite. Ipak, popis mikroorganizama na koje AMP-i djeluju stalno se proširuje. Također, s vremenom otkrivamo nove mehanizme kojima sprečavaju razmnožavanje ili ubijaju pojedine mikroorganizme kao i mehanizme kojima se mikroorganizmi štite od djelovanja AMP-a. Krajnji cilj istraživanja djelovanja AMP-a je njihova primjena u liječenju infektivnih bolesti, a posebno onih uzrokovanih virusima i multiplorezistentnim bakterijama, što bi bio veliki napredak za medicinu.

HNP1 djeluje na brojne gram-negativne i gram-pozitivne bakterije uključujući i neke mikobakterije. Osim toga ima sposobnost inhibicije toksina antraksa i difterije te drugih bakterijskih toksina (201). Također djeluje i na gljive i na viruse, a dokazana je i njegova učinkovitost protiv parazita *Leishmania major* (202). HNP2, HNP3 i HNP4 antimikrobno djelovanje iskazuju na gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama, virusima i gljivama. HNP3 značajno smanjuje stvaranje pora u neutrofilima uzrokovano Panton-Valentine leukocidinom koji producira *Staphylococcus aureus* (203). Od navedena četiri ljudska alfa-defenzina HNP4 najučinkovitije sprečava infekciju ljudskih mononuklearnih stanica HIV-om (204).

Za nativni HBD1 se znalo da ima učinak na gram-negativne bakterije, no ne i na gram-pozitivne. Novije istraživanje pokazalo je da nakon redukcije disulfidnih veza HBD1 postaje baktericidan i za gram-negativne i za gram-pozitivne bakterije oštećujući staničnu stijenku (205). Također, nakon redukcije djeluje na anaerobne bakterije i gljivu *Candida albicans* (206). HBD2 ima baktericidno djelovanje na gram-negativne bakterije, a bakteriostatsko na *Staphylococcus aureus*. Pokazuje sinergističko djelovanje s LL-37 kojim ubijaju bakteriju *Streptococcus agalactiae* (207). HBD2 je učinkovit i protiv gljive *Candida albicans*. HBD3 ima široki antimikrobni spektar – djeluje i na gram-pozitivne i na gram-negativne bakterije, na viruse i na gljive. Kao i HBD2, pokazuje sinergizam s LL-37, no na *Staphylococcus aureus* (208). HBD4 ima antimikrobno djelovanje na bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* te *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae* (163).

LL-37 ima široki antimikrobni spektar, prema sadašnjim spoznajama najširi među svim ljudskim AMP-ima. Djeluje na veliki broj gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija uključujući mikobakterije i treponeme te na gljive i parazite (209). Poznat je njegov učinak na više vrsta virusa: herpes simpleks virus, virus gripe, RSV, ljudski adenovirus, rinovirus i druge. (210, 211).

Osim navedenih djelovanja na mikroorganizme AMP-i posjeduju i antitumorsko djelovanje. Ono je za sada dokazano za HNP1-3, HBD1, LL-37 i granulizin (212). Multifunkcionalnost djelovanja AMP-a pokazuje i njihov povoljan učinak na regeneraciju i cijeljenje tkiva (213).

1.2.5. ANTIMIKROBNI PEPTIDI I VIRUSI

Od svih antimikrobnih djelovanja AMP-a antivirusno je otkriveno među zadnjima. To nije posljedica manje važnosti i manjega spektra antivirusnoga djelovanja, već potrebe za složenijim metodama dokazivanja. Prvotno je ustanovljen direktan učinak defenzina na viruse s ovojnicom (u koje spada i RSV), a kasnije smo spoznali da se defenzini i drugi AMP-i mogu vezati te iskazivati antivirusni učinak i na viruse bez ovojnice (214, 215). Naravno, osim direktnoga antivirusnoga djelovanja AMP-i na viruse djeluju i indirektno, privlačenjem stanica imunološkoga sustava na mjesto infekcije i posljedičnim pojačanjem imunološkog odgovora.

Antivirusni učinak dokazan je za sve ljudske alfa-defenzine i dio beta-defenzina (HBD1, HBD2, HBD3), za LL-37 i za druge AMP-e koji nisu predmet ovog istraživanja. Svi ljudski alfa-defenzini imaju učinak na herpes simpleks viruse i virus gripe, a HNP1-4 na HIV i humane papiloma viruse (130, 216-218). HNP1 pokazuje antivirusno djelovanje još na citomegalovirus i adenovirus. HBD1, HBD2 i HBD3 djeluju na virus gripe. HBD2 i HBD3 kao i LL-37 inhibiraju HIV (219, 220). HBD2 djeluje još na RSV, virus parainfluence (PIV) tip 3 i varicella-zoster virus, a HBD3 na herpes simpleks virus (221). Osim toga, HBD3 sprečava ulaz enterovirusa u stanicu (222). Za HBD4 nema podataka o antivirusnom djelovanju. LL-37 ima antivirusni učinak na RSV, HIV, varicela-zoster virus, herpes simpleks virus, virus gripe i adenovirus (223-227).

Antivirusni mehanizmi AMP-a raznoliki su i često međusobno isprepleteni (228-231). Mogu se odvijati izvan i unutar stanice. Uključuju učinak na gotovo sve faze virusne

replikacije: vezanje virusa za stanicu, fuziju virusne sa staničnom membranom, ulazak virusa u stanicu, umnožavanje nukleinske kiseline virusa i sintezu virusnih proteina.

Neki AMP-i učinak na viruse baziraju na sprečavanju ulaska virusa u stanicu (232). HBD2 oštećuje lipidnu ovojnicu RSV-a i tako sprečava prianjanje virusa za stanicu (221). Smatra se da sličnim mehanizmom HBD2 i HBD3 inaktiviraju HIV, a HNP1 herpes simpleks virus (218, 233). HBD2 i HBD3 se vežu za HIV i tako ga onemogućavaju da zarazi stanicu (219). Defenzini vezani za virus mogu se međusobno povezati i tako dovesti do agregacije virusa. Taj je učinak dokazan za HNP1 i HNP2 na virus gripe i za HD5 na ljudski adenovirus, no nije jasno je li to glavni način inaktivacije virusa (228, 234, 235). Pretpostavlja se da je antivirusni učinak direktna posljedica neutralizacije elektrostatskoga naboja virusne kapside (235). Vezanje za adhezijske proteine virusa onemogućava adherenciju virusa za stanicu, što je učinak koji ljudski alfa-defenzini ostvaruju na herpes simpleks viruse i HIV (236, 237). Virusi s ovojnicom posjeduju fuzijski protein, koji omogućava spajanje virusne i lipidne ovojnice napadnute stanice. Neki AMP-i to ometaju blokiranjem fuzijskog proteina, kao što HNP1 blokira HIV (238). S druge strane, HBD3 se veže za glikoprotein koji se nalazi na površini stanice domaćina i tako sprečava fuziju virusa gripe sa stanicom (239).

Nakon ulaska virusa u stanicu antimikrobni peptidi mogu različitim mehanizmima sprečavati umnožavanje virusa. Neki utječu na stanične molekule koje sudjeluju u prenošenju signala unutar stanice i tako blokiraju umnožavanje virusa u različitim stadijima. Primjer je HNP1 koji inhibicijom aktivnosti protein kinaze C blokira replikaciju HIV-a u stanici (216). HBD2 vezanjem za CCR6 potiče ekspresiju unutarstaničnih antivirusnih proteina i negativno regulira virusnu replikaciju (240). Ustanovljeno je da se alfa-defenzini mogu nakupljati unutar stanice i blokirati umnožavanje herpes simpleks virusa (236). Vezanje HD5 za kapsidu ljudskog adenovirusa čini je otpornijom i na taj način sprečava bijeg virusne čestice iz endosoma nakon ulaska u stanicu i time umnožavanje virusa (241).

Osim direktnog, antimikrobni peptidi imaju i indirektno djelovanje na virus, preko drugih stanica imunološkoga sustava regulirajući njihovu migraciju, funkciju te proizvodnju drugih medijatora upalnog odgovora. Ovdje navodim mehanizme s dokazanim učinkom AMP-a na pojedini virus. HNP1, HNP2 i HD5 stimuliraju neutrofile da u većoj mjeri fagocitiraju virus gripe, vjerojatno agregacijom virusa gripe (228). HNP1 i HNP2 u makrofagima povećavaju stvaranje kemokina koji blokiraju HIV (242). HBD2 i HBD3 imaju adjuvantni učinak na humoralni odgovor na HIV u mišjem modelu, a mišji beta-defenzin 2 i na humoralni odgovor kao i na stvaranje CD8+ limfocita T (243, 244).

Ostaje upitno jesu li brojni navedeni mehanizmi specifični za virus ili su zajednički za više virusa, odnosno vezani uz neku virusnu osobinu ili korak u umnožavanju. Za pretpostaviti je da su neki specifični, kao vezanje za virusni fuzijski protein, dok inhibicija protein kinaze vjerojatno djeluje na sve viruse koji je trebaju za umnožavanje. Izvjesno je da ćemo s vremenom otkriti dodatne mehanizme antivirusnoga djelovanja AMP-a, s nadom da će neki od tih mehanizama biti iskorišteni za liječenje virusnih bolesti (245).

Osim brojnih primjera antivirusnoga djelovanja AMP-a, ima i suprotnih, ali malobrojnih primjera u kojima AMP-i pogoduju virusima. Primjer je da HD5 i HD6 povećavaju infektivnost HIV-a potičući vezanje virusnih čestica za stanice (246).

Ne samo da AMP-i imaju djelovanje na viruse, i virusi djeluju na AMP-e. Mnogi virusi potiču stvaranje AMP-a, bez obzira djeluje li potaknuti AMP na taj virus. S druge strane, neki virusi imaju mehanizme kojima smanjuju produkciju AMP-a.

Produkcija antimikrobnih peptida može biti potaknuta virusima. To posebno vrijedi za beta-defenzine koji su inducibilni, a manje za alfa-defenzine koji su konstitutivni. Ljudski rinovirus potiče proizvodnju HBD2 i HBD3 u bronhalnim epitelnim stanicama iako nema znakova da HBD2 direktno djeluje na rinovirus (247). U kulturi ljudskih epitelnih stanica infekcija i umnožavanje RSV-a potiče sintezu TNF-α, koji povratnom spregom pozitivno regulira produkciju HBD2 (221). U ovoj situaciji, međutim, HBD2 ima utjecaj na RSV jer oštećuje njegovu lipidnu ovojnicu te smanjuje količinu infektivnih virusa. To je pokazano i na mišjem modelu kad je RSV poticao produkciju mišjega beta-defenzina 4, homologa HBD2 (221). Infekcija epitelnih stanica HIV-om povećava stvaranje HBD2 i HBD3, koji imaju sposobnosti neutralizacije HIV-a, ali ne i HBD1, koji nema učinka na HIV (219). HBD3 na poticaj poliinozinske-policitidinske kiseline, surogata za virusnu dvolančanu RNK, putem TLR3 povećava produkciju IFN-β u ljudskim i mišjim stanicama te na taj način utječe na virusnu replikaciju (248). Fina regulacija ekspresije i interaktivne funkcije pojedinih AMP-a ovisi i o vrsti receptora za prepoznavanje obrazaca pa je zapaženo da virus gripe i herpes simpleks virus potiču lučenje ljudskih beta-defenzina u monocitima izraženije nego lipopolisaharid (249). Osim toga, i kinetika proizvodnje pojedinih AMP-a je različita: produkcija HBD1 bila je vidljiva brzo nakon kontakta, HBD2 kasnije, a HBD3 se nije stvarao.

Važnost pojedinih AMP-a naglašena je smanjenim antimikrobnim učinkom kao posljedicom supresije njihove proizvodnje uslijed virusne infekcije. Herpes simpleks virus *in vitro* smanjuje stvaranje HBD1 u stanicama epitela dišnih putova i stanicama gingive (249). Također, virus gripe suprimira bazalnu sekreciju HBD1 u ljudskim stanicama bronhalnog

epitela (134). RSV u činčila smanjuje produkciju beta-defenzina 1 (najsličniji HBD3) u dišnim putovima što potencijalno održava povoljne uvjete za virusnu replikaciju (250). Učinak može biti i indirektan, putem smanjene produkcije medijatora upale koji mogu povećati koncentracije AMP-a. Na mišjem modelu i *in vitro* na kulturi ljudskih monocita pokazano je da G-protein RSV-a smanjuje stvaranje citokina IL-1β, IL-6 i IL-10 nakon izlaganja RSV-u i lipopolisaharidu (12). Dodatno, nestrukturni protein 1 RSV-a djelovanjem na signalne proteine smanjuje produkciju interferona tip I u kulturi ljudskih alveolarnih epitelnih stanica (251).U kojoj mjeri i na koji način navedeni imunosupresivni mehanizmi interaktivno sudjeluju u kvalitativnoj i kvantitativnoj regulaciji proizvodnje AMP-a je nepoznanica. Utjecaj virusa na stvaranje AMP-a ovisi o tipu stanice, ali i nekim drugim, za sada nedovoljno definiranim čimbenicima.

Na kraju napominjem da je velika većina podataka o antivirusnom učinku AMP-a dobivena istraživanjima provedenim *in vitro* na kulturi stanica. Za sada nema jednoznačnih dokaza o učinkovitosti AMP-a na virusnu infekciju *in vivo*, već zaključke donosimo na temelju istraživanja koja su mjerila koncentracije AMP-a u biološkim uzorcima tijekom virusnih infekcija.

1.2.6. ANTIMIKROBNI PEPTIDI I RESPIRATORNI SINCICIJSKI VIRUS

Spoznaje o ulozi AMP-a u infekciji RSV-om su oskudne. U trenutku pisanja ovoga rada u literaturi sam samo za dva ljudska AMP-a našao podatak da inhibiraju RSV: HBD2 i LL-37.

Bose i suradnici su studijom na kulturi stanica dokazali da TNF-α i IL-1β aktivacijom čimbenika transkripcije NF-κB ljudsku epitelnu stanicu dovode u antivirusno stanje neovisno o interferonu (252). Usporedili su infekciju ljudskim PIV-3 i RSV-om pa ustanovili da PIV-3 aktivira NF-κB na početku infekcije, a RSV kasno u tijeku infekcije kao i da je kod RSV-a aktivacija ovisna o replikaciji virusa. Blokada NF-κB signalnoga puta značajno je povećala težinu infekcije PIV-3 – povećalo se umnožavanje virusa i uočeno je veće oštećenje stanica. Suprotno, rana aktivacija čimbenika NF-κB primjenom citokina TNF-α i IL-1β značajno je smanjila replikaciju RSV-a. Kota i suradnici su proučavanjem aktivacije čimbenika transkripcije NF-κB na kulturi ljudskih epitelnih stanica pluća zaraženih RSV-om pokazali da je HBD2 topivi čimbenik odgovoran za antivirusnu aktivnost (221). Infekcija RSV-om potiče stanicu na otpuštanje TNF-α, koji parakrinom aktivacijom čimbenika NF-κB potiče sintezu

HBD2. Antivirusno djelovanje HBD2 ostvaruje sprečavanjem ulaska virusa u stanicu, vjerojatno destabilizacijom virusne lipidne ovojnice. Štoviše, izostanak sekrecije HBD2 značajno smanjuje antivirusno djelovanje TNF-α posredstvom epitelnih stanica. Potom su *in vivo* na mišjem modelu pokazali da infekcija RSV-om potiče značajnu produkciju mišjeg beta-defenzina 4 (odgovara HBD2), najizraženije u prva dva dana nakon infekcije. Navedeni rezultati dokazali su važnu ulogu u prirođenom imunološkom odgovoru čimbenika transkripcije NF-κB koji je neophodan za sintezu TNF-α i HBD2 s antivirusnim djelovanjem, ali i drugih citokina koji pojačanjem imunološkog odgovora pridonose obrani, ali i uzrokuju veće oštećenje tkiva (253).

LL-37 u *in vitro* modelu infekcije RSV-om (kultura ljudskih epitelnih stanica) sprečava smrt stanica izazvanu virusom, smanjuje stvaranje novih virusa i širenje infekcije na okolne stanice (223). Međutim, ovaj učinak vidi se samo ako se LL-37 primjeni prije ili istovremeno s infekcijom, a gubi se ako se primijeni nakon infekcije. Autori zaključuju da je učinak vjerojatno kombinacija direktnog antivirusnoga djelovanja LL-37 kao i učinka na stanicu koju čini otpornijom na infekciju RSV-om. Daljnjim istraživanjima pokazali su da se LL-37 veže za RSV te da oštećuje lipidnu membranu virusa i smanjuje vezanje virusa za stanicu (210). Osim toga na mišjem su modelu pokazali da je LL-37 učinkovit u ublažavanju kliničke slike infekcije RSV-om ako se terapijski daje svakodnevno nakon infekcije ili ako se profilaktički primijeni jedan sat prije ili istovremeno s izlaganjem RSV-u. Napravili su i istraživanje na zdravim dobrovoljcima koje su inficirali RSV-om i dokazali da su koncentracije LL-37 u nazalnom ispirku u trenutku izlaganja virusu bile više u ispitanika u kojih nije došlo do infekcije. Zanimljivo, nije bilo razlike u koncentraciji LL-37 u krvi niti u BAL-u uzetom 2 tjedna prije izlaganja RSV-u. To je u suprotnosti s rezultatima velike studije Mansbacha i suradnika koja je pokazala povezanost između niže serumske koncentracije LL-37 i teže kliničke slike bronhiolitisa (254). Međutim, oni nisu određivali koncentracije u dišnim putovima pa rezultate ne možemo adekvatno usporediti. Smatrajući da kultura stanica Hep2 korištena u navedenim istraživanjima nije model koji može realno reproducirati zbivanja u ljudskim epitelnim stanicama *in vivo*, Harcourt i suradnici ispitali su učinak LL-37 na RSV na kulturi primarnih epitelnih stanica koje su bazalno u kontaktu s tekućim medijem, a apikalno sa zrakom (255). Dobiveni rezultati su potvrdili da je profilaktička primjena LL-37 značajno učinkovitija nego terapijska u inhibiciji umnožavanja RSV-a što je povezano sa značajno nižim koncentracijama citokina i kemokina.

Obzirom da antivirusna učinkovitost utvrđena *in vitro* ovisi o koncentraciji, nepoznato je postižu li se u organizmu dovoljne koncentracije AMP-a za ostvarivanje navedenih

učinaka. S druge strane, sam RSV može reducirati stvaranje defenzina i na taj način si omogućiti povoljnije uvjete za replikaciju, ali i olakšati kolonizaciju *Haemophilus influenzae*, važnim uzročnikom sekundarnih bakterijskih infekcija tijekom bolesti uzrokovanih RSV-om (250).

1.2.7. ANTIMIKROBNI PEPTIDI U DIŠNIM PUTOVIMA

Dišni putovi su kontinuirano izloženi mikroorganizmima i drugim antigenima iz okoliša, a njihova je površina izrazito velika. Dok su gornji dišni putovi stalno ili privremeno boravište brojnih mikroorganizama, različiti mehanizmi održavaju donje dišne putove sterilnima. Naseljavanje i razmnožavanje mikroorganizama u donjim dišnim putovima uz imunološki odgovor organizma dovodi do bolesti koje mogu biti težega tijeka pa čak i životno ugroziti domaćina, kao što vidimo na primjeru bronhiolitisa. Upalni odgovor može utjecati na izmjenu plinova, ali i trajno oštetiti strukturu dišnih putova. U male djece već i malo smanjenje promjera dišnih putova uslijed upalnih promjena u stijenci značajno smanjuje protok zraka. Upalno zbivanje u području alveola remeti izmjenu plinova, a ukoliko zahvati veću površinu uzrokuje respiratornu insuficijenciju. Iz navedenoga je jasna važnost obrambenih sustava koji trebaju štititi donje dišne putove uz što manji upalni odgovor. Osim mehaničkih načina (dlačice u nosu, turbulencija zraka, epiglotis, refleksi kihanja i kašlja) glavnu ulogu ima prirođena imunost. Antimikrobni peptidi važan su dio toga sustava.

Antimikrobne peptide u dišnim putovima produciraju epitelne stanice i leukociti koji obitavaju ili su privučeni u dišne putove. Neki autori smatraju da u tome puno veću ulogu imaju prebivajući leukociti (256). U ljudi epitelne stanice dišnih putova luče beta-defenzine 1 do 5 i LL-37. Leukociti su izvor HNP1-4, HDB1 i HDB2, kao i LL-37. HBD1, HBD2 i LL-37 nađeni su u alveolarnim makrofagima, kao i limfocitima u lamini propriji velikih dišnih putova i u alveolama (257).

Pretpostavljeni model imunološkog odgovora u dišnim putovima je da receptori za prepoznavanje obrazaca na površini i u unutrašnjosti epitelnih stanica dišnih putova prepoznaju mikroorganizme, odnosno molekularne obrasce patogena. Potom poticanjem transkripcije gena, poglavito aktivacijom NF-κB, utječu na lučenje citokina (npr. TNF-α, IL-6 i IL-8). Oni imaju autokrini i parakrini učinak kojim dovode do produkcije brojnih medijatora upale kao i ekspresije adhezijskih molekula (258). Jedna od posljedica je aktivacija prirođenog imunološkoga sustava (259). Neki mikroorganizmi, ali i citokini mogu utjecati na

izlaganje TLR-a na površini stanica i tako modificirati imunološki odgovor. Unutarstanični receptori koji prepoznaju antigene i u citoplazmi važni su za obradu od unutarstaničnih patogena (259). Neki od tih receptora u citoplazmi prepoznaju dvolančanu virusnu RNK nastalu tijekom umnožavanja virusa u stanici (260). Produkciju AMP-a može potaknuti sam mikroorganizam, također putem TLR-a i drugih receptora, ili stvoreni citokini (261, 262).

Stvoreni AMP-i djeluju na više načina. Većina ima direktni antimikrobni učinak te na taj način sudjeluje u inhibiciji i/ili neutralizaciji mikroorganizama u dišnim putovima. Osim toga, oni potiču oslobađanje citokina i kemokina koji djeluju kemotaktički na leukocite te izazivaju upalni odgovor. U kaskadnoj reakciji upalnoga procesa AMP-i imaju kemotaktički učinak na stanice prirođene i stečene imunosti. Stečena imunost tako posredstvom AMP-a može biti aktivirana na dva načina – direktnim kemotaktičkim djelovanjem AMP-a (kemotaksija limfocita T i B) te indirektno aktiviranjem stanica koje prezentiraju antigen.

Navodim primjere za pojedine AMP-e. To su naravno samo skice prema onome što je do sada dokazano za dišne putove, a svi su ti procesi međusobno povezani.

HBD2 se otpušta na poticaj lipopolisaharida putem TLR4 i drugih receptora kao i na poticaj RSV-a i rinovirusa (221, 263, 264). Bakterije i TNF-α potiču stvaranje HBD3 u epitelnim stanicama traheje (149). Humani beta-defenzini privlače nezrele dendritičke stanice i limfocite T putem kemokinskih receptora, a potom putem TLR-a aktiviraju dendritičke stanice i stanice koje prezentiraju antigen (186, 188). LL-37 privlači neutrofile, monocite i limfocite T, a u monocitima potiče stvaranje IL-10 i kemokina (265). Pridošli neutrofili i mononuklearne fagocitne stanice otpuštaju alfa-defenzine i LL-37, ali i djeluju na imunološki odgovor interakcijom s epitelnim stanicama. HNP1-3 i LL-37 djeluju kemotaktički na neutrofile direktno, ali i indirektno poticanjem epitelnih stanica na izlučivanje IL-8.

Sve navedeno ima direktni učinak na mikroorganizme, ali i dovodi do nakupljanja i aktivacije stanica koje prezentiraju antigen. Time se fagocitira i potom prezentira veća količina antigena. Posljedica je klonalna ekspanzija limfocita T i B te produkcija protutijela specifičnih za taj antigen, dakle aktivacija stečene imunosti. Svi ti procesi za cilj imaju odstranjenje patogena.

Ovaj slijed događaja prikazuje neke aspekte suradnje prirođene i stečene imunosti. Prvo AMP-i kao dio prirođene imunosti aktiviraju stečenu imunost – direktno, kemotaksijom limfocita, i indirektno, kemotaksijom i aktivacijom stanica koje prezentiraju antigen. Kada se stečena imunost aktivira suradnja se nastavlja, na primjer fagocitozom mikroorganizama uz pomoć protutijela.

1.3. SVRHA RADA

Cilj istraživanja je ispitati ulogu mehanizama prirođene imunosti posredovanih AMP-ima u infekciji RSV-om u male djece. Važnost pojedinih AMP-a djelomično je analizirana u animalnim modelima i na odraslim ispitanicima, dok je većina nalaza temeljena na *in vitro* pokusima. Bolje razumijevanje uloge AMP-a u infekciji donjih dišnih putova uzrokovanoj RSV-om mjerenjem koncentracija izabranih alfa i beta-defenzina te LL-37 u BAL-ima inficirane djece i zdravih kontrola moglo bi pružiti poveznice s patogenezom. Štoviše, rezultati istraživanja mogli bi osigurati temelje za nove smjernice za liječenje ili prevenciju infekcije RSV-om.

Svrha je istraživanja ispitati koncentracije antimikrobnih peptida (HNP1-3, HBD1, HBD2, HBD4 i LL-37) i citokina (TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-33, IL-35, IL-37, IFN-γ, TGF-β1) u donjim dišnim putovima djece mlađe od sedam godina s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om , usporediti ih s koncentracijama u donjim dišnim putovima zdrave djece te odrediti poveznice između koncentracija pojedinih AMP-a i citokina. Također, usporednom analizom smo tražili povezanost parametara težine kliničke slike i koncentracija antimikrobnih peptida te citokina u donjim dišnim putovima oboljele djece.

2. HIPOTEZA

Koncentracija antimikrobnih peptida (humanih defenzina HNP1-3, HBD1, HBD2 i HBD4 te katelicidina) u donjim dišnim putovima povišena je u djece oboljele od infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om.

Koncentracija antimikrobnih peptida (humanih defenzina HNP1-3, HBD1, HBD2 i HBD4 te katelicidina) u BAL-u djece oboljele od infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om korelira s koncentracijama proupalnih citokina u BAL-u.

Povišene koncentracije antimikrobnih peptida u BAL-u djece oboljele od infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om koreliraju s težinom kliničke slike. To ukazuje da AMP-i pojačavaju prirođeni i stečeni imunološki odgovor i čine kliničku sliku infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om u djece težom.

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJ

Odrediti ulogu antimikrobnih peptida (humanih defenzina HNP1-3, HBD1, HBD2 i HBD4 te katelicidina) u imunopatogenezi infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om i ispitati njihovu povezanost s određenim citokinima (TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-33, IL-35, IL-37, IFN-γ, TGF-β1).

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

1. istražiti kliničke i laboratorijske osobitosti bolesti u djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom respiratornim sincicijskim virusom.

2. odrediti koncentracije AMP-a (humanih defenzina HNP1-3, HBD1, HBD2 i HBD4 te katelicidina LL-37) i citokina TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-33, IL-35, IL-37, IFN-γ i TGF-β1 u uzorcima bronhoalveolarnoga ispirka djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om i zdrave djece te ih usporediti.

3. ustanoviti postoji li korelacija između koncentracija pojedinih ispitanih AMP-a i citokina u BAL-u.

4. ispitati ovise li težina kliničke slike i laboratorijski nalazi o koncentracijama navedenih AMP-a i citokina.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno u Klinici za infektivne bolesti „Dr Fran Mihaljević“ u Zagrebu (KZIB) i u Kliničkom bolničkom centru „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu u periodu od 1.1.2009. godine do 1.7.2013. godine. Obrada uzoraka BAL-a učinjena je u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu. Ovo je istraživanje dio znanstveno-istraživačkih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske: "Mehanizmi urođene imunosti u infekciji respiracijskim sincicijskim virusom (RSV)" (021-0212432-2439) i „Nove metode u dijagnostici akutnih nebakterijskih upala SŽS-a u djece“ (108-0000000-3485). Istraživanje su odobrila Etička povjerenstva obje ustanove kao i Etičko povjerenstvo Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prije uključivanja u istraživanje roditelj ili skrbnik djeteta bio je upoznat sa ciljem istraživanja i predviđenim postupcima te je potpisao pristanak informiranoga roditelja/skrbnika.

4.1. ISPITANICI

U istraživanje je uključeno 21 dijete s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om koja su zadovoljila kriterije za uključivanje u studiju i 9 zdrave djece.

Istraživanje je koncipirano kao opservacijska presječna studija. Obuhvaća analizu anamnestičkih, kliničkih i laboratorijskih karakteristika bolesnika s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om kao i određivanje i analizu koncentracija antimikrobnih peptida i citokina u BAL-u sve uključene djece. Svrha istraživanja bila je usporediti koncentracije antimikrobnih peptida (ljudskih alfa- i beta-defenzina i katelicidina) i citokina TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-33, IL-35, IL-37, IFN-γ i TGF-β1 u uzorcima bronhoalveolarnoga ispirka djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om s koncentracijama u uzorcima zdrave djece, ustanoviti postoji li povezanost između koncentracija pojedinih AMP-a i citokina te povezanost između koncentracija AMP-a i težine bolesti sa ciljem određivanja uloge ispitanih AMP-a u patogenezi infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om.

Kriteriji za uključivanje bolesnika u studiju bili su:

- Dob manja od 7 godina;

- Potvrđena infekcija donjega dijela dišnoga sustava uzrokovana RSV-om. Dijagnoza infekcije donjega dijela dišnoga sustava postavlja se klinički (i ev. radiološki). Etiološka

dijagnoza postavlja se iz respiratornih uzoraka (nazofaringealni ispirak, ispirak traheje, BAL) dokazivanjem RSV-a metodom izravne fluorescencije ili molekularnom metodom;

- Učinjena bronhoskopija.

Kontrolnu skupinu čine djeca primljena u Klinički bolnički centar „Sestre milosrdnice“ radi elektivnog operativnoga zahvata u općoj anesteziji.

Kriteriji za uključenje u kontrolnu skupinu su:

- Dob manja od 7 godina;
- Nepostojanje akutne ili kronične bolesti

4.1.1. BOLESNICI

U sve djece mlađe od 7 godina primljene u Zavod za infektivne bolesti djece KZIB s dijagnozom infekcije donjega dijela dišnoga sustava po prijemu je učinjena istovjetna klinička i laboratorijska evaluacija. Ukoliko bi dijete zadovoljilo kriterije za uključivanje u studiju prikupili bismo demografske i anamnestičke podatke o ispitanicima, relevantne kliničke i laboratorijske podatke te analizirali BAL. Djeca uključena u studiju nisu bila podvrgnuta dodatnim dijagnostičkim postupcima.

Infekcijom donjih dišnih putova smatrali smo bronhiolitis i pneumoniju, a dijagnoza se postavljala na osnovi uobičajenih kliničkih i radioloških kriterija. Dijagnoza bronhiolitisa postavljena je klinički na temelju: 1. simptoma infekcije gornjih dišnih putova u početku bolesti (curenje i začepljenost nosa, blagi kašalj); 2. pogoršanja bolesti nakon nekoliko dana s pojačanjem kašlja, otežanim i ubrzanim disanjem; 3. kliničkoga pregleda kojim se uočila dispneja i tahipneja i 4. auskultatornoga nalaza na plućima (sipnja, krepitacije difuzno nad plućima) (53). Dijagnoza pneumonije pretpostavljena je na temelju kliničke slike (febrilitet, kašalj, tahipneja, dispneja) i auskultatornoga nalaza na plućima (krepitacije, bronhalno disanje, oslabljen šum disanja), a potvrđena nalazom infiltrata na rendgenskoj snimci pluća (266).

Prilikom obrade podataka kao posebnu podskupinu izdvojili smo djecu sa sekundarnom bakterijskom infekcijom prema kriterijima: novonastali infiltrat na radiogramu prsnoga koša uz porast surogatnih biljega upale (leukociti, C-reaktivni protein (CRP) i/ili prokalcitonin); porast više od 10^5 bakterija u BAL-u ili porast 10^4 bakterija iz BAL-a uz povišene koncentracije ranije navedenih surogatnih biljega upale. Bakterijske infekcije drugih

lokalizacija (npr. mokraćnih putova) nismo smatrali sekundarnom bakterijskom infekcijom jer ne utječu na profil AMP-a i citokina u plućima. Također, ako je bakterijska infekcija nastupila u bilo kojem času nakon što je učinjena bronhoskopija tu djecu smo svrstali u skupinu bez bakterijske superinfekcije jer su u nju spadali u trenutku uzimanja BAL-a, odnosno koncentracije AMP-a i citokina su određene u trenutku dok bakterijske superinfekcije nije bilo. Osim toga, u te djece bakterijska infekcija nije utjecala na parametre težine bolesti.

Etiološka dijagnoza postavljena je iz respiratornih uzoraka (nazofaringealni ispirak, ispirak traheje, BAL) dokazivanjem RSV-a metodom izravne fluorescencije u Odjelu za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo ili molekularnom metodom (lančana reakcija polimeraze) u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku KZIB. U navedenim laboratorijima učinjena je i dodatna mikrobiološka obrada radi dokazivanja drugih mogućih uzročnika, odnosno koinfekcije ili superinfekcije.

Za izradu studije od roditelja su prikupljeni anamnestički i relevantni demografski podaci (dob, spol, trajanje bolesti i febriliteta, simptomi i znakovi infekcije dišnih putova). Trajanje bolesti određeno je prema prvome simptomu aktualne bolesti koji su roditelji primijetili, a izraženo je u danima kao i trajanje febriliteta. Iz kliničkoga pregleda djeteta učinjenog kod prijema zabilježene su vrijednosti tjelesne mase i vitalnih parametara (tjelesna temperatura, krvni tlak, srčana frekvencija, frekvencija disanja, saturacija periferne krvi kisikom). Rezultati odabranih laboratorijskih pretraga učinjenih kod prijema (CRP, kompletna krvna slika, plinska analiza periferne krvi) su zabilježeni i obrađeni. Također su zabilježeni i obrađeni i rezultati navedenih pretraga ukoliko su ponovljene na dan bronhoskopije (i ukoliko bronhoskopija nije bila na dan prijema). Prikupljeni su rezultati svih plinskih analiza periferne krvi učinjenih tijekom boravka i za svaku smo izračunali omjer parcijalnoga tlaka kisika u arterijskoj krvi i udjela kisika u udahnutom zraku (PaO2/fiO2).

Pratili smo tijek bolesti, a kao odrednice težine bolesti odabrali smo trajanje hospitalizacije, trajanje boravka u jedinici intenzivnoga liječenja i trajanje respiratorne potpore (mehanička ventilacija, suplementacija kisika), sve mjereno u danima. Izračunali smo i omjer parcijalnoga tlaka kisika u arterijskoj krvi i udjela kisika u udahnutom zraku (PaO2/fiO2) na dan prijema, na dan bronhoskopije te najnižu vrijednost tijekom bolesti, koju smo u konačnici i koristili. Također smo izračunali pedijatrijski indeks mortaliteta (PIM2) na dan prijema kao mogući pokazatelj težine bolesti (267).

4.1.2. KONTROLNA SKUPINA

Kontrolnu skupinu čine djeca mlađa od 7 godina primljena u Klinički bolnički centar „Sestre milosrdnice“ radi elektivnog operativnoga zahvata u općoj anesteziji čiji su roditelji pristali na sudjelovanje u istraživanju i potpisali pristanak.

U te je djece učinjena uobičajena predoperativna priprema koja uključuje anamnezu, klinički pregled i rutinske laboratorijske nalaze. Za obradu su prikupljeni demografski podaci (dob, spol) te rezultati odabranih laboratorijskih pretraga (CRP, kompletna krvna slika).

4.2. METODE ISTRAŽIVANJA

4.2.1. BIOKEMIJSKE, HEMATOLOŠKE I CITOLOŠKE PRETRAGE

Sve hematološke, citološke i biokemijske analize učinjene su u Odjelu za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju s citologijom KZIB. Biokemijske i hematološke pretrage uključivale su koncentraciju CRP-a, broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, broj leukocita, diferencijalnu krvnu sliku, broj trombocita u serumu.

Određivanje CRP-a vrši se na biokemijskom analizatoru Beckman Coulter AU 680, metodom imunoturbidimetrije (Beckman Coulter System Reagent CRP Turbidimetric Fixed Time Method). Načelo mjerenja: nakon miješanja uzorka s puferom R1 i s otopinom antiseruma R2, CRP specifično reagira s anti-humanim CRP protutijelima i nastaju netopivi agregati. Apsorbancija tih netopivih agregata proporcionalna je koncentraciji CRP-a u uzorku.

Kompletna krvna slika u KZIB radi se na hematološkim analizatorima LH-750 i DxH 800 proizvođača Beckman Coulter®. Analizator određuje 22 hematološka parametra pri čemu se broj leukocita, broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, broj trombocita, srednji volumen eritrocita i srednji volumen trombocita direktno mjere, dok se ostali parametri izračunavaju iz podataka o izmjerenim parametrima. Metoda po Coulteru, na kojoj se temelji rad Beckman-Coulter analizatora, omogućuje brojanje stanica po veličini metodom impedancije i diferenciranje populacije leukocita VCS (engl. *Volume, Conductivity, Scattering*) tehnologijom. Brojanje metodom impedancije provodi se tako da svaka stanica suspendirana u vodljivoj tekućini (diluent) prolazi između dviju elektroda i izaziva porast otpora, što se bilježi kao električni impuls. Broj impulsa odgovara broju stanica, a veličina impulsa proporcionalna je volumenu stanica. Za brojanje eritrocita i leukocita postoje dvije posebne komorice. Regulirani vakuum kontrolira ulaz razrijeđenog i liziranog uzorka u svaku od

komorica. U svakoj komorici broji se po tri puta i DMS (engl. *Data Management System*) obrađuje rezultate izdajući srednju vrijednost. U komorici za eritrocite kao eritrociti se klasificiraju stanice volumena 36-360 fL. U istoj komorici se broje i trombociti koji se klasificiraju kao stanice manje od 20 fL. U drugoj komorici se nakon liziranja eritrocita broje leukociti i istovremeno se određuje koncentracija hemoglobina cijanmenthemoglobinskom metodom.

4.2.2. BRONHOSKOPIJA

Bronhoskopija je učinjena prema poznatim i općeprihvaćenim indikacijama (268, 269). Niti jedno dijete nije podvrgnuto bronhoskopiji za potrebe istraživanja. Svu djecu uključenu u studiju bronhoskopirao je jedan istraživač (Srđan Roglić, dr. med.) standardnim postupkom (268, 270). Korišten je fleksibilni pedijatrijski bronhoskop marke Fujinon. Za uzimanje uzoraka BAL-a bronhoskop je zaglavljen u segmentalnom ili subsegmentalnom bronhu prema radiološkom nalazu, odnosno bronhu za srednji režanj desnoga pluća ukoliko su promjene bile difuzne. Potom je instilirano po 5 mL (dojenčad), odnosno po 10 mL (ostala djeca) sterilne fiziološke otopine zagrijane na tjelesnu temperaturu i aspirirano (271). Prva dva uzorka obrađena su i spremljena na -80°C radi određivanja koncentracije odabranih AMP-a i citokina. Ostali uzorci su uzeti za citološku i mikrobiološku analizu. Citološka obrada BAL-a obuhvatila je brojanje stanica u Fuchs-Rosenthalovoj komorici i citološki pregled sedimenta BAL-a i učinjena je u Odjelu za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju s citologijom KZIB. Kultivacija bakterija iz BAL-a vršila se na odgovarajućim hranjivim podlogama u Zavodu za kliničku mikrobiologiju KZIB. Dokazivanje drugih respiratornih virusa učinjeno je metodom izravne fluorescencije (adenovirus, PIV tip 1, 2 i 3 i humani metapneumovirus), odnosno molekularnom metodom lančane reakcije polimeraze (virus gripe) u Odjelu za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

Različita su mišljenja o tome koji uzorak BAL-a treba koristiti za koje studije. S obzirom da koncentracija ne-staničnih komponenti opada u svakom sljedećem uzorku i da je koncentracija citokina vjerojatno najviša u prvom uzorku, mi smo odlučili uzeti prva dva uzorka za određivanje AMP-a i citokina (272).

4.2.3. NE-BRONHSKOPSKI BRONHOALVEOLARNI ISPIRAK

U djece u kontrolnoj skupini je po intubaciji uzet ne-bronhoskopski BAL uobičajenim postupkom (273, 274). Sterilni aspiracijski kateter uveden je kroz Y-konektor do točke pružanja otpora i ondje zaglavljen. Kroz njega je uneseno 10 mL sterilne fiziološke otopine zagrijane na tjelesnu temperaturu. Potom je kateter spojen na sterilnu posudu i aspirator te je učinjena aspiracija. Postupak je još jednom ponovljen s istom količinom fiziološke otopine, a dobiveni je sadržaj obrađen i spremljen na -80°C do daljnje analize.

4.2.4. OBRADA BRONHOALVEOLARNOGA ISPIRKA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA I CITOKINA

Odvajanje stanica i razrijeđenog sekreta iz BAL uzoraka

Uzorak BAL-a je nakupina različitih stanica (limfociti, makrofagi, granulociti, eritrociti i nešto epitelnih stanica) u sekretu bronha razrijeđenom sterilnom fiziološkom otopinom, u kojem se često nalazi velika količina sluzi i staničnih ostataka (debris). Zbog takvog sastava stanice su sklone stvarati nakupine koje se teško mogu razbiti vorteksiranjem ili resuspendirati pomoću pipete te je uzorak prvo protisnut kroz mrežicu/mlinarsku svilu i na taj su način fizički razbijene nakupine sluzi, debrisa i stanica. Uzorak je zatim centrifugiran (600 g, 5 minuta) prilikom čega su se stanice spustile u talog, a iznad je ostao razrijeđeni BAL sekret (BALF – engl. *fluid*).

BALF smo pipetiranjem odvojili od taloga stanica, pri čemu smo 19 mL odvojili za kasniju liofilizaciju, pomiješali s 1 mL albumina u puferiranoj otopini fosfatnih soli (PBS, engl. *phosphate buffered saline*) (konc. 1 mg/mL) i pohranili na -80 °C. Dio originalnog BAL-a smo iskoristili za određivanje koncentracije ukupnih proteina po Bradfordu.

Preostale stanice smo resuspendirali u malom volumenu, odredili im broj pomoću boje tripansko modrilo (engl. *Tripan blue*), te smo ih do daljnjeg testiranja zamrznuli u tekućem dušiku.

Liofilizacija uzoraka BAL-a

S obzirom na veliko razrjeđenje plućnog sekreta prilikom izvođenja bronhoskopije i uzimanja uzoraka BAL-a, uzorke je potrebno koncentrirati. S obzirom da smo BALF kasnije koristili za određivanje koncentracije citokina i AMP-a, a proteini su termonestabilne molekule, kao optimalnu metodu odabrali smo liofilizaciju.

Uzorci za liofilizaciju su pripremljeni tako da je u 19 mL BALF-a dodan 1 mL albumina (rastopljen u PBS-u koncentracije 1 mg/mL). Tako pripremljeni uzorak je zamrznut na -80 °C. Uzorci moraju biti zamrznuti prije ulaska u proces liofilizacije. Liofilizacija je napravljena na aparatu Durastop/Dura-Dry (FTS systems) koji ima poseban proces sušenja za obradu i očuvanje termonestabilnih molekula. Proces liofilizacije je rađen po programu opisanom u **Tablici 1**. Nakon liofilizacije, liofilizat je otopljen u 1 mL reH2O da bi se podesila koncentracija dodanog albumina na 1 mg/mL i tako pripremljeni uzorci su pohranjeni na -80 °C do izvođenja testova.

Tablica 1. Program liofilizacije.

KORAK	TEMPERATURA (°C)	VAKUUM	VRIJEME (min)
1	-20	100	120
2	-10	80	360
3	-5	80	240
4	5	0	600

Određivanje koncentracije kemokina

Prisutnost i koncentracija AMP-a i citokina u uzorcima BAL-a određena je komercijalno dostupnim imunoenzimskim testovima (ELISA, engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) za HBD1, HBD2, HBD4, IL-4, IL-6, TNF-α, IL-31, IL-33 (Peprotech, UK), HNP1-3 (DRG International Inc., USA), LL-37 (Hycultec, Germany), IL-10, IL-35, IL-37, TGF-β1, (eBioscience, USA), IFN-γ (Biolegend, USA), IL-1β (Mabtech AB, Sweden) prema standardnom protokolu proizvođača. Apsorbancija na 450 nm s korekcijom valne duljine na 579 nm izmjerena je na Multiscan Spectrum spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific). Rezultati su izračunati na temelju interpolacije izmjerene apsorbancije sa standardnom krivuljom. Dobivena koncentracija je preračunata u koncentracije u originalnom BAL-uzorku uzimajući u obzir korištena razrjeđenja prilikom izvođenja testa, te ukoncentriravanje uzoraka liofilizacijom.

Koncentracija proteina u BAL-u određena je metodom po Bradford-u kako bi se bolje mogle uspoređivati koncentracije citokina i AMP-a između bolesnika.

4.3. STATISTIČKA ANALIZA

Sve podatke o bolesnicima prikupio je jedan istraživač (Srđan Roglić, dr. med.). Podaci o bolesnicima prikupljeni tijekom hospitalizacije upisani su u bazu podataka u kompjutorskom programu Microsoft Access®, licenciran KZIB.

Prikupljeni podaci sažeti su metodama deskriptivne statistike i prikazani grafički i numerički.

Za analizu podataka o koncentracijama citokina i AMP-a korišten je generalni linearni model a podaci su logaritmirani na bazi e. Uz podešenje za koncentraciju proteina u BAL-u i vrijeme proteklo od početka simptoma do uzimanja BAL-a (u kontrolnoj skupini to je vrijeme definirano kao 0 dana), određene su razlike između bolesne i zdrave djece (podešene razlike) i prikazane su kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (eksponenti podešenih aritmetičkih srednjih vrijednosti logaritama s 95% granicama pouzdanosti).

Za procjenu univarijatne združenosti koncentracija antimikrobnih peptida i citokina u BAL-u oboljele djece, određen je neparametrijski koeficijent korelacije (Kendallov τ).

Za procjenu univarijatne združenosti između koncentracija antimikrobnih peptida i citokina s pokazateljima težine bolesti u oboljele djece, određen je neparametrijski koeficijent korelacije (Kendallov τ) i regresijski koeficijent. Za procjenu nezavisne (multivarijatne) združenosti koncentracija antimikrobnih peptida i citokina s pokazateljima težine bolesti, podaci su analizirani u generalnim linearnim modelima.

Korišten je računalni program SAS for Windows 9.4 (SAS Inc., Cary, NY), licenciran Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

5. REZULTATI

5.1. BOLESNICI

U istraživanje je uključeno 21 dijete s dokazanom infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om, od kojih je devetero imalo sekundarnu bakterijsku infekciju dišnih putova. U kontrolnu skupinu uključeno je devetero djece.

Njihovi demografski podaci i rezultati hematološke obrade učinjene na dan uzimanja BAL-a prikazani su u **Tablici 2**. Vidljivo je da su djeca u kontrolnoj skupini bila starija od bolesnika (medijan 64 mjeseca u odnosu na mjesec dana), dok je spolna raspodjela u obje skupine podjednaka. Prisutan je brojčani trend nižih vrijednosti broja leukocita u kontrolnoj skupini. Ostali nalazi standardne hematološke obrade dali su ujednačene vrijednosti u oboljele djece i kontrola. Brzine sedimentacije eritrocita nismo mogli uspoređivati jer u većine bolesnika nije određivana zbog njihove dobi (novorođenčad i mala dojenčad). Koncentracija CRP-a bila je značajno veća u podskupini djece s bakterijskom superinfekcijom (medijan 17,4) nego u podskupini bez superinfekcije (medijan 5,7), dok djeci u kontrolnoj skupini ta pretraga nije rađena.

Vrijeme proteklo od prvoga simptoma do dana kada je učinjena bronhoskopija bilo je podjednako u obje podskupine oboljele djece (medijan 6 dana). Prilikom statističke obrade odredili smo da je u kontrolnoj skupini BAL uzet nulti dan

Tablica 2. Demografski podaci i rezultati hematološke obrade učinjene na dan uzimanja BAL-a.

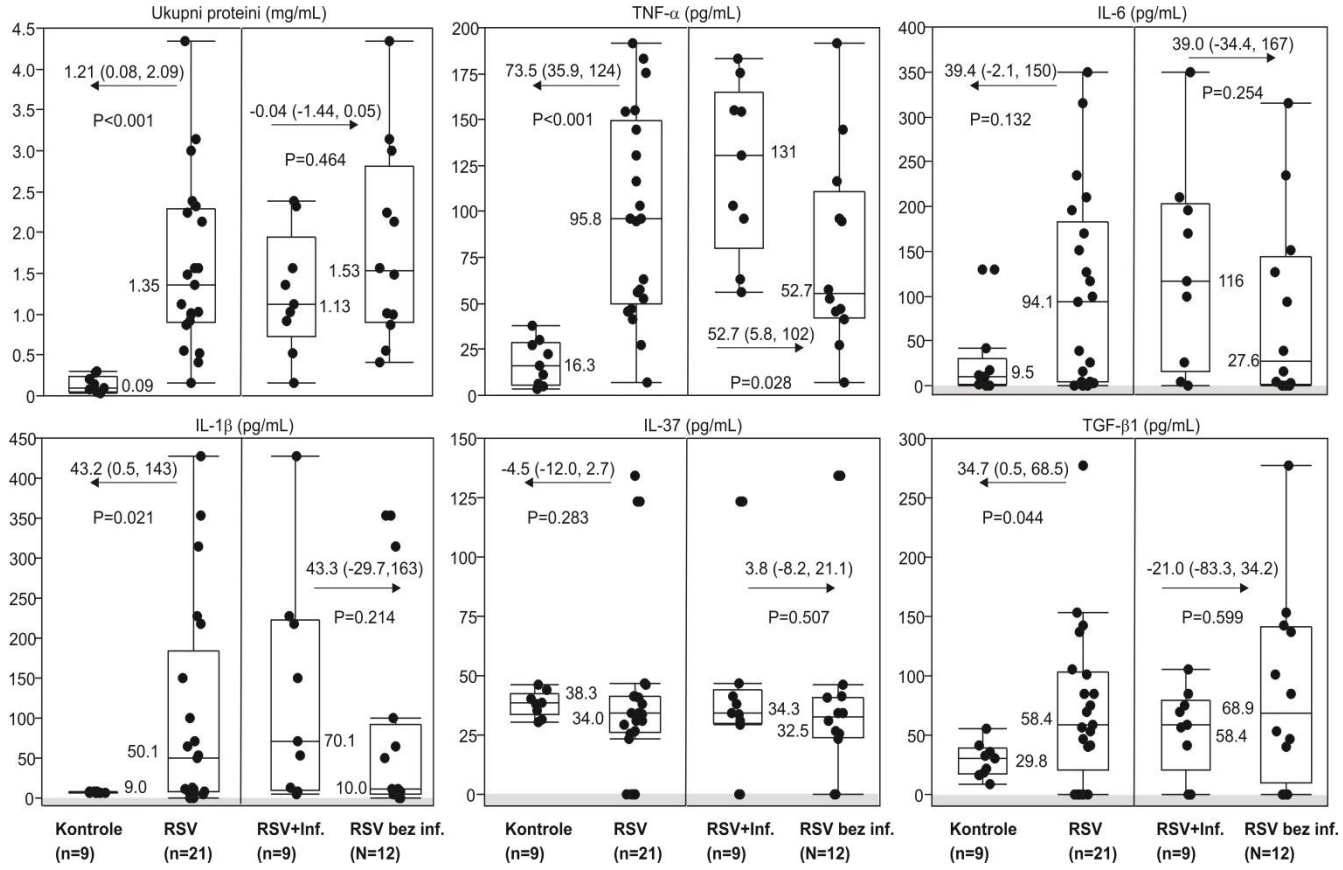
Vrijednosti su medijani (raspon) ili broj (postotak).

	RSV svi	RSV bez superinfekcije	RSV +superinfekcija	kontrole
N	21	12	9	9
Dob (mjeseci)	1 (0.3-96.7)	0.75 (0.3-96.7)	2.6 (0.4-35.8)	64 (46-83)
Dječaci	10 (48%)	4 (33%)	6 (67%)	5 (56%)
Vrijeme od početka bolesti do uzimanja BAL-a (dani)	6 (2-23)	6 (2-13)	6 (2-23)	---
Eritrociti (x 10^9/L)	4.28 (2.62-4.94)	4.00 (2.62-4.88)	4.33 (3.12-4.94)	4.85 (4.20-5.12)
Hemoglobin (g/L)	138 (88-170)	142 (88-170)	125 (101-169)	128 (112-156)
Hematokrit	0.37 (0.26-0.50)	0.36 (0.26-0.50)	0.37 (0.29-0.50)	0.39 (0.34-0.45)
Leukociti (x 10^9/L)	12.1 (4.4-29.6)	12.3 (4.4-16.2)	11.0 (5.1-29.6)	8.6 (5.4-10.8)
Neutrofili (%)	52.0 (36.0-84.5)	47.5 (36.0-77.0)	59.0 (36.0-84.0)	51.0 (39.6-64.5)
Limfociti (%)	32.0 (7.0-50.0)	41.0 (18.0-50.0)	30.0 (7.0-49.0)	38.4 (28.8-52.7)
Monociti (%)	11.0 (3.0-27.0)	11.5 (3.0-25.0)	11.0 (3.0-27.0)	7.6 (5.8-12.0)
Eozinofili (%)	1.0 (0.0-0.5)	1.0 (0.0-3.0)	0 (0.0-5.0)	2.0 (0-5.0)
Bazofili (%)	0 (0.0-1.0)	0 (0.0-0.0)	0 (0.0-1.0)	0 (0-0.5)
Trombociti (x 10^9/L)	389 (141-562)	371 (203-554)	389 (141-562)	310 (205-599)

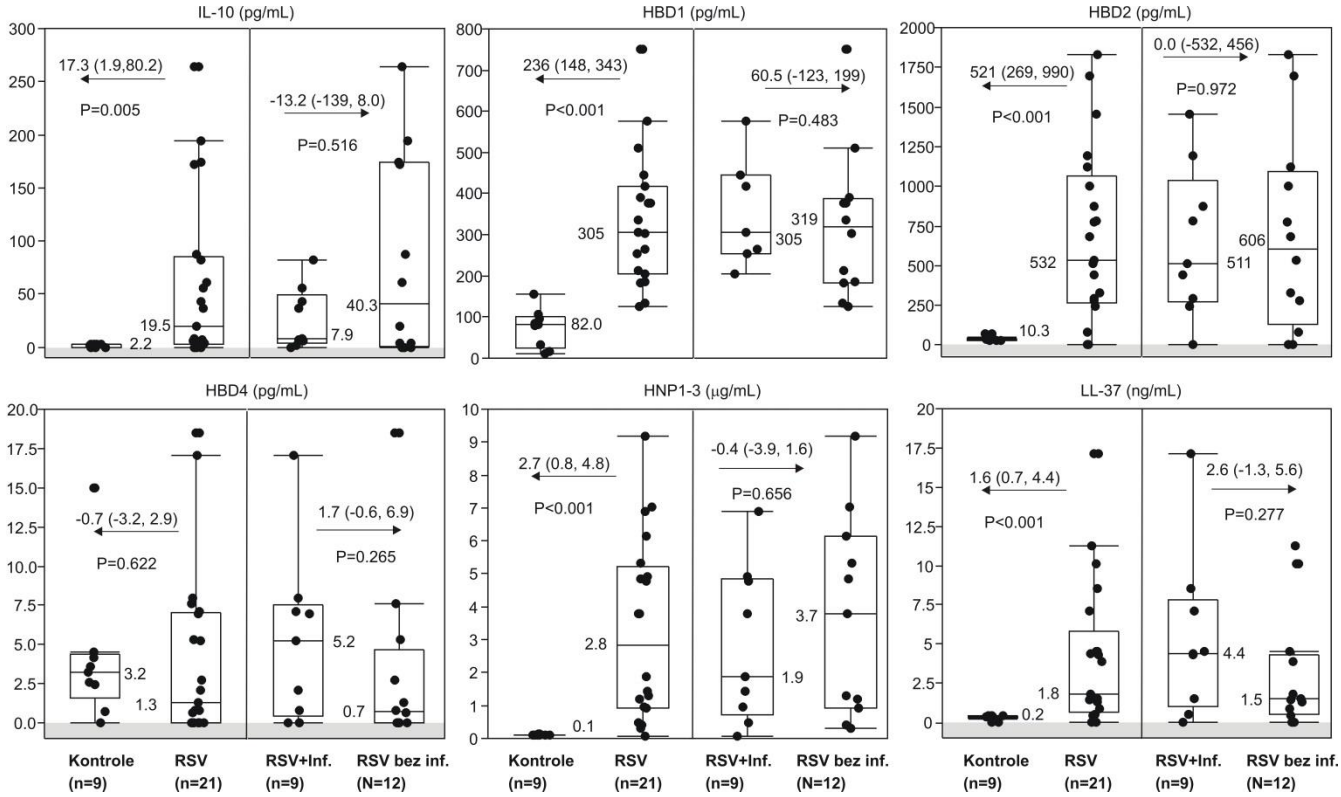
5.2. KONCENTRACIJE CITOKINA I ANTIMIKROBNIH PEPTIDA U BAL-U

Slike 1-3 prikazuju izmjerene koncentracije proteina i citokina u BAL-u i rezultate univarijatnih (nepodešenih) usporedbi. Djeca u skupini oboljelih imala su značajno višu koncentraciju proteina (po mL BAL-a) nego djeca u kontrolnoj skupini, a nije bilo vidljive razlike između djece s ili bez bakterijske superinfekcije (**Slika 1**). Također, imala su više koncentracije TNF-α (po mL BAL-a) s višim vrijednostima u podskupini djece bez bakterijske infekcije (**Slika 1**). Nadalje, koncentracije IL-1β i TGF-β1 više su u skupini bolesne djece nego u kontrolnoj skupini, no bez razlike u podskupinama (**Slika 1**). Nismo našli značajnu razliku u koncentraciji IL-6 i IL-37 između bolesnih i kontrola (**Slika 1**).

Oboljela djeca imala su i značajno više koncentracije IL-10, HNP1-3, HBD1, HBD2 i LL-37 u BAL-u nego zdrava djeca, bez značajne razlike između podskupina bolesne djece (**Slika 2**). Koncentracije HBD4 nisu se značajno razlikovale između skupine oboljelih i kontrolne skupine (**Slika 2**).

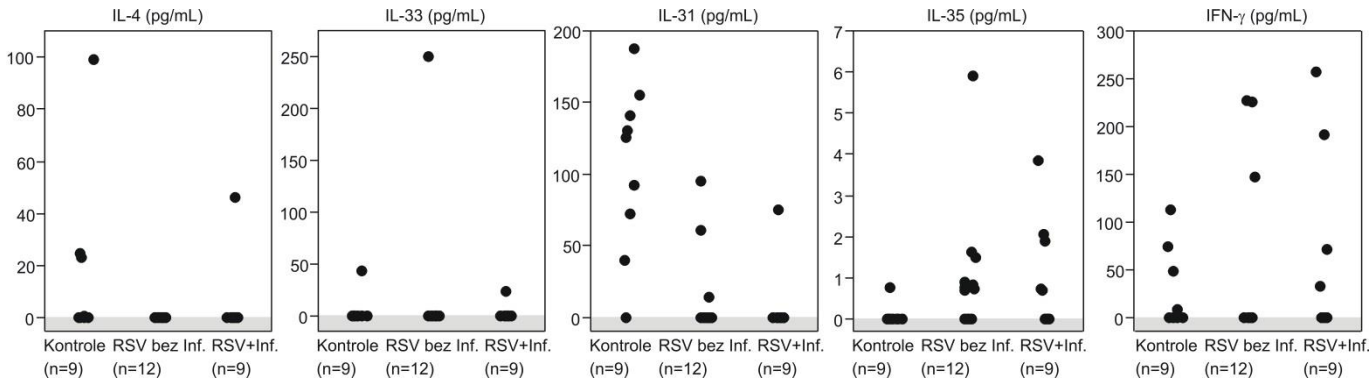


Slika 1. Koncentracije proteina, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-37 i TGF-β1 u BAL-u djece u kontrolnoj skupini i djece zaražene RSV-om (svi i ovisno o postojanju bakterijske superinfekcije). Točke predstavljaju pojedinačne vrijednosti, vodoravne linije su medijani (izraženi numerički), pravokutnici su interkvartilni rasponi, a poprečne crte su unutarnje granice. Točke izvan granica su odstojeće vrijednosti *(outlier).* Označene su i nepodešene razlike u medijanima s 95.5% intervalima pouzdanosti i p-vrijednostima (Mann-Whitney U test) za sve bolesnike u odnosu na kontrole i bolesnike s bakterijskom superinfekcijom u odnosu na one bez superinfekcije. Zasjenjena područja na nekim grafovima označavaju granicu detekcije (koncentracija=0) kako bi prikazali da su u pojedinim uzorcima koncentracije citokina bile nemjerljive.



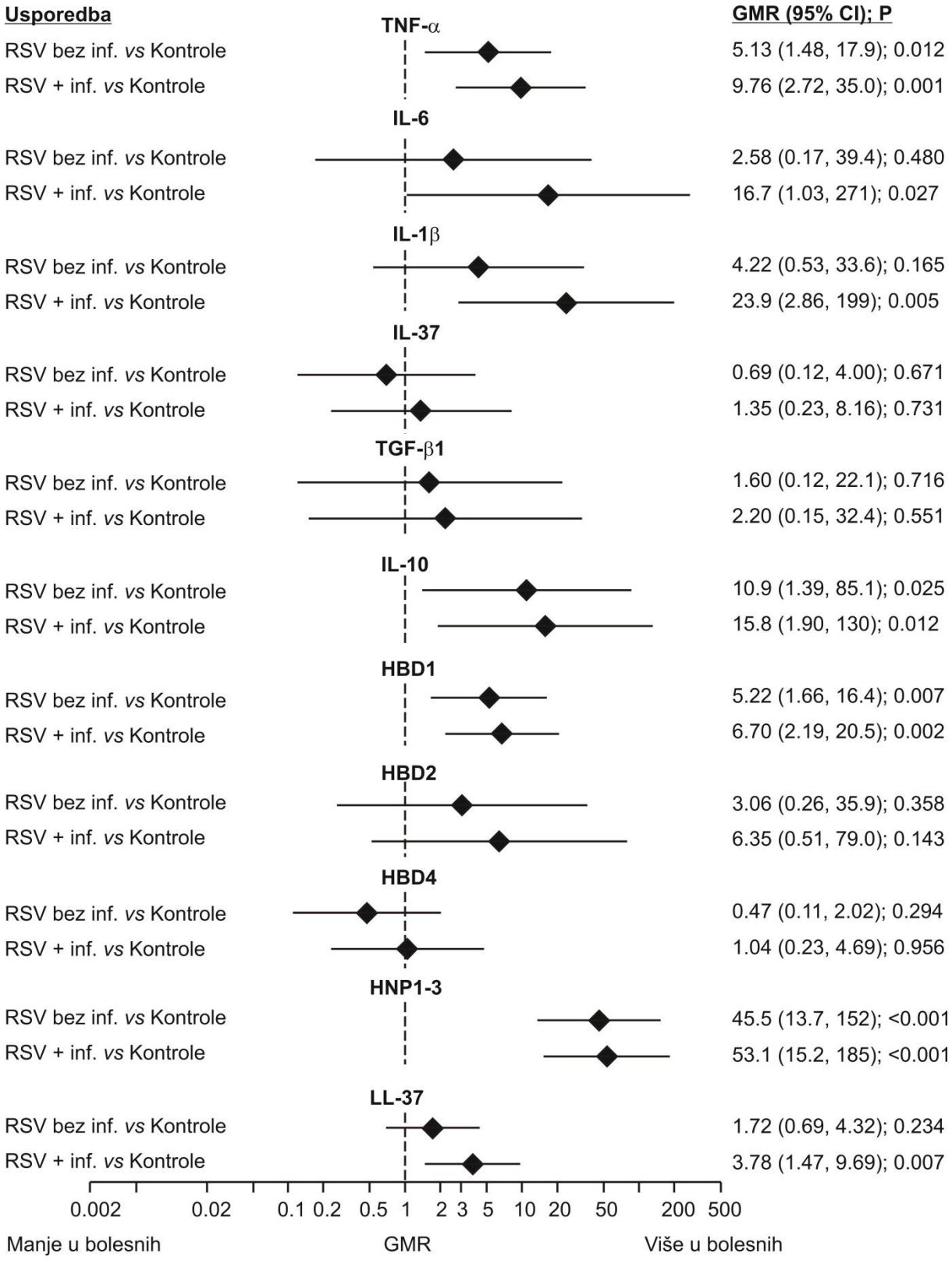
Slika 2. Koncentracije IL-6, HBD1, HBD2, HBD4, HNP1-3 i LL-37 u BAL-u djece u kontrolnoj skupini i djece zaražene RSV-om (svi i ovisno o postojanju bakterijske superinfekcije). Točke predstavljaju pojedinačne vrijednosti, vodoravne linije su medijani (izraženi numerički), pravokutnici su interkvartilni rasponi, a poprečne crte su unutarnje granice. Točke izvan granica su odstojeće vrijednosti *(outlier).* Označene su i nepodešene razlike u medijanima s 95.5% intervalima pouzdanosti i p-vrijednostima (Mann-Whitney U test) za sve bolesnike u odnosu na kontrole i bolesnike s bakterijskom superinfekcijom u odnosu na one bez superinfekcije. Zasjenjena područja na nekim grafovima označavaju granicu detekcije (koncentracija=0) kako bi prikazali da su u pojedinim uzorcima koncentracije citokina bile nemjerljive.

Mjerljive koncentracije IL-4, IL-33, IL-35 i IFN-γ zabilježene su samo u pojedine djece u obje skupine (**Slika 3**). Koncentracija IL-31 bila je mjerljiva u sve djece u kontrolnoj skupini, a samo u četvero oboljele djece bila je iznad granice mjerljivosti (**Slika 3**). Navedene citokine nismo dalje analizirali.



Slika 3. Koncentracije IL-4, IL-33, IL-31, IL-35 i IFN-γ u BAL-u djece u kontrolnoj skupini i djece zaražene RSV-om s ili bez sekundarne bakterijske infekcije. Točke su pojedinačne vrijednosti. Zasjenjena područja označavaju granicu detekcije (koncentracija=0) kako bi prikazali da su koncentracije citokina bile nemjerljive u većini uzoraka što je onemogućilo bilo kakvu daljnju analizu.

Na **Slici 4** prikazane su podešene (za koncentraciju proteina u BAL-u i vrijeme proteklo od početka simptoma do uzimanja BAL-a) razlike u koncentraciji citokina između djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om s i bez bakterijske superinfekcije i djece u kontrolnoj skupini. Zbog ograničene veličine uzorka, procjene su razmjerno neprecizne, a pokazuju: značajno više koncentracije TNF-α, IL-10, HBD1 i posebno HNP1-3 (oko 50 puta više) u oboljele djece u odnosu na kontrolnu skupinu bez obzira na bakterijsku superinfekciju; značajno više koncentracije IL-6, IL-1β i LL-37 u djece oboljele od infekcije RSV-om s bakterijskom superinfekcijom; nepostojanje značajne razlike između bolesnika i kontrola u koncentracijama IL-37, TGF-β1, HBD2 (iako s tendencijom višim vrijednostima u oboljelih) i HBD4.



Slika 4. Podešene (za koncentraciju proteina u BAL-u i vrijeme od početka simptoma do uzimanja uzorka) razlike u koncentraciji citokina u BAL-u bolesne djece s i bez bakterijske superinfekcije i djece u kontrolnoj skupini. Podaci su analizirani u generalnim linearnim modelima (svaki citokin pojedinačno); koncentracije su logaritmirane na bazi e, a razlike

između skupina su prikazane kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR, engl. *geometric mean ratios*) s 95% granicama pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*).

5.3. KORELACIJA IZMEĐU ANTIMIKROBNIH PEPTIDA I CITOKINA

U 21 bolesnika s infekcijom RSV-om odredili smo korelacije između koncentracija pojedinih antimikrobnih peptida i citokina u BAL-u. Korelaciju smo računali za sve određivane AMP-e i samo za one citokine koji su kod većine ispitanike nađeni u mjerljivim koncentracijama u BAL-u (IL-1β, IL-6, IL-10, IL-37, TNF-α, TGF-β1). Korelaciju nismo određivali za IL-4, IL-31, IL-33, IL-35 i IFN-γ, jer su oboljela djeca samo sporadično imala mjerljive koncentracije tih citokina u BAL-u. Učinjenom analizom uočene su slijedeće (univarijatne) združenosti (korelacije) između antimikrobnih peptida i citokina (**Tablica 3**):

•Više koncentracije HBD1 i viših koncentracija TNF-α, te trend združenosti (τ=0.327) između viših koncentracija HBD1 i IL-6;

•Više koncentracije HBD2 i viših koncentracija IL-6;

•Trend združenosti (τ=0.271) viših koncentracija HBD4 i IL-10;

•Više koncentracije HNP1-3 i viših koncentracija IL-10, te trend združenosti s višim koncentracijama IL-6 (τ=0.289);

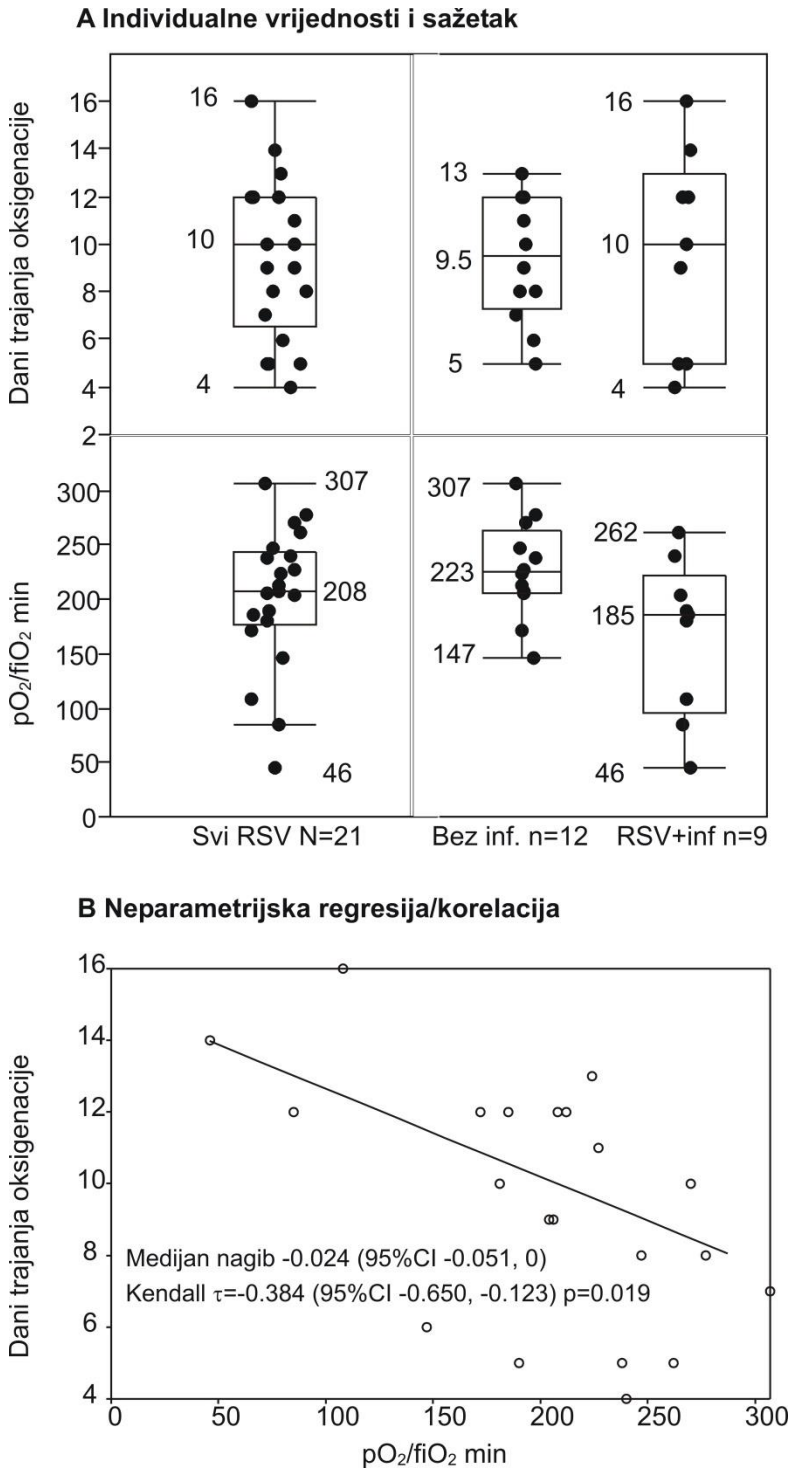
•Više koncentracije LL-37 i viših koncentracija IL-6 i IL-10, te trend združenosti s višim koncentracijama TGF-β1 (τ=0.265).

Tablica 3. Korelacija između antimikrobnih peptida i različitih citokina u BAL-u. Prikazan je Kendallov koeficijent τ i pripadajuća P-vrijednost.

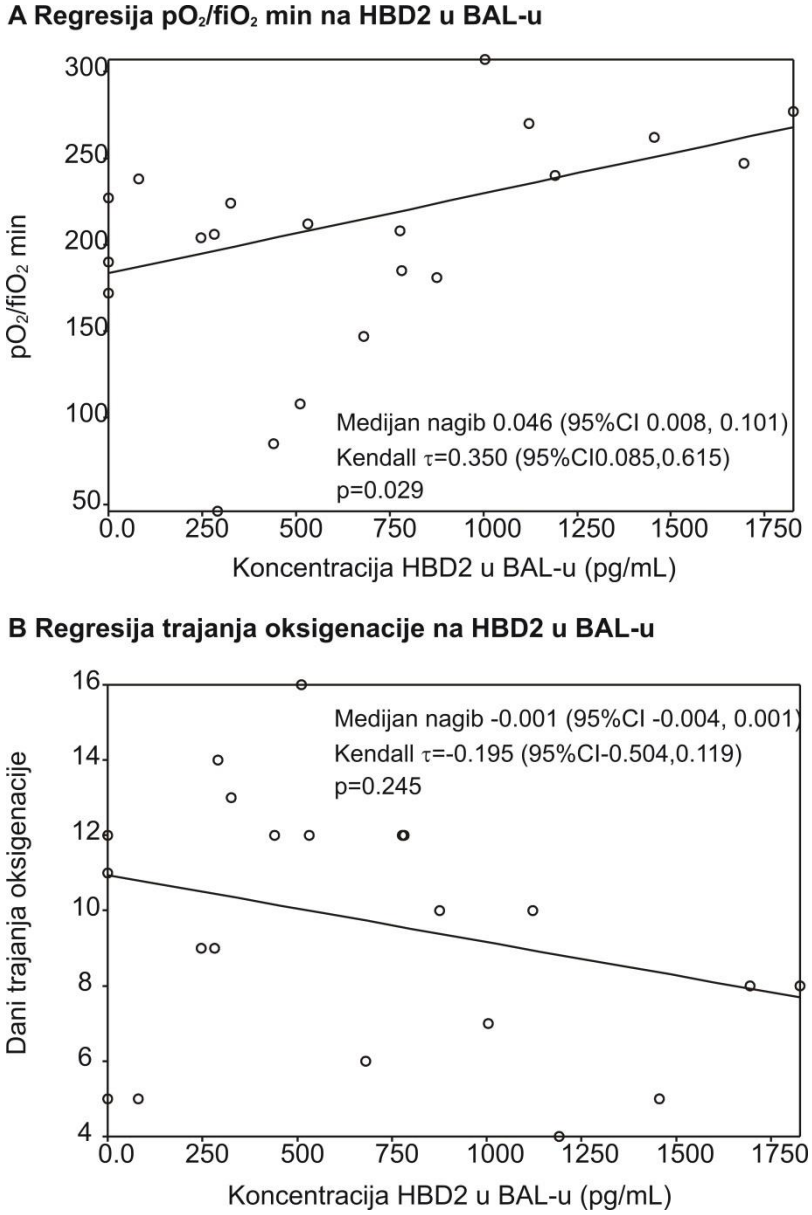
	IL-1β	IL-6	IL-10	IL-37	TNF-α	TGF-β1
HBD1	-0.106; 0.529	0.327; 0.053	-0.101; 0.550	0.165; 0.326	**0.485; 0.004**	0.089; 0.598
HBD2	0.173; 0.276	**0.316; 0.048**	0.180; 0.261	0.097; 0.545	-0.053; 0.739	0.054; 0.737
HBD4	0.050; 0.760	0.020; 0.902	0.271; 0.097	0.184; 0.257	0.005; 0.976	0.030; 0.853
HNP1-3	0.227; 0.163	0.289; 0.078	**0.578; <0.001**	0.080; 0.626	-0.021; 0.897	0.227; 0.163
LL-37	0.192; 0.226	**0.438; 0.006**	**0.438; 0.006**	0.188; 0.237	-0.014; 0.928	0.265; 0.100

5.4. POVEZANOST KONCENTRACIJE CITOKINA I AMP-A U BAL-U I TEŽINE BOLESTI

Dva pokazatelja težine bolesti koje smo odabrali (najmanja vrijednost PaO2/fiO2 tijekom bolesti i dani suplementacije kisika) bila su usporediva u djece s i bez bakterijske superinfekcije (**Slika 5A**). Viša najniža vrijednost PaO2/fiO2 bila je združena s kraćim vremenom suplementacije kisika (Kendall τ=-0.384) (**Slika 5B**). Nismo našli univarijatnu povezanost između koncentracije ijednoga citokina u BAL-u prikazanoga na **Slici 1** i **Slici 2** i ijednog od dva pokazatelja težine bolesti. Iznimka su koncentracije HBD2 – više koncentracije bile su povezane s višim PaO2/fiO2 (**Slika 6A**) i postojao je trend kraćega vremena ovisnosti o suplementaciji kisika kod viših koncentracija HBD2, ali ova povezanost nije bila statistički značajna (**Slika 6B**). Povezanost viših vrijednosti PaO2/fiO2 i viših koncentracija HBD2 u BAL-u ostala je statistički značajna nakon podešenja za dob, vrijeme od prijema (i najniže izmjerene vrijednosti PaO2/fiO2) do uzimanja BAL-a i koncentracije proteina u BAL-u: koeficijent regresije pokazao je porast vrijednosti PaO2/fiO2 od 5.3 jedinice (95% CI 0.7 do 9.8) za porast koncentracije HBD2 u BAL-u od 100 pg/mL. Vrijednosti koncentracije ostalih citokina i AMP-a ispitanih univarijatnom analizom ispitane su i u multivarijatnim modelima i nismo našli značajnu povezanost koncentracije nekoga citokina ili AMP-a s ijednim od korištenih pokazatelja težine bolesti.



Slika 5. Pojedinačni i skupni podaci za trajanje suplementacije kisika i najniže vrijednosti PaO2/fiO2 za sve bolesnike i ovisno o postojanju bakterijske superinfekcije (A) i odnos između dva ishoda (Kendallova korelacija rangova/ne-parametrijska linearna regresija) (B). A. Prikazane su individualne vrijednosti (numerički navedeni medijani, najmanje i najviše vrijednosti), interkvartilni raspon (kvadrati) i unutarnje ograde. B. Numerički je iskazan regresijski koeficijent te Kendallov koeficijent korelacije.



Slika 6. Univarijatni odnos najniže vrijednosti PaO2/fiO2 (A) odnosno dana suplementacije kisika (B) i koncentracije HBD2 u BAL-u (Kendallova korelacija rangova/ne-parametrijska linearna regresija). Numerički su iskazani regresijski koeficijent i Kendallov koeficijent korelacije.

6. RASPRAVA

Bronhiolitis je prvi put opisan kao klinički entitet davne 1940. godine (275). Respiratorni sincicijski virus otkriven je 1956. godine i ubrzo je ustanovljeno da je uzročnik bronhiolitisa. Tijekom više od 60 godina od tih otkrića stekli smo dobar uvid u patogenezu bronhiolitisa, no uloga imunološkoga sustava u patogenezi još uvijek je slabo rasvijetljena. Brojna istraživanja pokušala su objasniti doprinos pojedinih dijelova imunološkoga sustava u obrani od virusa i u oštećenju tkiva te njihov posljedični učinak na težinu i tijek bolesti. Čini se da smo još daleko od oblikovanja potpune slike i da će nam prije postati dostupni lijekovi koji će sprečavati infekciju i umnožavanje RSV-a nego lijekovi koji će modificiranjem imunološkog odgovora ublažiti kliničku sliku i ubrzati izlječenje. Tomu u prilog govori činjenica da je više antivirusnih lijekova protiv RSV-a u završnim fazama kliničkih ispitivanja, dok se simptomatsko liječenje svodi na adekvatnu hidraciju, aspiraciju sekreta i respiratornu potporu (53, 276).

Glavni problem u istraživanju bronhiolitisa je slaba dostupnost mjesta zbivanja – donjih dišnih putova. Obolijevaju uglavnom mala dojenčad i uzimanje materijala iz donjih dišnih putova samo za potrebe istraživanja nije etično. Uzorci su dostupni ukoliko je bronhoskopija indicirana pa se mogu uzeti dodatni uzorci za istraživanje ili je dijete intubirano radi mehaničke ventilacije pa se može uzeti ne-bronhoskopski BAL. Takve situacije su rijetke, a mehanički su ventilirana samo najteže bolesna djeca, kojih je srećom malo (277). Osim toga, čak i protektivna mehanička ventilacija izaziva upalne promjene u dišnim putovima, praćene porastom broja neutrofila i porastom koncentracije citokina, što može utjecati na rezultate istraživanja ukoliko se uzorak ne uzme odmah po intubaciji (278, 279). Navedene probleme studija na ljudima pokušava se prebroditi studijama na životinjskim modelima. Većina istraživanja koristi male glodavce (miševi, štakori), prvenstveno zbog njihove brzine razmnožavanja i mogućnosti genetskih manipulacija. Od većih životinja se netom ojanjena janjad smatra najboljim modelom zbog sličnog razvoja i građe dišnih putova kao u dojenčadi i zbog prijemčivosti za ljudske sojeve RSV-a (280). Problem je što su takva istraživanja bitno skuplja i s malim brojem uključenih životinja pa su zbog toga rijetka. Provode se i brojna *in vitro* istraživanja na kulturi ljudskih stanica respiratornoga trakta. Rezultate svih takvih istraživanja u konačnici treba potvrditi na ljudima. Činjenica da u KZIB liječimo veliki broj djece zbog bolesti donjih dišnih putova uzrokovanih RSV-om i da tu djecu bronhoskopiramo ukoliko postoji indikacija ponukala nas je da ovim istraživanjem pokušamo pridonijeti razumijevanju imunopatogeneze infekcije RSV-om. U našem

istraživanju težište smo stavili na mehanizme prirođene imunosti, odnosno antimikrobne peptide.

U našu studiju uključeno je 30 djece, 21 s infekcijom uzrokovanom RSV-om i 9 zdrave djece u kontrolnoj skupini. Djeca u kontrolnoj skupini bila su značajno starija od bolesnika (**Tablica 2**). To je bilo očekivano s obzirom da RSV uzrokuje težu infekciju donjih dišnih putova prvenstveno u male dojenčadi, dok su elektivni kirurški zahvati u dojenčadi rijetki (26). Pri oblikovanju studije pretpostavili smo da to neće utjecati na rezultate studije jer dosadašnje studije nisu pokazale razliku u koncentraciji AMP-a u dišnim putovima ovisno o dobi. Našu pretpostavku potvrđuje činjenica da koncentracije AMP-a izmjerene u BAL-u djece iz kontrolne skupine odgovaraju koncentracijama izmjerenima u zdravih dobrovoljaca u prethodnim studijama, osim za HBD4 za koji nismo našli prethodne rezultate (281-283). Ista pretpostavka obistinila se i za neke obrađivane citokine: IL-1β, TNF-α, IL-6 (284, 285). Nije bilo značajne razlike u spolnoj raspodjeli između skupina (**Tablica 2**).

Rezultati osnovne laboratorijske obrade nisu se značajno razlikovali između skupina. To je u skladu sa spoznajom da infekcija RSV-om, bez obzira koliko teška bila, ne utječe na rezultate hematoloških i biokemijski pretraga, osim analize plinova u krvi. Iznimka je CRP, koji je očekivano bio viši u djece s infekcijom RSV-om i bakterijskom superinfekcijom. Citološki nalaz BAL-a također je bio očekivan – u većine oboljele djece u BAL-u su dominirali neutrofili, što je u skladu s ranijim studijama (286-288). Koncentracija proteina bila je značajno povišena u oboljele djece u odnosu na kontrolnu skupinu kao što je prikazano i u prethodnome istraživanju (289). Koncentracije proteina su u našem istraživanju bile nešto niže, izraženije u kontrolnoj skupini, što je vjerojatno posljedica činjenice da su sva djeca uključena u navedenu studiju bila mehanički ventilirana (289). Tome u prilog govore vrijednosti vrlo slične našima u kontrolnoj skupini u istraživanju Midulle i suradnika (290).

Dobivene podatke o koncentracijama odabranih AMP-a i citokina obradili smo na dva načina. Prvo smo napravili univarijatnu analizu koncentracija, dakle usporedili smo apsolutne vrijednost koncentracija između skupina (infekcija RSV-om s i bez bakterijske superinfekcije, zdrava djeca), kao što je učinjeno i u gotovo svim dosadašnjim studijama koje su određivale koncentracije AMP-a i citokina u BAL-u, bez obzira koju plućnu patologiju su obrađivale. Potom smo odredili i razlike u koncentraciji podešene prema danu bolesti kod uzimanja BAL-a i prema koncentraciji proteina. Kao što su studije već pokazale, razine pojedinih medijatora upale nisu podjednake cijelo vrijeme bolesti, već u početku bolesti rastu dok ne dosegnu najvišu koncentraciju te potom njihova koncentracija pada (247, 291). Stoga je podešavanje prema danu bolesti trebalo omogućiti vjerodostojnu usporedbu među bolesnicima.

Podešavanje prema koncentraciji proteina ima za cilj smanjiti utjecaj značajne razlike u koncentraciji proteina između bolesne djece i kontrola kao i smanjiti utjecaj koji ima povrat instilirane fiziološke otopine tijekom bronhoskopije. Možemo pretpostaviti da je koncentracija proteina u BAL-u mjera intenziteta lokalne upale pa izražavanjem količine pojedinog medijatora upale omjerom njegove koncentracije i ukupne koncentracije proteina dobijemo njegovu relativnu vrijednost, odnosno njegov značaj u odnosu na cjelokupni upalni odgovor. Naravno, ova bi mjera bila puno preciznija kada bi znali koliki udio proteina otpada na medijatore upale, a koliki na razgradne produkte stanica i virusa.

Cilj našega istraživanja bio je odrediti koncentracije antimikrobnih peptida u donjim dišnim putovima djece tijekom infekcije RSV-om, usporediti ih s koncentracijama u zdrave djece i pokušati ustanoviti njihovu ulogu u imunopatogenezi infekcije RSV-om. Odabrali smo članove dvaju glavnih obitelji AMP-a u ljudi - defenzina i katelicidina. Odredili smo koncentracije dviju vrste defenzina: alfa-defenzina (HNP1-3) i beta-defenzina (HBD1, HBD2 i HBD4) te jedinog za sada poznatog ljudskog katelicidina, odnosno njegovoga C-terminalnog peptida (LL-37). Navedene AMP-e smo odabrali jer su prethodna istraživanja pokazala da su prisutni u dišnim putovima i da imaju ulogu u obrani od virusnih infekcija. S druge strane rijetka su istraživanja koja su se bavila njihovom ulogom u bronhiolitisu, odnosno infekciji donjih dišnih putova uzrokovanoj RSV-om (254).

Usporedba koncentracija u BAL-u pokazala je značajno povišene koncentracije svih ispitanih AMP-a osim HBD4 u bolesne djece (**Slika 2**). Prisutnost bakterijske superinfekcije nije dovodila do razlike u koncentraciji. Iz toga možemo zaključiti da se ovi AMP-i stvaraju u dišnim putovima kao odgovor na infekciju RSV-om. Kada smo koncentracije AMP-a podesili za dane bolesti i koncentracije proteina u BAL-u, vrijednosti su ostale značajno povišene za sve određivane AMP-e, osim za HBD2 (njegove vrijednosti su ostale povišene, ali ne statistički značajno). Podešavanjem je razlika između koncentracije HNP1-3 u bolesne djece i kontrola postala još izraženija, a koncentracija LL-37 bila je značajno viša samo u podskupini djece s bakterijskom superinfekcijom (**Slika 4**).

Povišene koncentracije HNP1-3 u infekciji RSV-om našla je i Thompson sa suradnicima (292). Oni su metodom masene spektrometrije određivali razine HNP1-3 u trahealnom aspiratu dojenčadi s infekcijom RSV-om koja su bila mehanički ventilirana. Prvi uzorak je uzet unutar 24 sata od intubacije, a drugi na dan ekstubacije pa su ga smatrali rekonvalescentnim uzorkom. Pokazali su da su koncentracije sva tri ispitana HNP-a, a posebno HNP1 bile značajno više na dan intubacije nego na dan ekstubacije. HNP-i su produkt neutrofila, koji su najbrojnije stanice u BAL-u tijekom infekcije RSV-om. To bi nas

moglo navesti na zaključak da je njihova povišena koncentracija u našoj studiji kao i u studiji Thompson i suradnika nespecifična, odnosno posljedica nakupljanja neutrofila, a ne da imaju specifičnu ulogu u obrani od infekcije RSV-om. Thompson i suradnici su dobivene koncentracije HNP-a korigirali za ukupni sadržaj fosfolipida kako bi otklonili ili barem smanjili utjecaj nakupljanja neutrofila u dišnim putovima na koncentraciju HNP-a. Budući da su razlike u koncentraciji HNP-a ostale značajne i nakon takve korekcije, oni zaključuju da povišene vrijednosti nisu posljedica samo nakupljanja neutrofila u donjim dišnim putovima, već ciljano povećane produkcije HNP-a. Tome u prilog govori i činjenica da HNP-i *in vitro* onemogućavaju viruse s ovojnicom (utjecaj na RSV doduše nije ispitivan) da se vežu za ciljne stanice (218).

Povišene koncentracije AMP-a u BAL-u nađene su i u studiji Schaller-Bals i suradnika (293). Oni su svakodnevno uzimali uzorke BAL-a novorođenčadi koja su bila mehanički ventilirana, a podijelili su ih u tri skupine: bolesnici bez infekcije, bolesnici s plućnom infekcijom i bolesnici sa sistemskom infekcijom bez plućne infekcije. Određivali su koncentracije HBD1, HBD2 i LL-37, koje su bile značajno povišene u sve djece s infekcijom. Vrijednosti koje su našli višestruko su veće od onih u našoj studiji, no upitno je ima li ih smisla uspoređivati s obzirom na drukčiju metodologiju određivanja koncentracija AMP-a korištenu u njihovoj studiji. Našli su i dobru korelaciju između koncentracija ispitanih AMP-a i citokina TNF-α i IL-8. Time su pokazali da i novorođenčad ima sposobnost sinteze značajnih koncentracija AMP-a. U našoj studiji je više od polovice djece s infekcijom RSV-om novorođenčad (11 od 21) i koncentracije AMP-a u njih nisu bile niže nego u starije djece što potvrđuje navedenu tezu.

Povišene koncentracije AMP-a u BAL-u opisane su u djece i odraslih s respiratornim infekcijama – protrahiranom bakterijskom bronhitisu, tuberkulozi i atipičnoj mikobakteriozi pluća (282, 283, 294). Također, koncentracije AMP-a bile su povišene i u navedenoj studiji Schaller-Bals i suradnika u djece koja nisu imala plućnu infekciju, ali i u drugim studijama koje su obrađivale bolesnike s različitim neinfektivnim bolestima pluća: plućnom sarkoidozom, kroničnom eozinofilnom pneumonijom, plućnom alveolarnom proteinozom i difuznim panbronhiolitisom (281, 293, 295-297). To je i za očekivati s obzirom da su AMP-i dio prirođene imunosti i nisu specifični za patogen, a povišeni su u upali različitih uzroka. Dakle, povišene koncentracije AMP-a u BAL-u naših bolesnika povezane su s infekcijom RSV-om.

Prilikom odabira citokina čije smo koncentracije određivali pokušali smo ispitati ispravnost teze da je neravnoteža između Th1 i Th2 odgovora glavni uzrok patoloških

promjena tijekom infekcije dišnih putova uzrokovane RSV-om. Stoga smo odredili koncentracije citokina prisutnih kod Th1 odgovora (IFN-γ i TNF-α) i Th2 odgovora (IL-4, IL-31 i IL-33). Također smo odredili koncentracije citokina koji se smatraju proupalnima (TNF-α, IL-1β i IL-6) i onih koji se smatraju protuupalnima, odnosno pripadaju Treg odgovoru (TGF-β1, IL-10, IL-35 i IL-37) kako bi procijenili njihovu ulogu u imunopatogenezi infekcije i našli poveznicu s ulogom AMP-a.

Malo je istraživanja koja su određivala koncentracije citokina u BAL-u djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om. Dio istraživača orijentirao se prvenstveno na IL-8 i dokazao da su njegove koncentracije povišene (81, 298). Zbog toga za većinu citokina koje smo obrađivali izostaje mogućnost usporedbe s ranijim rezultatima.

Izmjerene koncentracije citokina nisu potvrdile tezu o neravnoteži između Th1 i Th2 odgovora kao uzroku teže bolesti. Naime, koncentracije citokina koji usmjerava prema Th1 (IFN-γ) odnosno Th2 (IL-4) odgovoru bile su sporadično mjerljive te izrazito niske. Koncentracija TNF-α koji smo koristili kao pokazatelj Th1 odgovora bila je značajno povišena, no on sudjeluje i u Th17 odgovoru. Koncentracije Th2 citokina bile su neujednačene – IL-4, IL-31 i IL-33 su nađeni u niskim ili nemjerljivim koncentracijama, dok su koncentracije IL-6 i IL-10 bile povišene, no oni su produkt i Th17 (IL-6) i Treg odgovora (IL-10). Osim toga niti za jedan od navedenih citokina (kao ni za bilo koji citokin) nismo našli korelaciju s težinom bolesti. S obzirom da udio eozinofila u ukupnom broju leukocita u BAL-u ni u jednoga djeteta nije bio veći od 1%, vjerojatno nismo ni trebali očekivati povišene koncentracije IL-4.

Rezultate slične našima za IFN-γ i IL-4 dobili su Kim i suradnici (299). Oni su također uzimali BAL djeci s bronhiolitisom uzrokovanim RSV-om i našli nemjerljive vrijednosti IL-4, dok za IFN-γ nije bilo razlike između skupina (bronhiolitis uzrokovan RSV-om, astma, kontrole). S druge strane Semple i suradnici su dokazali povezanost nižih koncentracija IFN-γ i teže kliničke slike bronhiolitisa uzrokovanoga RSV-om (300). Oni su doduše određivali koncentraciju IFN-γ u ispirku nazofarinksa, no pokazali su da postoji dobra korelacija između koncentracije u ispirku nazofarinksa i u BAL-u. Bont je sa suradnicima prvo dokazao povezanost nižih koncentracija IFN-γ i IL-4 u krvi s težom bolešću, a potom i povezanost nižih koncentracija IFN-γ u ispirku nazofarinksa i teže bolesti (95, 301). Slični su dokazali i Nicholson i suradnici: više koncentracije IFN-γ i IL-4 u ispirku nazofarinksa donosile su manji rizik hospitalizacije zbog bronhiolitisa u djece mlađe od dvije godine (302). Iako su koncentracije IFN-γ u našoj studiji slične onima u studiji Semple i suradnika, u Bontovoj studiji koncentracije u ispirku nazofarinksa su desetorostruko više. Mogući problem naše

studije je činjenica da je samo sedmero djece imalo mjerljive koncentracije IFN-γ, što nas je moglo onemogućiti da dokažemo korelaciju s težinom bolesti.

Ranija istraživanja nude nam još jedno moguće objašnjenje zašto nismo dokazali povezanost koncentracija citokina Th1 i Th2 odgovora i težine bolesti. Naime Gonzales i suradnici su pokazali da RSV potiče sazrijevanje dendritičkih stanica, no da te stanice nisu sposobne aktivirati limfocite T (303). Zaključuju da problem nije u citokinima jer su našli povišene količine citokina oko stanica. Istraživanja Munira i suradnika ukazuju da bi nestrukturni proteini RSV-a mogli biti odgovorni za taj učinak (23, 24). Cespedes i suradnici su pokazali da bi N protein RSV-a mogao ometati prijenos signala između stanica koje prezentiraju antigen i CD4+ limfocita T (20).

Možemo zaključiti da naši rezultati ne potvrđuju tezu da neravnoteža Th1 i Th2 odgovora u korist Th2 odgovora doprinosi težini bolesti, odnosno ukoliko doprinosi to je u manjoj mjeri ili vrijedi samo za podskupinu bolesnika. Također, moguće je da neravnoteža nije posljedica promjena u lučenju citokina, već drugih mehanizama.

Rezultatima dominiraju značajno povišene koncentracije proupalnih citokina TNF-α, IL-1β i IL-6 u djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om u odnosu na zdravu djecu. To je očekivano s obzirom na povišene koncentracije antimikrobnih peptida koji imaju kemotaktički učinak na leukocite i povećavaju stvaranje proupalnih citokina. Osim toga TNF-α i IL-6 su važni za odstranjivanje patogena sa sluznica.

McNamara i suradnici su također našli značajno povišene koncentracije TNF-α i IL-6 u BAL-u djece mehanički ventilirane zbog bronhiolitisa uzrokovanoga RSV-om u odnosu na zdravu djecu (285). Nisu pokušali dokazati povezanost između koncentracije citokina i težine bolesti. Povišene koncentracije IL-6 u trahealnom aspiratu djece mehanički ventilirane zbog RSV bronhiolitisa dokazali su Mukherjee i suradnici, no ni oni nisu ispitivali povezanost s težinom bolesti (100).

Ispitivanja na životinjama i na kulturi stanica dala su kontradiktorne rezultate o ulozi TNF-α u infekciji RSV-om. Dok su neka pokazala da TNF-α ima protektivnu ulogu, u drugima je blokiranje TNF-α dovelo do blaže kliničke slike (304-306). Na rezultate je moglo utjecati vrijeme primjene/blokiranja TNF-α, ali i to radi li se o primarnoj infekciji ili reinfekciji. Prema istraživanju na mišjem modelu TNF-α u početku bolesti ima protektivnu ulogu, dok produljeno stvaranje pogoršava bolest (307). Iz navedenih istraživanja proizlazi da uloga TNF-α u infekciji RSV-om nije jednoznačna, u što se uklapaju i naši rezultati. Također, iako za sada ima samo sporadičnih opisa da terapijska primjena TNF-α inhibitora povećava

rizik od teških virusnih respiratornih infekcija, utjecaj na druge virusne bolesti može biti i povoljan i nepovoljan (308).

Studija Benneta i suradnika našla je povezanost koncentracije IFN-γ, IL-6, IL-8 i IL-10 u ispirku nazofarinksa i težine bronhiolitisa uzrokovanoga RSV-om – više koncentracije bile su povezane s blažom bolešću (309). Odrednica težine bolesti je kao i u našoj studiji bila trajanje ovisnosti o suplemetaciji kisika. Iako smo i mi dokazali više koncentracije IL-6 i IL-10, one nisu bile povezane s težinom bolesti. Dakle, nema potvrde da povećana produkcija proupalnih citokina TNF-α, IL-1β i IL-6 doprinosi težoj bolesti u djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om. Naravno, njihovo sudjelovanje u drugim aspektima imunološkog odgovora otežava donošenje zaključaka.

Odredili smo koncentracije četiri citokina koja se smatraju regulatornim na osnovu dokaza da suprimiraju imunološki odgovor tijekom virusnih infekcija i autoimunih bolesti (310, 311). To su TGF-β1, IL-10, IL-35 i IL-37. Koncentracije TGF-β1 i IL-10 bile su značajno povišene u djece s infekcijom RSV-om u odnosu na zdravu djecu. Međutim, nije bilo povezanosti između njihove koncentracije i težine bolesti. Pretpostavljamo da je složenost uloge TGF-β1 i IL-10 u imunološkom odgovoru kao i njihovo sudjelovanje u različitim tipovima odgovora CD4+ limfocita T razlog da nismo mogli odrediti njihovu ulogu u infekciji RSV-om. To posebno vrijedi za IL-10 za koji ima dokaza da tijekom infekcije RSV-om na mišjem modelu ublažava upalu i povoljno utječe na neravnotežu Th1 i Th2 odgovora, ali i da pojačava Th2 odgovor te bolest uzrokovanu RSV-om čini težom (312-314). Utjecaj može imati i vrijeme uzimanja uzorka jer je u navedenim studijama dominantan učinak IL-10 zabilježen iza sedmoga dana bolesti, u vrijeme razvijene stanične imunosti, dok je u našoj studiji većina uzoraka uzeta ranije. Ruan i suradnici su na mišjem modelu pokazali da IL-10 ima ulogu u redukciji količine RSV-a u plućima, vjerojatno potičući citotoksičnost (315). Iz njihovog istraživanja može se pretpostaviti da za IL-10 vrijedi isto što i za TNF-α – u početku bolesti ima protektivni učinak, a kasnije doprinosi težini bolesti. Fan i suradnici su pokazali da su koncentracije IL-10 i IL-35 više u krvi djece oboljele od bronhiolitisa uzrokovanoga RSV-om nego u kontrola i da su niže koncentracije IL-10, ali ne i IL-35 povezane s težom kliničkom slikom (316). Koncentracije TGF-β1 nisu se razlikovale između zdrave i bolesne djece, za razliku od rezultata naše studije. Činjenica da su koncentraciju navedenih citokina određivali u krvi i da vrijednosti nisu korigirali u odnosu na dan bolesti pri uzimanju uzorka otežava usporedbu s našom studijom.

Ranije je spomenuto da TGF-β1 povećava replikaciju RSV-a i da RSV potiče ekspresiju TGF-β1 u epitelnim stanicama (99). I druga istraživanja su potvrdila da TGF-β

olakšava replikaciju RSV-a, no mehanizam kojim to radi još nije posve razjašnjen (317, 318). Također, TGF-β se smatra odgovornim za preoblikovanje dišnih putova tijekom infekcije RSV-om koje dovodi do razvoja astme (317). Za procjenu ovih uloga TGF-β potrebno je odrediti koncentraciju virusa u dišnim putovima i prospektivno pratiti ispitanike što prelazi okvire ove studije.

Većina djece u kontrolnoj skupini imala je nemjerljivo niske koncentracije IL-35 u BAL-u, dok su koncentracije u bolesne djece bile niske (nemjerljive ili manje od 1 pg/mL). To je u suprotnosti s ranije navedenim istraživanjem koje je određivalo koncentracije IL-35 u djece s RSV infekcijom (316). Oni su obrađivali svu djecu inficiranu s RSV-om bez obzira na lokalizaciju bolesti i određivali koncentracije citokina u krvi. Iako su dokazali da je koncentracija IL-35 u bolesne djece značajno viša nego u kontrola, nije bilo korelacije između koncentracije IL-35 i težine bolesti. Vjerojatno su razlike u koncentraciji IL-35 u našoj i njihovoj studiji (više od 100 puta više koncentracije u njihovoj) ipak posljedica razlike u koncentraciji IL-35 između seruma i BAL-a, a niske koncentracije u BAL-u su nas onemogućile da nađemo statistički značajnu razliku između bolesnika i kontrola. Druge studije o ulozi IL-35 u infekciji RSV-om nismo našli.

Premda su gotovo sva uključena djeca imala mjerljive koncentracije IL-37, nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji između bolesne djece i kontrola. To i nije neobično s obzirom na njegovu kompleksnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora (319). Nismo našli literaturu koja se bavi ulogom IL-37 u infekciji RSV-om ni njegovim koncentracijama u BAL-u.

Činjenica je da smo našli povišene koncentracije IL-1β, IL-6 i TGF-β1 koji potiču diferencijaciju naivnih limfocita T u Th17. Povišeni TGF-β1 trebao bi poticati zaštitnu ulogu Th17 odgovora čemu u prilog govori povišena koncentracija IL-10, a ne mješoviti Th1Th17 odgovor. To potvrđuju niske koncentracije IFN-γ u naših bolesnika. Osim toga povišene su bile koncentracije IL-6 i TNF-α za koje se smatra da u sklopu Th17 odgovora doprinose odstranjenju mikroorganizma sa sluznica. Međutim s obzirom da nismo određivali citokine specifične za Th17 odgovor (IL-17, IL-21, IL-22 i IL-23) kao i da nismo našli korelaciju između koncentracije navedenih citokina i težine bolesti možemo zaključiti samo da je u naših bolesnika bio izražen citokinski profil koji odgovara protektivnom aspektu Th17 odgovora.

Međuodnosi medijatora imunološkog odgovora izuzetno su složeni i ovise o nizu čimbenika. Potrebne su stanice koje ih produciraju, odgovarajući receptori, signalni putovi, mehanizmi sinteze i lučenja i drugo. Isti medijator može imati suprotni učinak pri različitim

koncentracijama, a nekad suprotne učinke uzrokuje različitim mehanizmima. Većina medijatora ima utjecaj na koncentraciju više drugih medijatora, a neki mogu poticati vlastitu sintezu. Često lučenje jednoga medijatora potiče produkciju više njih u obliku kaskade. Više različitih tipova stanica može lučiti pojedini medijator, koji pak ima učinak na više tipova stanica. I RSV može utjecati na odnose između medijatora, na primjer blokadom receptora i redukcijom sinteze nekih medijatora, prvenstveno interferona (12, 15, 21). U konačnici, a možda i najvažnije, citokini žive kratko. Stoga je u istraživanju poput našega određivanje korelacije pojedinih medijatora teško za interpretirati.

Sve združenosti koje smo dokazali bile su pozitivne. Našli smo združenost koncentracija HNP1-3 s IL-10 i trend združenosti s IL-6. To je suprotno od podatka iz literature da HNP1-3 potiču stvaranje TNF-α i IL-1β, a smanjuju IL-10 (320). No radi se o ispitivanju na kulturi stanica u kontroliranim uvjetima, dok su u našoj studiji brojni čimbenici mogli utjecati na odnos HNP1-3 i citokina. Za većinu defenzina postoji citokin koji je njegov glavni induktor, ali i više citokina koji ga zajedno mogu inducirati (169). To znači da u indukciji pojedinih AMP-a može sudjelovati više citokina i više signalnih putova, što objašnjava razlike između naših rezultata i rezultata istraživanja na kulturi stanica u kojima je uobičajeno u svakom trenutku korišten samo jedan citokin.

HBD1 je pokazao pozitivnu korelaciju s TNF-α i trend korelacije s IL-6. Dobra korelacija između HBD1 i TNF-α nađena je i u trahealnim aspiratima novorođenčadi mehanički ventilirane zbog respiratorne ili sistemske infekcije, a IL-6 nije određivan (293). TNF-α ne utječe značajno na sintezu HBD1 u ljudskim keratinocitima, a podaci za IL-6 su kontradiktorni (321). U jednoj studiji su IL-6 i IL-10 povećavali produkciju HBD1, u drugoj je IFN-γ povećavao produkciju HBD1, a IL-6 nije, dok je u trećoj studiji IL-6 povećavao količinu glasničke RNK za HBD1, ali ne i produkciju samoga peptida (169, 178, 179). Dvije studije na ljudskim epitelnim stanicama dišnih putova pokazale su da IL-6 ne potiče sintezu HBD1 (161, 165). S obzirom da se HBD1 konstitutivno proizvodi u epitelnim stanicama, moguće razlike u bazalnoj sekreciji mogu značajno utjecati na rezultate.

Našli smo pozitivnu združenost HBD2 i IL-6, što je u suprotnosti s ranijim istraživanjima na kulturi respiratornih epitelnih stanica i ljudskih keratinocita koja su pokazala da IL-6 ne potiče sintezu HBD2 (161, 178). Istraživanje na keratinocitima gingive pokazalo je da IL-6 sporadično potiče sintezu HBD2 (169).

Možda je uzrok ove korelacije činjenica da RSV putem TNF-α aktivira NF-κB što rezultira povećanom sintezom HBD2, ali i IL-6 (221, 253). Povećana je i sinteza TNF-α, ali u

bitno manjoj mjeri, dok za druge citokine koje smo ispitivali nije bilo porasta ili nisu određivane koncentracije što bi objasnilo postojanje korelacije samo s IL-6.

Mišji beta-defenzin 2 potiče sazrijevanje dendritičkih stanica i povećanu produkciju IL-6 i Th1 citokina na mišjem modelu (186). Ukoliko isto vrijedi za ljudske beta-defenzine taj indirektni učinak mogući je uzrok korelacije.

HBD4 je pokazao trend združenosti s IL-10, no nismo našli podatke u literaturi za usporedbu.

Našli smo statistički značajnu združenost LL-37 i IL-6 i IL-10 te trend združenosti LL-37 i TGF-β1. Studija na monocitima pokazala je da LL-37 potiče stvaranje IL-10 u monocitima (265). Osim toga LL-37 ima sposobnost regulacije produkcije IL-6 ovisno o tipu podražaju i korištenom TLR-u (322). Ispitivanje na *air-liquid interface Calu-3* modelu, koji je najsličniji epitelu dišnih putova čovjeka, pokazalo je da primjena LL-37 prije ili za vrijeme infekcije RSV-om smanjuje sintezu IL-6 potaknutu RSV-om za oko trećine (255). Međutim, ni TGF-β1 ni IL-6 ne pokazuju pozitivnu spregu u regulaciji sinteze LL-37, barem u keratinocitima (178).

Možemo zaključiti da u literaturi ne nalazimo objašnjenja za nađene korelacije. Ne smijemo zaboraviti da sinteza AMP-a ovisi i o drugim signalnim putovima kao što je nuklearni faktor kappaB (NF-κB), ali i polimorfizmu njihovih gena, što može utjecati na njihove koncentracije i nađene korelacije. U literaturi smo našli oskudne podatke o utjecaju AMP-a na sintezu citokina koji bi objasnili nađene korelacije. Stoga je moguće objašnjenje da su korelacije posljedica poticanja sinteze citokina utjecajem AMP-a na stanice koje ih luče. Drugo moguće objašnjenje je da aktivacija pojedinih signalnih putova, na primjer NF-κB, istovremeno dovodi do povećane proizvodnje AMP-a i citokina.

Osim toga, u rezultatima uočavamo zanimljiv uzorak – združenost ispitanih AMP-a i IL-6, IL-10, TNF-α te TGF-β1. To su citokini sa značajnim regulatornim djelovanjem pa se nameće zaključak da ta korelacija naglašava važnost imunomodulatornog učinak ispitanih AMP-a.

Istražili smo korelaciju pojedinih AMP-a i citokina s težinom bolesti krenuvši s pretpostavkom da AMP-i u dišnim putovima pojačavaju upalni odgovor i na taj način bolest čine težom. Kao moguće odrednice težine bolesti pratili smo trajanje hospitalizacije, trajanje boravka u jedinici intenzivnoga liječenja te trajanje respiratorne potpore (koja uključuje mehaničku ventilaciju i suplementaciju kisika). U konačnici smo odabrali trajanje respiratorne potpore jer je najmanje podložna subjektivnim procjenama i paramedicinskim utjecajima. Također, na nju su i najmanje utjecale nozokomijalne infekcije – bakterijska infekcija dišnih

putova u nekih je bolesnika produljila boravak u jedinici intenzivnoga liječenja, ali nije produljila ukupno trajanje respiratorne potpore, dok su druge nozokomijalne infekcije mogle produljiti trajanje hospitalizacije. Odabrali smo i najmanju vrijednost omjera parcijalnoga tlaka kisika u arterijskoj krvi i udjela kisika u udahnutom zraku jer smo smatrali da bolje izražava težinu bolesti nego vrijednost na dan prijema ili bronhoskopije. Računali smo i PIM2 skor, no nismo ga koristili u statističkoj analizi jer nije dobro korelirao s druge dvije odrednice težine bolesti, dok su trajanje respiratorne potpore i PaO2/fiO2 bili u dobroj međusobnoj korelaciji.

Kada smo određivali povezanost koncentracije AMP-a i težine bolesti svu djecu s infekcijom RSV-om smatrali smo jednom skupinom. S obzirom na mali broj uključenih ispitanika određivanje korelacije po podskupinama ne bi imalo smisla jer bi broj bio premali za postizanje statističke značajnosti. Uz to bakterijska superinfekcija, bez obzira na lokalizaciju, mogla je utjecati samo na jednu odrednicu težine bolesti koje smo određivali – najmanju vrijednost PaO2/fiO2. Na duljinu trajanja respiratorne potpore nije utjecala jer je u svih pravovremeno započeto antimikrobno liječenje pa je za nekoliko dana samo bronhiolitis određivao potrebu za respiratornom potporom. Potvrdu ovakvom prosuđivanju daje nam dobra korelacija između dvije navedene odrednice težine bolesti.

Od svih analiziranih AMP-a i citokina jedino je HBD2 pokazao dobru korelaciju s pokazateljima težine bolesti, koja je bila statistički značajna za PaO2/fiO2. Suprotno našim očekivanjima više koncentracije HBD2 u BAL-u bile su povezane s višim PaO2/fiO2, dakle s blažom bolešću. Iz toga možemo zaključiti da HBD2 djeluje protektivno u infekciji donjih dišnih putova uzrokovanoj RSV-om. Dva osnovna načina kojima to može postići su direktno antivirusno djelovanje i regulacija imunološkog odgovora.

Antimikrobno djelovanje HBD2 dokazano je samo u jednoj studiji na kulturi ljudskih stanica i na mišjem modelu (221). Koristili su koncentracije od 1 μg/mL naviše, dok smo mi zabilježili višestruko niže koncentracije HBD2 u BAL-u (medijan 160 pg/mL). Međutim, BAL predstavlja razrijeđen uzorak i preporučuje se određivanjem ureje u serumu i BAL-u korigirati razrjeđenje (323). Na taj način moguće je izračunati udio tekućine koja prekriva respiratorni epitel (ELF, engl. *epithelial lining fluid*) u BAL-u te izračunati koncentracije određivanih molekula u ELF-u. Na žalost, mi to nismo određivali, ali možemo koristiti studije koje su pokazale da je pretpostavljeni udio ELF-a u BAL-u jedan do sedam posto i da je veći što su djeca mlađa (324-326). Po tome bi medijan koncentracije HBD2 u ELF-u naših bolesnika bio manji od 16 ng/mL. Navedena vrijednost je još uvijek bitno niža od one koju su Kota i suradnici koristili da bi pokazali direktni antivirusni učinak HBD2. Ipak, potrošnja

HBD2 u kompleksu s virusom putem fagocitoze smanjuje njegovu koncentraciju u BAL-u. Osim toga, nije dokazano da protutijela koja se koriste u ELISA-i dokazuju i HBD2 koji je u kompleksu s virusom, zbog čega bi stvarna koncentracija HBD2 mogla biti veća od izmjerene. S druge strane osjetljivost mikroorganizama na učinak AMP-a može biti veća ovisno o ionskom naboju okruženja. Primjer je veća osjetljivost bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* na LL-37 u otopinama koje sadrže karbonate (327). Učinkovitost AMP-a veća je u područjima s malo soli: unutar stanica, u fagocitnim vakuolama i na površini kože i sluznica. Stoga ne možemo odbaciti mogućnost da je u djece oboljele od infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om HBD2 imao antivirusni učinak i na taj način povoljno utjecao na težinu bolesti.

Povoljan učinak beta-defenzina na imunološki odgovor pokazan je na mišjem modelu (249). Morbiditet i mortalitet miševa s delecijom gena za mišji beta-defenzin 1 zaraženih virusom gripe bio je veći nego u divljih miševa. Iako su količine virusa u plućima bile podjednake u obje skupine miševa, oni s deletiranim genom imali su više upalnih stanica u plućima, izraženiji perivaskularni edem i difuznu alveolarnu hemoragiju. Očito je beta-defenzin ograničavao imunološki i upalni odgovor, a nije utjecao na replikaciju virusa. Na sličan zaključak navodi nas istraživanje Wohlford-Lenane i suradnika (328). Oni su theta-defenzin rezus makaki majmuna davali intranazalno miševima zaraženima koronavirusom uzročnikom teškog akutnoga respiratornog distresa. Time su u svih izloženih miševa postigli izlječenje infekcije čija je smrtnost u neliječenih miševa bila oko 70%. Pokazali su da je količina virusa u dišnim putovima bila podjednaka, no da su miševi koji su primali theta-defenzin imali manje patoloških promjena u plućima i niže koncentracije proupalnih citokina. U navedenim primjerima defenzini neovisno o antivirusnom učinku sprečavaju prejaki imunološki odgovor.

S druge strane, Kim i suradnici pokazali su da HBD2 u monocitima izloženim virusu povećava stvaranje interferona i kemokina važnih za prirođenu imunost i ekspresiju gena uključenih u antivirusni odgovor (197). Ustanovili su i da u miševa HBD2 značajno povećava količinu stvorenih neutralizirajućih specifičnih protutijela nakon izlaganja virusu. Iz toga proizlazi da je direktno antivirusno djelovanje HBD2 nadopunjeno i pojačavanjem efektorskih mehanizama prirođene i stečene imunosti.

To je ustanovljeno i za mišji beta-defenzin 2 koji privlači stanice koje prezentiraju antigen, potiče njihovo sazrijevanje i stvaranje citokina koji pojačavaju Th1 tip odgovora (186). Taj je učinak ovisan o TLR-4, jednako kao i antibakterijski učinak HBD2 (329). Ukoliko uistinu neravnoteža između Th1 i Th2 odgovora doprinosi imunopatogenezi

bronhiolitisa uzrokovanoga RSV-om, beta-defenzini svojim djelovanjem na stanice koje prezentiraju antigen mogu smanjiti tu neravnotežu i tako ublažiti težinu bolesti. Na taj način beta-defenzini mogu promocijom antivirusnog urođenog i stečenog Th1 imunološkog odgovora povoljno utjecati na tijek virusne infekcije, što je moguće objašnjenje povoljnog učinka HBD2 na težinu bolesti u našoj studiji.

Važnost HBD2 u infekciji donjih dišnih putova naglašava i istraživanje Arnasona i suradnika (330). Oni su pokazali da je produkcija HBD2 tijekom koinfekcije rinovirusom i bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* značajno manja u epitelnim stanicama dišnih putova ljudi oboljelih od kronične opstruktivne plućne bolesti nego u istovjetnim stanicama zdravih osoba. Autori zaključuju da smanjeno stvaranje HBD2 doprinosi težini egzacerbacija uzrokovanih infekcijom u tih bolesnika.

Wang i suradnici su pokazali da HBD2 štiti keratinocite od djelovanja proteaza koje luči *Staphyloccocus aureus* (331). IL-1β je poticao lučenje HBD2, a učinak HBD2 nije se bazirao na antimikrobnom djelovanju.

Iz svega navedenoga zaključujemo da je povoljan učinak HBD2 na težinu bolesti iskazan u našem istraživanju vjerojatnije posljedica modifikacije imunološkog odgovora nego direktnog antivirusnoga djelovanja. Tom zaključku pridonosi i činjenica da nismo dokazali dobru korelaciju koncentracije LL-37 u BAL-u i težine bolesti iako i LL-37 ima dokazani virusni učinak na RSV.

Velika studija Mansbacha i suradnika pokazala je povezanost između niže serumske koncentracije LL-37 i teže kliničke slike bronhiolitisa (254). Također, u djece s nižim koncentracijama LL-37 glavni uzročnik bio je RSV, a u onih s višim koncentracijama rinovirus, što može sugerirati da RSV inhibira sintezu LL-37, ali i da djeca s bazalno nižom produkcijom LL-37 imaju težu bolest uzrokovanu RSV-om. Slična studija pokazala je da djeca s nižim serumskim koncentracijama LL-37 imaju teži bronhiolitis ako u nazofaringealnoj flori dominira *Haemophilus* (332). Mi nismo dokazali da postoji povezanost između koncentracije LL-37 u BAL-u i težine bolesti. Osim toga, koncentracije LL-37 u BAL-u bile su više u bolesnika nego u kontrolnoj skupini, što je doduše bilo izraženije za bolesnike s bakterijskom superinfekcijom. Pretpostavljeni uzrok ove diskrepance u rezultatima studija je nepostojanje korelacije između koncentracije LL-37 u serumu i u BAL-u. Na žalost, nijedna studija nije određivala koncentracije u oba uzorka pa tu tezu ne možemo provjeriti.

Glavni nedostatak našeg istraživanja je mali broj uključenih bolesnika. Iako je taj broj dovoljno velik za valjanost zaključaka i pouzdanost statističke obrade, vjerojatno nas sprečava

da bolje procijenimo ulogu AMP-a u infekciji RSV-om i njihovu povezanost s drugim medijatorima upale. Mali broj bolesnika u kombinaciji s drugim problemima koje ću navesti onemogućuje nas da iz rezultata izvedemo patogenetski model uloge AMP-a u infekciji RSV-om.

Prilikom interpretacije rezultata ne smijemo zaboraviti da se većina do sada spomenutih interakcija između mikroorganizama, AMP-a, citokina i medijatorskih stanica odvija preko različitih signalnih putova. Učinkovitost tih signalnih putova može značajno varirati između pojedinaca i rezultirati različitim koncentracijama pojedinoga AMP-a ili citokina, što u ovako maloj studiji može bitno utjecati na rezultate.

Osim toga postoje razlike u produkciji AMP-a između pojedinaca koje mogu utjecati na ovakva istraživanja. Joly tvrdi da su različiti odgovori AMP-a na mikroorganizme posljedica razlike u bazalnoj sekreciji (169).

Dokazane su i razlike u stvaranju AMP-a između zdravih ljudi i kroničnih bolesnika. Dauletbaev i suradnici su ispitivali koncentracije HBD1 i HBD2 u sluznici nosa zdravih dobrovoljaca, dobrovoljaca koji su imali akutnu infekciju gornjih dišnih putova (obična prehlada) i bolesnika s cističnom fibrozom (333). Pokazali su da u inače zdravih osoba tijekom prehlade dolazi do značajnoga porasta koncentracija HBD1 i HBD2 i da te koncentracije koreliraju s koncentracijama surogatnih biljega upale. S druge strane u bolesnika oboljelih od cistične fibroze nije bilo porasta HBD1 i HBD2 kao odgovor na upalni podražaj. Sličan je zaključak dvaju istraživanja s ljudskim rinovirusom. Kada su zdravi dobrovoljci bili zaraženi ljudskim rinovirusom porast koncentracije HBD2 u ispirku nazofarinksa zabilježen je već dva dana nakon inokulacije, odnosno jedan dan nakon pojave simptoma (264). U drugoj studiji bolesnici s kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću zaraženi su rinovirusom i kod njih je u uzorcima sputuma tek 21. dan nakon inokulacije zabilježen značajan porast koncentracije HBD2, i to samo u skupini nepušača (291). Najviše količine virusa u sputumu zabilježene su peti i deveti dan bolesti što znači da u tih ispitanika ljudski rinovirus uopće nije poticao produkciju HBD2. Iako je naše istraživanje uključilo samo dvoje djece s kroničnom bolešću, uključeno je četvero prematurno rođene djece. I u njih može postojati razlika u produkciji AMP-a, ali i drugim efektorskim mehanizmima imunološkoga sustava.

Postoje i razlike u ekspresiji gena za AMP-e koje mogu utjecati na koncentracije AMP-a. Znamo da geni za HBD2 i HBD3 mogu imati varijabilni broj kopija, što dovodi do razlika u koncentraciji tih defenzina između pojedinaca, dok to ne vrijedi za gen za HBD1 (334). Međutim, pojedinci na različite podražaje odgovaraju različitim stvaranjem HBD1 što

znači da postoje genske varijacije i u slučaju HBD1. Duits i suradnici su ispitivanjem na monocitima također ukazali na individualne razlike u ekspresiji gena za HBD1 i HBD2 (126). Potvrda tome su i dva neovisna istraživanja koja su pokazala razliku u inducibilnosti sinteze HBD1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi kao odgovor na podražaj lipopolisaharidom, kao i u dendritičkim stanicama na podražaj herpes simpleks virusom (134, 335, 336).

Navedene razlike u produkciji AMP-a postoje i za druge molekule koje sudjeluju u imunološkom odgovoru, a zorno pokazuju probleme studija o imunopatogenezi infekcije RSV-om.

Mogući nedostatak studije je i činjenica da nismo određivali genotip virusa s obzirom da on može utjecati na težinu bolesti, ali i na imunološki odgovor (337). Ipak s obzirom da je tijekom ispitivanoga perioda u Hrvatskoj dominirao genotip NA1 to ne bi smjelo značajno utjecati na rezultate (338).

Zaključno možemo reći da smo potvrdili hipotezu da su koncentracije ispitivanih antimikrobnih peptida (osim HBD4) povišene u BAL-u djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om. Također, pobili smo hipotezu da AMP-i doprinose oštećenju tkiva tijekom infekcije RSV-om, a pokazali da HBD2 ima protektivni učinak u infekciji donjih dišnih putova uzrokovanoj RSV-om. Dojam je da to ne ostvaruje isključivo izravnim antivirusnim učinkom već svojim utjecajem na imunološki odgovor, no daljnja istraživanja trebaju razriješiti ovu dilemu.

7. ZAKLJUČAK

Rezultati osnovne laboratorijske obrade nisu značajno odstupali od referentnih vrijednosti u djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om. Iznimka su povišene vrijednosti CRP-a u djece sa sekundarnom bakterijskom infekcijom dišnih putova.

Neutrofili su bili predominantne stanice u BAL-u djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om što je u skladu s ranijim studijama.

Koncentracije proteina u BAL-u bile su značajno više u oboljele djece nego u kontrola što je također u skladu s ranijim studijama.

Apsolutne koncentracije svih ispitanih AMP-a osim HBD4 (HNP1-3, HBD1, HBD2, LL-37) u BAL-u bile su značajno više u oboljele nego u zdrave djece. Prisutnost sekundarne bakterijske infekcije nije uzrokovala razlike u koncentracijama AMP-a. Možemo zaključiti da navedeni AMP-i imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru tijekom infekcije dišnih putova uzrokovane RSV-om.

Razlike u koncentraciji HNP1-3 između bolesne djece i kontrola bile su još izraženije nakon podešenja za koncentraciju proteina u BAL-u i vrijeme proteklo od početka simptoma do uzorkovanja BAL-a. To nije neobično s obzirom da neutrofili koji su izvor HNP1-3 čine više od polovice stanica u BAL-u oboljele djece.

Naši rezultati nisu potvrdili tezu da je teža bolest uzrokovana RSV-om posljedica neravnoteže između Th1 i Th2 odgovora.

Koncentracije proupalnih citokina TNF-α, IL-1β i IL-6 bile su značajno povišene u djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om u odnosu na zdravu djecu. Koncentracije IL-1β i IL-6 bile su više u djece s bakterijskom superinfekcijom.

Pozitivnu združenost našli smo između koncentracija HNP1-3 i IL-10, HBD1 i TNF-α, HBD-2 i IL-6 te LL-37 i IL-6 i IL-10. Možemo samo uočiti da se radi o citokinima s proupalnim i protuupalnim djelovanjem na imunološki odgovor.

Dokazali smo da HBD2 ima protektivni učinak u infekciji RSV-om. Njegova koncentracija u BAL-u bila je negativno združena s težinom bolesti.

Koncentracije HBD2 u BAL-u bolesne djece niže su od koncentracija koje su korištene u istraživanjima koja su dokazala antivirusni učinak HBD2 na RSV. Ipak, s obzirom na brojne čimbenike koji mogu utjecati na izmjerenu koncentraciju HBD2 i na njegov antivirusni učinak, ne možemo odbaciti mogućnost da je protektivni učinak u infekciji RSV-om dijelom posljedica njegovog antivirusnoga djelovanja.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Glavni cilj istraživanja bio je odrediti ulogu antimikrobnih peptida HNP1-3, HBD1, HBD2, HBD4 i LL-37 u imunopatogenezi infekcije donjih dišnih putova u djece uzrokovane RSV-om. Osim toga, željeli smo ispitati njihovu povezanost s određenim citokinima (TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-33, IL-35, IL-37, IFN-γ, TGF-β1). Ispitali smo kliničke i laboratorijske osobitosti bolesti u djece mlađe od 7 godina s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om. Odredili smo koncentracije navedenih AMP-a i citokina u uzorcima BAL-a djece s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om i zdrave djece te ih usporedili. Tražili smo korelacije između koncentracija pojedinih ispitanih AMP-a i citokina u BAL-u. Ispitati smo ovisi li težina kliničke slike o koncentracijama navedenih AMP-a i citokina, odnosno utječe li neki od AMP-a i citokina na težinu bolesti.

Ispitanici i metode: Istraživanje smo koncipirali kao opservacijsku presječnu studiju koja obuhvaća analizu anamnestičkih, kliničkih i laboratorijskih karakteristika bolesnika s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om kao i određivanje i analizu koncentracija AMP-a i citokina u BAL-u sve uključene djece. U istraživanje smo uključili 21 dijete liječeno u KZIB zbog infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om koje je bronhoskopirano. Dijagnozu infekcije donjega dijela dišnoga sustava postavili smo klinički, a RSV smo dokazali iz respiratornih uzoraka metodom izravne fluorescencije ili molekularnom metodom. Devetero djece imalo je sekundarnu bakterijsku infekciju dišnih putova. Kontrolnu skupinu čini devetero djece bez akutnih i kroničnih bolesti primljene u Klinički bolnički centar „Sestre milosrdnice“ radi elektivnog operativnoga zahvata u općoj anesteziji. U njih je odmah po intubaciji uzet ne-bronhoskopski BAL. Prisutnost i koncentracija AMP-a i citokina u uzorcima BAL-a određena je komercijalno dostupnim kvantitativnim imunoenzimskim testovima. Korištene su uobičajene statističke metode, a učinjeni su univarijatni i multivarijatni testovi s podešenjima varijabli.

Rezultati: Djeca u skupini oboljelih imala su značajno višu koncentraciju proteina u BAL-u nego djeca u kontrolnoj skupini, a nije bilo vidljive razlike između djece s ili bez bakterijske superinfekcije. Koncentracije u BAL-u svih ispitanih AMP-a osim HBD4 bile su značajno više u oboljele djece nego u kontrola. Koncentracije TNF-α u BAL-u bile su značajno više u djece inficirane RSV-om s višim vrijednostima u podskupini djece bez bakterijske infekcije, a koncentracije IL-1β, IL-10 i TGF-β1 bile su više u skupini bolesne djece nego u kontrolnoj

skupini, no bez razlike u podskupinama. Podešenjem koncentracija AMP-a i citokina u BAL-u za koncentraciju proteina u BAL-u i vrijeme proteklo od početka simptoma do uzimanja BAL-a dobili smo sljedeće rezultate: značajno više koncentracije TNF-α, IL-10, HBD1 i posebno HNP1-3 (oko 50 puta više) u oboljele djece u odnosu na kontrolnu skupinu bez obzira na bakterijsku superinfekciju; značajno više koncentracije IL-6, IL-1β i LL-37 u djece oboljele od infekcije RSV-om s bakterijskom superinfekcijom; nepostojanje značajne razlike između bolesnika i kontrola u koncentracijama IL-37, TGF-β1, HBD2 (iako s tendencijom višim vrijednostima u oboljelih) i HBD4. U 21 bolesnika s infekcijom RSV-om određivanjem korelacije između koncentracija pojedinih antimikrobnih peptida i citokina u BAL-u uočili smo sljedeće (univarijatne) združenosti: više koncentracije HBD1 i viših koncentracija TNF-α te trend združenosti (τ=0.327) između viših koncentracija HBD1 i IL-6; više koncentracije HBD2 i viših koncentracija IL-6; trend združenosti (τ=0.271) viših koncentracija HBD4 i IL-10; više koncentracije HNP1-3 i viših koncentracija IL-10 te trend združenosti s višim koncentracijama IL-6 (τ=0.289); više koncentracije LL-37 i viših koncentracija IL-6 i IL-10 te trend združenosti s višim koncentracijama TGF-β1 (τ=0.265). Dva pokazatelja težine bolesti koje smo odabrali (najmanja vrijednost PaO2/fiO2 tijekom bolesti i dani suplementacije kisika) bila su usporediva u djece s i bez bakterijske superinfekcije. Viša najniža vrijednost PaO2/fiO2 bila je združena s kraćim vremenom suplementacije kisika (Kendall τ=-0.384). Našli smo univarijatnu povezanost između koncentracije HBD2 u BAL-u i težine bolesti – više koncentracije bile su povezane s višim PaO2/fiO2 s izraženim trendom kraćega vremena ovisnosti o suplementaciji kisika kod viših koncentracija HBD2. Povezanost viših vrijednosti PaO2/fiO2 i viših koncentracija HBD2 u BAL-u ostala je statistički značajna nakon podešenja za dob, vrijeme od početka bolesti do uzimanja BAL-a i koncentracije proteina u BAL-u: koeficijent regresije pokazao je porast vrijednosti PaO2/fiO2 od 5.3 jedinice (95% CI 0.7 do 9.8) za porast koncentracije HBD2 u BAL-u od 100 pg/mL. Vrijednosti koncentracije ostalih citokina i AMP-a ispitani su univarijatnom analizom i u multivarijatnim modelima i nismo našli značajnu povezanost koncentracije nekoga citokina ili AMP-a s ijednim od korištenih pokazatelja težine bolesti.

Zaključak: Djeca s infekcijom donjih dišnih putova uzrokovanom RSV-om imala su značajno više koncentracije svih ispitanih AMP-a osim HBD4 (HNP1-3, HBD1, HBD2, LL-37) u BAL-u odnosu na zdravu djecu. Prisutnost sekundarne bakterijske infekcije nije utjecala na zastupljenost mjerenih AMP-a. Stoga zaključujem da navedeni AMP-i imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru tijekom infekcije donjih dišnih putova uzrokovane RSV-om.

Koncentracije TNF-α u BAL-u bile su značajno više u djece inficirane RSV-om nego u zdrave djece, s višim vrijednostima u podskupini djece bez bakterijske infekcije, a koncentracije IL-1β, IL-10 i TGF-β1 bile su više u skupini bolesne djece nego u kontrolnoj skupini, no bez razlike po podskupinama. Našli smo pozitivnu združenost između koncentracija HNP1-3 i IL-10, HBD1 i TNF-α, HBD-2 i IL-6 te LL-37 s IL-6 i IL-10. Možemo samo primijetiti da se radi o citokinima sa značajnim proupalnim i protuupalnim djelovanjem. Na osnovu inverzne korelacije između koncentracije HBD2 i težine bolesti zaključujemo da HBD2 ima protektivnu ulogu u infekciji donjih dišnih putova uzrokovanoj RSV-om. Iako su koncentracije izmjerene u BAL-u oboljele djece značajno niže od onih za koje je dokazan antivirusni učinak na RSV, ne možemo odbaciti mogućnost da HBD2 barem dio protektivnog učinka ostvaruje antivirusnim djelovanjem. Drugi mogući mehanizam je precizno podešavanja imunološkog odgovora. Naši rezultati ukazuju na važnost HBD2 u obrani od infekcije RSV-om i na potrebu daljnjeg istraživanja uloge HBD2.

9. SUMMARY

ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN CHILDREN WITH RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION

Srđan Roglić

PhD Thesis, 2019.

Objective: To investigate the role of antimicrobial peptides HNP1-3, HBD1, HBD2, HBD4 and LL-37 in children with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection.

Patients and methods: Antimicrobial peptides levels were measured by immunosorbent assay in bronchoalveolar lavage fluid in 21 children with respiratory syncytial virus infection (of whom nine had bacterial superinfection) and nine healthy children.

Results: Unadjusted comparisons indicated significantly higher HBD1, HBD2, HNP1-3 and LL-37 concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in children with RSV infection *vs*. controls. Univariate association between BAL concentration of HBD2 and disease severity indicator was found – higher concentrations were associated with higher PaO2/fiO2 min. The association remained significant after adjustment.

Conclusion: Antimicrobial peptides HNP1-3, HBD1, HBD2 and LL-37 play an important role in respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in children. HBD2 stands out among them with a definite protective role.

10. POPIS LITERATURE

1. Morris JA, Blount RE, Savage RE. Recovery of cytopathic agent from chimpanzees with coryza. Proc Soc Exp Biol Med. 1956;92(3):544-9.
2. Afonso, CL, Amarasinghe GK, Banyai K, i sur. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. Arch. Virol. 2016;161(8):2351-60.
3. Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. J Gen Virol. 1987;68(Pt 9):2521–4.
4. Openshaw PJ, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. Clin Microbiol Rev. 2005;18(3):541–5.
5. Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. J Virol. 2001;75(22):10730-7.
6. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. J Infect Dis. 1991;163(4):693-8.
7. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, i sur. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. J. Infect Dis. 1985;151(4):626–33.
8. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, i sur. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. PLoS One 2012;7:e32807.
9. Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. J Infect Dis. 1997;175(4):814-20.
10. Midulla F, Nenna R, Scagnolari C, i sur. How Respiratory Syncytial Virus Genotypes Influence the Clinical Course in Infants Hospitalized for Bronchiolitis. J Infect Dis. 2018 Sep 11. doi: 10.1093/infdis/jiy496. [Epub ahead of print].
11. Bukreyev A, Yang L, Collins PL. The secreted G protein of human respiratory syncytial virus antagonizes antibody-mediated restriction of replication involving macrophages and complement. J Virol. 2012;86(19):10880–4.
12. Polack FP, Irusta PM, Hoffman SJ, i sur. The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(25):8996–9001.

13. Johnson TR, McLellan JS, Graham BS. Respiratory syncytial virus glycoprotein G interacts with DC-SIGN and L-SIGN to activate ERK1 and ERK2. J Virol. 2012;86(3):1339–47.
14. Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng H, Murphy PM, Anderson LJ. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. Nat Immunol. 2001;2(8):732–8.
15. Chirkova T, Boyoglu-Barnum S, Gaston KA, i sur. Respiratory syncytial virus G protein CX3C motif impairs human airway epithelial and immune cell responses. J Virol. 2013;87(24):13466-79.
16. Harcourt J, Alvarez R, Jones LP, Henderson C, Anderson LJ, Tripp RA. Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1+ T cell responses. J Immunol. 2006;176(3):1600–8.
17. Carter SD, Dent KC, Atkins E, i sur. Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability. FEBS Lett. 2010;584(13):2786–90.
18. Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. J. Virol. 2007;81(15):8361–6.
19. Lin Y, Bright AC, Rothermel TA, He B. Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. J Virol. 2003;77(6):3371-83.
20. Céspedes PF, Bueno SM, Ramírez BA, i sur. Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(31):E3214-23.
21. Lo MS, Brazas RM, Holtzman MJ. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. J Virol. 2005;79(14):9315-9.
22. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, i sur. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. J Virol. 2006;81(4):1786-95.
23. Munir S, Le Nouen C, Luongo C, Buchholz UJ, Collins PL, Bukreyev A. Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. J Virol. 2008;82(17):8780-96.
24. Munir S, Hillyer P, Le Nouën C, i sur. Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response. PLoS Pathog. 2011;7(4):e1001336.

25. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, i sur. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children, N Engl J Med 2009;6(360):588-98.
26. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, i sur., for the RSV Global Epidemiology Network. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. Lancet. 2017;390(10098):946-58.
27. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, i sur. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and metaanalysis. Lancet 2010;375(9725):1545–55.
28. Scheltema NM, Gentile A, Lucion F, i sur. Global respiratory syncytial virus-associated mortality in young children (RSV GOLD): a retrospective case series. Lancet Glob Health. 2017;5(10):e984-e991.
29. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. N Engl J Med. 2005;352(17):1749-59.
30. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, i sur. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. JAMA. 2003;289(2):179-86.
31. Mlinarić-Galinović G, Jović M, Knezović I, i sur. Epidemiološke osobine infekcija respiratornim sincicijskim virusom tijekom 2009 i 2010 godine u Zagrebu i zagrebačkoj županiji. Medicina Fluminensis. 2012;48(1):79-84.
32. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. Am J Dis Child. 1986;140(6):543–6.
33. Ukkonen P, Hovi T, Von Bonsdorff CH, i sur. Age specific prevalence of complement fixing antibodies to sixteen viral antigens: a computer analysis of 58 500 patients covering a period of 8 years. J Med Virol. 1984;13(2):131–48.
34. Hall CB, Hall WJ, Speers DM. Clinical and physiological manifestations of bronchiolitis and pneumonia. Outcome of respiratory syncytial virus. Am J Dis Child. 1979;133(8):798-802.
35. Goldmann DA. Transmission of viral respiratory infections in the home. Pediatr Infect Dis J. 2000;19(10Suppl.):S97-S102.
36. Meissner HC. Viral Bronchiolitis in Children. N Engl J Med. 2016;374(1):62-72.
37. Jain S, Williams DJ, Arnold SR, i sur. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. N Engl J Med. 2015;372(9):835-45.
38. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. Clin Microbiol Rev. 2000;13(3):371-84.

39. Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncycial virus infection. Mod Pathol. 2007;20(1):108–19.
40. Aherne W, Bird T, Court SD, i sur. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. J ClinPathol. 1970; 23(1):7-18.
41. Greenough A, Cox S, Alexander J, et al. Health care utilization of infants with chronic lung disease, related to hospitalization for RSV infection. Arch Dis Child. 2001;85(6):463–8.
42. Wang EE, Law BJ, Stephens D. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. J Pediatr. 1995;126(2):212–9.
43. Shay DK, Holman RC, Roosevelt GE, Clarke MJ, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979–1997. J Infect Dis. 2001;183(1):16–22.

44. Chan PW, Lok FY, Khatijah SB. Risk factors for hypoxemia and respiratory failure in respiratory syncytial virus bronchiolitis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002;33(4):806–10.
45. Haerskjold A, Kristensen K, Kamper-Jørgensen M, Nybo Andersen AM, Ravn H, Graff Stensballe L. Risk Factors for Hospitalization for Respiratory Syncytial Virus Infection: A Population-based Cohort Study of Danish Children. Pediatr Infect Dis J. 2016;35(1):61-5.
46. Hertz MI, Englund JA, Snover D, i sur. Respiratory syncytial virus-induced acute lung injury in adult patients with bone marrow transplants: a clinical approach and review of the literature. Medicine 1989;68(5):269-81.
47. Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adults. Semin Respir Crit Care Med. 2007; 28(2):171–81.
48. O'Shea MK, Ryan MA, Hawksworth AW, Alsip BJ, Gray GC. Symptomatic respiratory syncytial virus infection in previously healthy young adults living in a crowded military environment. Clin Infect Dis. 2005;41(3):311-7.
49. Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Evidence based clinical practice guideline for medical management of bronchiolitis in infants less than 1 year of age presenting with a first time episode. Cincinnati (OH): Cincinnati Children's Hospital Medical Center; 2006 May. 13 p.
50. Shaw KN, Bell LM, Sherman NH. Outpatient assessment of infants with bronchiolitis. Am J Dis Child. 1991;145(2):151–5.

51. Chartrand C, Tremblay N, Renaud C, Papenburg J. Diagnostic Accuracy of Rapid Antigen Detection Tests for Respiratory Syncytial Virus Infection: Systematic Review and Meta-analysis. J Clin Microbiol. 2015;53(12):3738-49.
52. King JC Jr, Burke AR, Clemens JD, i sur. Respiratory syncytial virus illnesses in human immunodeficiency virus- and noninfected children, Pediatr Infect Dis. J 1993;12(9):733–9.
53. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, i sur, and the American Academy of Pediatrics. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. Pediatrics 2014;134:e1474–502.
54. Mazur NI, Martinón-Torres F, Baraldi E, i sur. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. Lancet Respir Med. 2015;3(11):888-900.
55. Mandelberg A, Tal G, Witzling M, i sur. Nebulized 3% hypertonic saline solution treatment in hospitalized infants with viral bronchiolitis. Chest 2003;123(2):481–7.
56. Anil AB, Anil MM, Saglam AB, i sur. High Volume Normal Saline Alone Is as Effective as Nebulized Salbutamol-Normal Saline, Epinephrine-Normal Saline, and 3% Saline in Mild Bronchiolitis. Pediatr Pulmonol 2010;45(1):41–7.
57. Zhang L, Mendoza-Sassi RA, Wainwright C, Klassen TP. Nebulized hypertonic saline solution for acute bronchiolitis in infants. Cochrane Database Syst Rev 2008;(4):CD006458.
58. Kuzik BA, Al-Qadhi SA, Kent S, i sur. Nebulized hypertonic saline in the treatment of viral bronchiolitis in infants. J Pediatr 2007;151(3):266-70.
59. Hoover J, Eades S, Lam WM. Pediatric Antiviral Stewardship: Defining the Potential Role of Ribavirin in Respiratory Syncytial Virus-Associated Lower Respiratory Illness. J Pediatr Pharmacol Ther. 2018;23(5):372-8.
60. Foolad F, Aitken SL, Shigle TL. Oral versus Aerosolized Ribavirin for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infections in Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. Clin Infect Dis. 2018 Sep 8. doi: 10.1093/cid/ciy760. [Epub ahead of print].
61. Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. Vaccine 2013;31(Suppl 2):B209-15.
62. Andabaka T, Nickerson JW, Rojas-Reyes MX, Rueda JD, Bacic Vrca V, Barsic B. Monoclonal antibody for reducing the risk of respiratory syncytial virus infection in children. Cochrane Database Syst Rev. 2013;30(4):CD006602.

63. Griffin MP, Khan AA, Esser MT, i sur. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of MEDI8897, the respiratory syncytial virus prefusion f-targeting monoclonal antibody with an extended half-life, in healthy adults. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61:e1714–6.
64. Saso A, Kampmann B. Vaccination against respiratory syncytial virus in pregnancy: a suitable tool to combat global infant morbidity and mortality? Lancet Infect Dis. 2016;16:e153–63.
65. Backman K, Piippo-Savolainen E, Ollikainen H, Koskela H, Korppi M. Adults face increased asthma risk after infant RSV bronchiolitis and reduced respiratory health-related quality of life after RSV pneumonia. Acta Paediatr. 2014;103(8):850-5.
66. Regnier SA, Huels J. Association between respiratory syncytial virus hospitalizations in infants and respiratory sequelae: systematic review and meta-analysis. Pediatr Infect Dis J. 2013;32(8):820–6.
67. Peebles R, Sheller J, Johnson J, Mitchell D, Graham B: Respiratory syncytial virus infection prolongs methacholine-induced airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. J Med Virol. 1999,57(2):186-92.
68. Thomsen SF, van der Sluis S, Stensballe LG, i sur. Exploring the association between severe respiratory syncytial virus infection and asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2009;179(12):1091-7.
69. Fjaerli HO, Farstad T, Rød G, Ufert GK, Gulbrandsen P, Nakstad B. Acute bronchiolitis in infancy as risk factor for wheezing and reduced pulmonary function by seven years in Akershus County, Norway. BMC Pediatr. 2005;5:31.
70. Openshaw PJ. Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection. Proc Am Thorac Soc 2005;2(2):121-5.
71. Tripp RA, Oshansky C, Alvarez R. Cytokines and respiratory syncytial virus infection. Proc Am Thorac Soc. 2005;2(2):147-9.
72. Krivitskaia VZ, Aleksandrova NA, Pokhaznikova MA. Anti-RS viral IgE in respiratory syncytial viral infection in adult patients with a complicated course of bronchitis. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1998;(4):56-61.
73. Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, i sur. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. N Engl J Med. 1986;315(2):77–81.
74. El Saleeby CM, Bush AJ, Harrison LM, Aitken JA, Devincenzo JP. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. J Infect Dis. 2011;204(7):996-1002.

75. DeVincenzo JP, El Saleeby CM, Bush AJ. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. J Infect Dis. 2005;191(11):1861–8.
76. Heidema J, Lukens MV, vanMaren WW, i sur. CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections. J Immunol. 2007;179(12):8410–7.
77. Tripp RA, Moore D, Anderson LJ. TH(1)- and TH(2)-TYPE cytokine expression by activated t lymphocytes from the lung and spleen during the inflammatory response to respiratory syncytial virus. Cytokine. 2000;12(6):801-7.
78. Welliver TP, Garofalo RP, Hosakote Y, i sur. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. J Infect Dis. 2007;195(8):1126–36.
79. Wright PF, Gruber WC, Peters M, i sur. Illness severity, viral shedding, and antibody responses in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. J Infect Dis. 2002;185(8):1011–8.
80. Perkins SM, Webb DL, Torrance SA, i sur. Comparison of a real-time reverse transcriptase PCR assay and a culture technique for quantitative assessment of viral load in children naturally infected with respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol. 2005;43(5):2356-62.
81. McNamara PS, Flanagan BF, Hart CA, Smyth RL. Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. J. Infect. Dis. 2005;191(8):1225–32.
82. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, i sur. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. Am J Epidemiol. 1969;89(4):422-34.
83. Openshaw PJ. The mouse model of respiratory syncytial virus disease. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;372:359–69.
84. Hoffman SJ, Laham FR, Polack FP. Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response. Microbes Infect. 2004;6(8):767–72.
85. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168(6):633–9.

86. Mejias A, Chavez-Bueno S, Ramilo O. Respiratory syncytial virus pneumonia: Mechanisms of inflammation and prolonged airway hyperresponsiveness. Curr Opin Infect Dis. 2005;18(3):199-204.
87. Peebles RS, Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in the murine model. Proc Am Thorac Soc. 2005;2(2):110-5.
88. Aberle JH, Aberle SW, Rebhandl W, Pracher E, Kundi M, Popow-Kraupp T. Decreased interferon-gamma response in respiratory syncytial virus compared to other respiratory viral infections in infants. Clin Exp Immunol. 2004;137(1):146-50.
89. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaara A, i sur. Monocyte IL-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in a one-year follow-up study. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161(5):1518-23.
90. Kristjansson S, Bjarnarson SP, Wennergren G, i sur. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses during the first 3 months of life promote a local TH2-like response. J Allergy Clin Immunol. 2005;116(4):805-11.
91. Alwan WH, Kozlowska WJ, Openshaw PJ. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. J Exp Med. 1994;179(1):81-9.
92. Alwan WH, Record FM, Openshaw PJ. Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins. J Immunol 1993;150(12):5211–8.
93. Hancock GE, Speelman DJ, Heers K, i sur. Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus. J Virol 1996;70:7783–91.
94. Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, i sur. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. J Infect Dis 1991;163(4):687-92.
95. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaara A, i sur. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncyctial virus bronchiolitis. Eur Respir J. 1999;14(1):144-9.
96. Bendelja K, Gagro A, Bace A, i sur. Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry. Clin Exp Immunol. 2000;121(2):332-8.
97. Loebbermann J, Thornton H, Durant L, i sur. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. Mucosal Immunol. 2012;5(2):161-72.

98. Loebbermann J, Durant L, Thornton H, Johansson C, Openshaw PJ. Defective immunoregulation in RSV vaccine-augmented viral lung disease restored by selective chemoattraction of regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(8):2987-92.
99. Gibbs JD, Ornoff DM, Igo HA, Zeng JY, Imani F. Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 enhances replication of respiratory syncytial virus in lung epithelial cells. J Virol. 2009;83(23):12424-31.
100. Mukherjee S, Lindell DM, Berlin AA, i sur. IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. Am J Pathol. 2011;179(1):248-58.
101. Newcomb DC, Boswell MG, Reiss S, i sur. IL-17A inhibits airway reactivity induced by respiratory syncytial virus infection during allergic airway inflammation. Thorax. 2013;68(8):717-23.
102. Schnoeller C, Roux X, Sawant D, i sur. Attenuated Bordetella pertussis vaccine protects against respiratory syncytial virus disease via an IL-17-dependent mechanism. Am J Respir Crit Care Med. 2014;189(2):194-202.
103. Faber TE, Groen H, Welfing M, Jansen KJ, Bont LJ. Specific increase in local IL-17 production during recovery from primary RSV bronchiolitis. J Med Virol. 2012;84(7):1084-8.
104. Feltes TF, Cabalka AK, Meissner HC, i sur. Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. J Pediatr. 2003;143:532–40.
105. Romero JR. Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002: results from four years of palivizumab usage. Pediatr Infect Dis J. 2003;22(Suppl 2):S46–S54.
106. Mejías A, Ramilo O. Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants. Biologics. 2008;2(3):433–9.
107. Glezen WP, Paredes A, Allison JE, i sur: Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. J Pediatr. 1981;98:708-15.
108. The IMpact-RSV study group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in highrisk infants. Pediatrics. 1998;102(3Pt1):531–7.
109. Polack FP, Teng MN, Collins L, i sur. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. J Exp Med 2002;196:859–65.

110. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, i sur. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. J Infect Dis. 2004,189(11):2057-63.
111. Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, i sur. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. J Biol Chem. 2003;278(52):53035-44.
112. Rudd BD, Smit JJ, Flavell RA, i sur. Deletion of TLR3 alters the pulmonary immune environment and mucus production during respiratory syncytial virus infection. J Immunol. 2006;176(3):1937-42.
113. Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, i sur. Macrophage inflammatory protein-1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. J Infect Dis. 2001;184(4):393-9.
114. Welliver RC, Garofalo RP, Ogra PL. Beta-chemokines, but neither T helper type 1 nor T helper type 2 cytokines, correlate with severity of illness during respiratory syncytial virus infection. Pediatr Infect Dis J. 2002;21(5):457-61.
115. Garofalo RP, Hintz KH, Hill V, i sur. A comparison of epidemiologic and immunologic features of bronchiolitis caused by influenza virus and respiratory syncytial virus. J Med Virol. 2005;75(2):282-9.
116. Mellow TE, Murphy PC, Carson JL, i sur. The effect of respiratory synctial virus on chemokine release by differentiated airway epithelium. Exp Lung Res. 2004;30(1):43-57.
117. Vieira RA, Diniz EM, Ceccon ME. Correlation between inflammatory mediators in the nasopharyngeal secretion and in the serum of children with lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus and disease severity. J Bras Pneumol 2010;36(1):59-66.
118. Takeuchi R, Tsutsumi H, Osaki M, i sur. Respiratory syncytial virus infection of human alveolar epithelial cells enhances interferon regulatory factor 1 and interleukin-1beta-converting enzyme gene expression but does not cause apoptosis. J Virol. 1998;72(5):4498-502.
119. Da Dalt L, Callegaro S, Carraro S, i sur. Nasal lavage leukotrienes in infants with RSV bronchiolitis. Pediatr Allergy Immunol. 2007;18(2):100-4.
120. Hancock RE, Falla T, Brown M. Cationic bacterial peptides. Adv Microb Physiol. 1995;37:135–75.
121. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu Rev Immunol. 1995;13:61–92.
122. Lehrer R, Ganz T, Selsted M. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. Cell.1991;64(2):229–230.

123. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. Nature.1997;387(6636):81.
124. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, i sur. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. J Immunol.1999;163(12):6718–24.
125. Williams JL, Garcia J, Harrich D, Pearson L, Wu F, Gaynor R. Lymphoid specific gene expression of the adenovirus early region 3 promoter is mediated by NF-kappa B binding motifs. EMBO J. 1990;9(13):4435-42.
126. Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. Immunology. 2002;106(4):517-25.
127. Yamasaki K, Schauber J, Coda A, i sur. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. FASEB J. 2006;20(12):2068–80.
128. Selsted ME, Szklarek D, Lehrer RI. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. Infect Immun. 1984;45(1):150-4.
129. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, i sur. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest. 1985;76(4):1427-35.
130. Lehrer RI, Daher K, Ganz T, Selsted ME. Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. J Virol. 1985;54(2):467-72.
131. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol. 2009;30(3):131-41.
132. Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nat Rev Microbiol. 2006;4(7):529–36.
133. Li Y, Østerhus S, Johnsen IB. Human Metapneumovirus Infection Inhibits Cathelicidin Antimicrobial Peptide Expression in Human Macrophages. Front Immunol. 2018;9:902.
134. Ryan LK, Diamond G. Modulation of Human β-Defensin-1 Production by Viruses. Viruses. 2017;9(6):153.
135. Hamilton A, Popham DL, Carl DJ, Lauth X, Nizet V, Jones AL. Penicillin-binding protein 1a promotes resistance of group B streptococcus to antimicrobial peptides. Infect Immun. 2006;74(11):6179-87.
136. Hollmann A, Martinez M, Maturana P, Semorile LC, Maffia PC. Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes and Synergism With Chemical Antibiotics. Front Chem. 2018;6:204.

137. Aida KL, Kreling PF, Caiaffa KS, i sur. Antimicrobial peptide-loaded liquid crystalline precursor bioadhesive system for the prevention of dental caries. Int J Nanomedicine. 2018;13:3081-91.
138. Mangoni ML, Miele R, Renda TG, Barra D, Simmaco M. The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of Rana esculenta is stimulated by microorganisms. FASEB J 2001;15(8);1431–2.
139. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Research. 2016;44(Database issue):D1087-D1093. doi:10.1093/nar/gkv1278.
140. Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc R Soc B. 1922;93:306–17.
141. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Rev. 2003;55(1):27–55.
142. Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. J Clin Invest. 1985;76(4):1436-9.
143. Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. J Biol Chem. 1992;267(32):23216–25.
144. Jones DE, Bevins CL. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: Implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. FEBS Lett. 1993;315(2):187–92.
145. Driss V, Legrand F, Hermann E, i sur. TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria: role of alpha-defensins. Blood 2009;113(14):3235–44.
146. Tan BH, Meinken C, Bastian M, i sur. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. J Immunol. 2006;177(3):1864–71.
147. Frye M, Bargon J, Dauletbaev N, Weber A, Wagner TO, Gropp R. Expression of human alpha-defensin 5 (HD5) mRNA in nasal and bronchial epithelial cells. J Clin Pathol. 2000;53(10):770-3.
148. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: A novel beta-defensin from human plasma. FEBS Lett. 1995;368(2):331–5.
149. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroeder JM. Isolation and characterization of human deta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem. 2001;276(8):5707–13.
150. García JR, Krause A, Schulz S, i sur. Human beta-defensin 4: A novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. FASEB J. 2001;15(10):1819–21.

151. Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, i sur. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. J Immunol. 2002;169(5):2516-23.
152. Huang L, Leong SS, Jiang R. Soluble fusion expression and characterization of bioactive human beta-defensin 26 and 27. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;84(2):301-8.
153. Schulz A, Klüver E, Schulz-Maronde S, Adermann K. Engineering disulfide bonds of the novel human beta-defensins hBD-27 and hBD-28: differences in disulfide formation and biological activity among human beta-defensins. Biopolymers. 2005;80(1):34-49.
154. Yu H, Dong J, Gu Y, i sur. The novel human beta-defensin 114 regulates lipopolysaccharide(LPS)-mediated inflammation and protects sperm from motility loss. J Biol Chem. 2013;288(17):12270-82.
155. Yenugu S, Hamil KG, Radhakrishnan Y, French FS, Hall SH. The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial beta-defensin Endocrinology. 2004;145(7):3165-73.
156. Liu H, Yu H, Gu Y, i sur. Human beta-defensin DEFB126 is capable of inhibiting LPS-mediated inflammation. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(8):3395-408.
157. Terkawi MA, Takano R, Furukawa A, Murakoshi F, Kato K. Involvement of β-defensin 130 (DEFB130) in the macrophage microbicidal mechanisms for killing Plasmodium falciparum. Sci Rep. 2017;7:41772.
158. Lehrer RI. Primate defensins. Nat Rev Microbiol. 2004;2(9):727-38.
159. McCray PB Jr, Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997;16(3):343-9.
160. Bals R, Wang X, Wu Z, i sur. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. J Clin Invest. 1998;102(5):874-80.
161. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, i sur. Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000;22(6):714–721.
162. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. Cell Mol Life Sci. 2006;63(11):1294–313.
163. Yanagi S, Ashitani J, Ishimoto H, i sur. Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. Respir Res. 2005;6(1):130.
164. Otte JM, Neumann HM, Brand S, Schrader H, Schmidt WE, Schmitz F. Expression of beta-defensin 4 is increased in human gastritis. Eur J Clin Invest.2009;39(2):126–38.
165. Zhao R, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. FEBS Lett. 1996;396(2-3):319–22.

166. Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. J Immunol. 2005;174(8):4870–9.
167. Guaní-Guerra E, Negrete-García MC, Montes-Vizuet R, Asbun-Bojalil J, Terán LM. Human β-defensin-2 induction in nasal mucosa after administration of bacterial lysates. Arch Med Res. 2011;42(3):189-94.
168. Kao CY, Chen Y, Thai P, i sur. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. J Immunol. 2004;173(5):3482–91.
169. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. Mol Immunol. 2005;42(9):1073-84.
170. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, i sur. Identification of a novel, multifunctional -defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. Cell Tissue Res. 2001;306:257–64.
171. Weinberg A, Quiñones-Mateu ME, Lederman MM. Role of human beta-defensins in HIV infection. Adv Dent Res. 2006;19(1):42-8.
172. Duits LA, Rademaker M, Ravensbergen B, i sur. Inhibition of hBD-3, but not hBD-1 and hBD-2, mRNA expression by corticosteroids. Biochem Biophys Res Commun. 2001;280(2):522–5.
173. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. Eur J Biochem. 1996;238(2):325-32.
174. Zaiou M, Nizet V, Gallo RL Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. J Invest Dermatol. 2003;120(5):810–6.
175. Agerberth B, Charo J, Werr J, i sur. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood. 2000;96(9):3086-93.
176. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(16):9541-6.

177. Marchini G, Lindow S, Brismar H, i sur. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: Peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. Br J Dermatol. 2002;147(6):1127–34.
178. Sørensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. J Immunol. 2003;170(11):5583-9.
179. Erdag G, Morgan JR. Interleukin-1alpha and interleukin-6 enhance the antibacterial properties of cultured composite keratinocyte grafts. Ann Surg. 2002;235(1):113-24.
180. Gaudreault E, Gosselin J. Leukotriene B4 induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. J Immunol. 2008;180(9):6211-21.
181. Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. J Immunol. 2008;181(10):7090-9.
182. Van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, Van Sterkenburg MA, Daha MR, Dijkman JH, Hiemstra PS. Effects of defensins on IL-8 synthesis in airway epithelial cells. Am J Physiol. 1997;272(5 Pt 1):L888-96.
183. Chertov O, Michiel DF, Xu L, i sur. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. J Biol Chem. 1996;271(6):2935-40.
184. Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. J Clin Invest. 1989;84(6):2017-20.
185. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, i sur. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science. 1999;286(5439):525-8.
186. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, i sur. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β-defensin 2. Science. 2002;298(5595):1025–9.
187. Presicce P, Giannelli S, Taddeo A, Villa ML, Della Bella S. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91. J Leukoc Biol. 2009;86(4):941–8.
188. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, i sur. Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(47):18631-5.
189. Röhrl J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlgans T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. J Immunol. 2010;184(12):6688-94.

190. Hancock RE, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(16):8856-61.
191. Gudmundsson GH, Agerberth B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. J Immunol Methods 1999;232(1-2):45–54.
192. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. J Immunol 2002;169(7):3883–91.
193. Biragyn A, Coscia M, Nagashima K, Sanford M, Young HA, Olkhanud P. Murine beta-defensin 2 promotes TLR-4/MyD88-mediated and NF-kappaB-dependent atypical death of APCs via activation of TNFR2. J Leukoc Biol. 2008;83(4):998-1008.
194. Nagaoka I, Suzuki K, Murakami T, Niyonsaba F, Tamura H, Hirata M. Evaluation of the effect of alpha-defensin human neutrophil peptides on neutrophil apoptosis. Int J Mol Med. 2010;26(6):925–34.
195. Nagaoka I, Niyonsaba F, Tsutsumi-Ishii Y, Tamura H, Hirata M. Evaluation of the effect of human beta-defensins on neutrophil apoptosis. Int Immunol. 2008;20(4):543–53.
196. Prohaszka Z, Nemet K, Csermely P, Hudecz F, Mezo G, Fust G. Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1. Mol Immunol. 1997;34(11):809–16.
197. Kim J, Yang YL, Jang SH, Jang YS. Human β-defensin 2 plays a regulatory role in innate antiviral immunity and is capable of potentiating the induction of antigen-specific immunity. Virol J. 2018;15(1):124.
198. Semple F, Dorin JR. beta-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? J Innate Immun. 2012;4(4):337–48.
199. Semple F, Webb S, Li HN, i sur. Human beta-defensin 3 has immunosuppressive activity in vitro and in vivo. Eur J Immunol. 2010;40(4):1073-8.
200. Suzuki K, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Tamura H, Hiramatsu K, Nagaoka I. Human anti-microbial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the LPS-induced apoptosis of endothelial cells. Int Immunol. 2011;23(8):185–93.
201. Kim C, Slavinskaya Z, Merrill AR, Kaufmann SH. Human alpha-defensins neutralize toxins of the mono-ADP-ribosyltransferase family. Biochem J. 2006;399(2):225-9.
202. Dabirian S, Taslimi Y, Zahedifard F, i sur. Human neutrophil peptide-1 (HNP-1): a new anti-leishmanial drug candidate. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(10):e2491.

203. Cardot-Martin E, Casalegno JS, Badiou C, i sur. α-Defensins partially protect human neutrophils against Panton-Valentine leukocidin produced by Staphylococcus aureus. Lett Appl Microbiol. 2015;61(2):158-64.
204. Wu Z, Cocchi F, Gentles D, i sur. Human neutrophil alpha-defensin 4 inhibits HIV-1 infection in vitro. FEBS Lett. 2005;579(1):162-6.
205. Raschig J, Mailänder-Sánchez D, Berscheid A, i sur. Ubiquitously expressed Human Beta Defensin 1 (hBD1) forms bacteria-entrapping nets in a redox dependent mode of action. PLoS Pathog. 2017;13(3):e1006261.
206. Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, i sur. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β-defensin 1. Nature. 2011;469(7330):419–23.
207. Dorschner RA, Lin KH, Murakami M, Gallo RL. Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response. Pediatr Res. 2003;53(4):566-72.
208. Abou Alaiwa MH, Reznikov LR, Gansemer ND, i sur. pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials β-defensin-3 and LL-37. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(52):18703-8.
209. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. Infect Immun. 1995;63(4):1291-7.
210. Currie SM, Gwyer Findlay E, McFarlane AJ, i sur. Cathelicidins Have Direct Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus In Vitro and Protective Function In Vivo in Mice and Humans. J Immunol. 2016;196(6):2699-710.
211. Schögler A, Muster RJ, Kieninger E, i sur. Vitamin D represses rhinovirus replication in cystic fibrosis cells by inducing LL-37. Eur Respir J. 2016;47(2):520–30.
212. Okumura K, Itoh A, Isogai E, i sur. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. Cancer Lett. 2004;212(2):185-94.
213. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. J Leukoc Biol. 2004;75(1):39-48.
214. Howell MD, Jones JF, Kisich KO, i sur. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. J Immunol. 2004;172(3):1763-7.
215. Buck CB, Day PM, Thompson CD, i sur. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(5):1516-21.
216. Chang TL, Vargas J, DelPortillo A, Klotman ME. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. J Clin Invest. 2005;115(3):765-73.

217. Salvatore M, Garcia-Sastre A, Ruchala P, i sur. Alpha-defensin inhibits influenza virus replication by cell mediated mechanism(s). J Infect Dis. 2007;196(6):835-43.
218. Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. J Virol. 1986;60(3):1068-74.
219. Quiñones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, i sur. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. AIDS. 2003;17(16):F39–F48.
220. Bergman P, Walter-Jallow L, Broliden K, Agerberth B, Söderlund J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. Curr HIV Res. 2007;5(4):410–5.
221. Kota S, Sabbah A, Chang TH, i sur. Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus. J Biol Chem. 2008;283(33):22417-29.
222. Chen W, Liu Z, Zhang Q, Yan Q, Jing S. Induction and antiviral activity of human β-defensin 3 in intestinal cells with picornavirus infection. Acta Virol. 2018;62(3):287-93.
223. Currie SM, Findlay EG, McHugh BJ, i sur. The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus. PLoS One. 2013;8(8):e73659.
224. Wong JH, Legowska A, Rolka K, i sur. Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. Peptides. 2011;32(6):1117–22.
225. Crack LR, Jones L, Malavige GN, i sur. Human antimicrobial peptides LL-37 and human beta-defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. Clin Exp Dermatol. 2012;37(5):534–43.
226. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, i sur. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. Cell Immunol. 2012;280(1):22–35.
227. Tripathi S, Wang G, White M, Qi L, Taubenberger J, Hartshorn KL. Antiviral Activity of the Human Cathelicidin, LL-37, and Derived Peptides on Seasonal and Pandemic Influenza A Viruses. PLoS One. 2015;10(4):e0124706.
228. Tecle T, White MR, Gantz D, Crouch EC, Hartshorn KL. Human neutrophil defensins increase neutrophil uptake of influenza A virus and bacteria and modify virus-induced respiratory burst responses. J Immunol. 2007;178(12):8046-52.
229. Hartshorn KL, White MR, Tecle T, Holmskov U, Crouch EC. Innate defense against influenza A virus: activity of human neutrophil defensins and interactions of defensins with surfactant protein D. J Immunol. 2006;176(11):6962-72.
230. White MR, Tecle T, Crouch EC, Hartshorn KL. Impact of neutrophils on antiviral activity of human bronchoalveolar lavage fluid. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;293(5):1293-9.

231. Doss M, White MR, Tecle T, i sur. Interactions of α-, β-, and Θ-Defensins with Influenza A Virus and Surfactant Protein D. J Immunol. 2009;182(12):7878-87.
232. Gong T, Jiang Y, Wang Y, i sur. Recombinant mouse beta-defensin 2 inhibits infection by influenza A virus by blocking its entry. Arch Virol 2010;155(4):491–8.
233. Seidel A, Ye Y, de Armas LR, i sur. Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms. PLoS One. 2010;5(3):e9737.
234. Dugan AS, Maginnis MS, Jordan JA, i sur. Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells. J Biol Chem. 2008;283(45):31125-32.
235. Gounder AP, Wiens ME, Wilson SS, Lu W, Smith JG. Critical determinants of human α-defensin 5 activity against non-enveloped viruses. J Biol Chem. 2012;287(29):24554-62.
236. Hazrati E, Galen B, Lu W, i sur. Human alpha and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. J Immunol. 2006;177(12):8658–66.
237. Wang W, Owen SM, Rudolph DL, i sur. Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. J Immunol. 2004;173(1):515–20.
238. Furci L, Sironi F, Tolazzi M, Vassena L, Lusso P. Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. Blood. 2007;109(7):2928–35.
239. Leikina E, Delanoe-Ayari H, Melikov K, i sur. Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. Nat Immunol. 2005;6(10):995-1001.
240. Lafferty MK, Sun L, DeMasi L, Lu W, Garzino-Demo A. CCR6 ligands inhibit HIV by inducing APOBEC3G. Blood. 2010;115(8):1564-71.
241. Smith JG, Nemerow GR. Mechanism of adenovirus neutralization by human alpha-defensins. Cell Host Microbe. 2008;3(1):11–9.
242. Guo CJ, Tan N, Song L, Douglas SD, Ho WZ. Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. AIDS. 2004;18(8):1217-8.
243. Mohan T, Mitra D, Rao DN. Nasal delivery of PLG microparticle encapsulated defensin peptides adjuvanted gp41 antigen confers strong and long-lasting immunoprotective response against HIV-1. Immunol Res. 2014;58(1):139-53.
244. Biragyn A, Belyakov IM, Chow YH, Dimitrov DS, Berzofsky JA, Kwak LW. DNA vaccines encoding human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 fusions with

proinflammatory chemoattractants induce systemic and mucosal immune responses. Blood 2002;100(4):1153–9.
245. Park MS, Kim JI, Lee I, Park S, Bae J-Y, Park M-S. Towards the Application of Human Defensins as Antivirals. Biomolecules & Therapeutics. 2018;26(3):242-54.
246. Rapista A, Ding J, Benito B, i sur. Human defensins 5 and 6 enhance HIV-1 infectivity through promoting HIV attachment. Retrovirology. 2011;8:45.
247. Duits LA, Nibbering PH, van Strijen E, i sur. Rhinovirus increases human beta-defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 38(1):59–64.
248. Semple F, MacPherson H, Webb S, i sur. Human β-Defensin 3 [corrected] Exacerbates MDA5 but Suppresses TLR3 Responses to the Viral Molecular Pattern Mimic Polyinosinic:Polycytidylic Acid. PLoS Genet. 2015;11(12):e1005673.
249. Ryan LK, Dai J, Yin Z, i sur. Modulation of human beta-defensin-1 (hBD-1) in plasmacytoid dendritic cells (PDC), monocytes, and epithelial cells by influenza virus, Herpes simplex virus, and Sendai virus and its possible role in innate immunity. J Leukoc Biol. 2011;90(2):343-56.
250. McGillivary G, Mason KM, Jurcisek JA, Peeples ME, Bakaletz LO. Respiratory syncytial virus-induced dysregulation of expression of a mucosal beta-defensin augments colonization of the upper airway by non-typeable Haemophilus influenzae. Cell Microbiol. 2009;11(9):1399-408.
251. Boyapalle S, Wong T, Garay J, i sur. Respiratory syncytial virus NS1 protein colocalizes with mitochondrial antiviral signaling protein MAVS following infection. PLoS One. 2012;7(2):e29386.
252. Bose S, Kar N, Maitra R, DiDonato JA, Banerjee AK. Temporal activation of NF-kappaB regulates an interferon-independent innate antiviral response against cytoplasmic RNA viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(19):10890-5.
253. Bitko V, Garmon NE, Cao T, i sur. Activation of cytokines and NF-kappa B in corneal epithelial cells infected by respiratory syncytial virus: potential relevance in ocular inflammation and respiratory infection. BMC Microbiol. 2004;4:28.
254. Mansbach JM, Hasegawa K, Ajami NJ, i sur. Serum LL-37 Levels Associated With Severity of Bronchiolitis and Viral Etiology. Clin Infect Dis. 2017;65(6):967-75.
255. Harcourt JL, McDonald M, Svoboda P, Pohl J, Tatti K, Haynes LM. Human cathelicidin, LL-37, inhibits respiratory syncytial virus infection in polarized airway epithelial cells. BMC Res Notes. 2016;9:11.

256. Shornick LP, Wells AG, Zhang Y, i sur. Airway epithelial versus immune cell Stat1 function for innate defense against respiratory viral infection. J Immunol. 2008;180(5):3319–28.
257. Wah J, Wellek A, Frankenberger M, Unterberger P, Welsch U, Bals R. Antimicrobial peptides are present in immune and host defense cells of the human respiratory and gastrointestinal tracts. Cell Tissue Res. 2006;324(3):449-56.
258. Cooper P, Potter S, Mueck B, Yousefi S, Jarai G. Identification of genes induced by inflammatory cytokines in airway epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001,280(5):L841-52.
259. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N: Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia—molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. Respir Res. 2006;7(1):97.
260. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, i sur. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol. 2004;5(7):730-7.
261. Scharf S, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. Streptococcus pneumoniae induces human β-defensin-2 and -3 in human lung epithelium. Exp Lung Res. 2012;38(2):100-10.
262. Wang X, Zhang Z, Louboutin JP, Moser C, Weiner DJ, Wilson JM. Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. FASEB J. 2003;17(12):1727–9.
263. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russell JP, Bevins CL. Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. Infect Immun. 2000;68(1):113-9.
264. Proud D, Sanders SP, Wiehler S. Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo. J Immunol. 2004;172(7):4637–45.
265. Mookherjee N, Lippert DN, Hamill P, i sur. Intracellular receptor for human host defense peptide LL-37 in monocytes. J. Immunol. 2009;183(4):2688–96.
266. Harris M, Clark J, Coote N, i sur. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011 Thorax. 2011;66(Suppl 2):ii1-ii23.
267. Slater A, Shann F, Pearson G; Paediatric Index of Mortality (PIM) Study Group. PIM2: a revised version of the Paediatric Index of Mortality. Intensive Care Med. 2003;29(2):278–85.

268. Green CG, Eisenberg J, Leong A, Nathanson I, Schnapf BM, Wood RE. Flexible endoscopy of the pediatric airway. Am Rev Respir Dis. 1992;145(1):233-5.
269. Midulla F, de Blic J, Barbato A, i sur.; ERS Task Force. Flexible endoscopy of paediatric airways. Eur Respir J. 2003;22(4):698-708.
270. Hayden L, Boyer D, Hysinger EB, i sur. Flexible Airway Endoscopy in Children. Ann Am Thorac Soc. 2015;12(12):1873–5.
271. Balfour-Lynn IM, Spencer H. Bronchoscopy —how and when? Paediatr Respir Rev. 2002;3(3):255–64.
272. Haslam PL, Baughman RP. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. Eur Respir J. 1999;14(2):245-8.
273. Burmester M, Mok Q. How safe is non-bronchoscopic bronchoalveolar lavage in critically ill mechanically ventilated children? Intensive Care Med. 2001;27(4):716–21.
274. Picinin IF, Camargos PA, Marguet C. Cell profile of BAL fluid in children and adolescents with and without lung disease. J Bras Pneumol. 2010;36(3):372-85.
275. Hubble D, Osborn GR. Acute Bronchiolitis in Children. Br Med J. 1941;1(4177):107-126.1.
276. Simões EAF, Bont L, Manzoni P, i sur. Past, Present and Future Approaches to the Prevention and Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. Infect Dis Ther. 2018;7(1):87-120.
277. Willson DF, Landrigan CP, Horn SD, Smout RJ. Complications in infants hospitalized for bronchiolitis or respiratory syncytial virus pneumonia. J Pediatr. 2003;143(5 Suppl):S142–9.
278. Naik AS, Kallapur SG, Bachurski CJ, i sur. Effects of ventilation with different positive end-expiratory pressures on cytokine expression in the preterm lamb lung. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164(3):494–8.
279. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, i sur. Effect of Mechanical Ventilation on Inflammatory Mediators in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Controlled Trial. JAMA. 1999;282(1):54–61.
280. Larios Mora A, Detalle L, Van Geelen A, i sur. Kinetics of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Memphis Strain 37 (M37) Infection in the Respiratory Tract of Newborn Lambs as an RSV Infection Model for Human Infants. PLoS One. 2015;10(12):e0143580.
281. Mukae H, Ishimoto H, Yanagi S, i sur. Elevated BALF concentrations of alpha- and beta-defensins in patients with pulmonary alveolar proteinosis. Respir Med. 2007;101(4):715-21.

282. Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S. Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with Mycobacterium avium-intracellulare infection. Chest. 2001;119(4):1131–7.
283. Chang AB, Yerkovich ST, Gibson PG, i sur. Pulmonary Innate Immunity in Children with Protracted Bacterial Bronchitis. J Pediatr. 2012;161(4):621-5.
284. Hiratsuka T, Mukae H, Iiboshi H, i sur. Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. Thorax. 2003;58(5):425-30.
285. McNamara PS, Flanagan BF, Selby AM, Hart CA, Smyth RL. Pro- and anti-inflammatory responses in respiratory syncytial virus bronchiolitis. Eur Respir J. 2004;23(1):106–12.
286. Everard ML, Swarbrick A, Wrightham M, i sur. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. Arch Dis Child 1994;71(5):428-32.
287. Kim CK, Chung CY, Choi SJ, Kim DK, Park Y, Koh YY. Bronchoalveolar lavage cellular composition in acute asthma and acute bronchiolitis. J Pediatr. 2000;137(4):517-22.
288. Smith PK, Wang SZ, Dowling KD, Forsyth KD. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. J Paediatr Child Health 2001;37(2):146–51.
289. Kerr MH, Patonm JY. Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection. Am J Respir Crit Care Med. 1999;159(4 Pt 1):1115-8.
290. Midulla F, Villani A, Merolla R, Bjermer L, Sandstrom T, Ronchetti R. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. Pediatr Pulmonol. 1995;20(2):112–8.
291. Mallia P, Footitt J, Sotero R, i sur. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186(11):1117-24.
292. Thompson L, Turko I, Murad F. Mass spectrometry-based relative quantification of human neutrophil peptides 1, 2, and 3 from biological samples. Mol Immunol. 2006; 43(9):85–9.
293. Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165(7):992–5.

294. Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S. Elevated levels of alpha-defensins in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. Chest. 2002;121(2):519–26.
295. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Elevated a-defensin levels in plasma of patients with pulmonary sarcoidosis Respirology. 2007;12(3):339-45.
296. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Elevated Levels of Antimicrobial Peptides in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients with Chronic Eosinophilic Pneumonia. Respiration. 2007;74(1):69-75.
297. Ashitani J, Mukae H, Nakazato M, i sur. Elevated concentrations of defensins in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse panbronchiolitis. Eur Respir J. 1998;11(1):104–11.
298. Kim CK, Kim SW, Kim YK, i sur. Bronchoalveolar lavage eosinophil cationic protein and interleukin-8 levels in acute asthma and acute bronchiolitis. Clin Exp Allergy 2005;35(5):591–7.
299. Kim CK, Kim SW, Park CS, Kim BI, Kang H, Koh YY. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. J Allergy Clin Immunol. 2003;112(1):64-71.
300. Semple MG, Dankert HM, Ebrahimi B, i sur. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infants is associated with reduced airway interferon gamma and substance P. PLoS One. 2007;2(10):e1038.
301. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, i sur. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. J Infect Dis. 2001;184(3):355-8.
302. Nicholson EG, Schlegel C, Garofalo RP, i sur. Robust Cytokine and Chemokine Response in Nasopharyngeal Secretions: Association With Decreased Severity in Children With Physician Diagnosed Bronchiolitis. J Infect Dis. 2016;214(4):649-55.
303. González PA, Prado CE, Leiva ED, i sur. Respiratory syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(39):14999-5004.
304. Neuzil KM, Tang YW, Graham BS. Protective role of TNFalpha in respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. Am J Med Sci. 1996;311(5):201–4.
305. Hussell T, Pennycook A, Openshaw PJ. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. Eur J Immunol. 2001;31(9):2566–73.

306. Rontved CM, Tjornehoj K, Viuff B, i sur. Increased pulmonary secretion of tumor necrosis factor-alpha in calves experimentally infected with bovine respiratory syncytial virus. Vet Immunol Immunopathol. 2000;76(3-4):199–214.
307. Rutigliano JA, Graham BS. Prolonged production of TNF-alpha exacerbates illness during respiratory syncytial virus infection. J Immunol. 2004;173(5):3408-17.
308. Murdaca G, Spanò F, Contatore M, i sur. Infection risk associated with anti-TNF-α agents: a review. Expert Opin Drug Saf. 2015;14(4):571-82.
309. Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, i sur. Immunopathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. J Infect Dis. 2007;195(10):1532–40.
310. Elrefaei M, Burke CM, Baker CA, i sur. TGF-beta and IL-10 production by HIV-specific CD8+ T cells is regulated by CTLA-4 signaling on CD4+ T cells. PLoS One. 2009;4(12):e8194.
311. Kitani A, Fuss IJ, Nakamura K, Schwartz OM, Usui T, Strober W. Treatment of experimental (Trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 plasmid: TGF-beta1-mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction and IL-12 receptor beta2 chain downregulation. J Exp Med. 2000;192(1):41-52.
312. Loebbermann J, Schnoeller C, Thornton H, i sur. IL-10 regulates viral lung immunopathology during acute respiratory syncytial virus infection in mice. PLoS One. 2012;7(2):e32371.
313. Sun J, Cardani A, Sharma AK, i sur. Autocrine regulation of pulmonary inflammation by effector T-cell derived IL-10 during infection with respiratory syncytial virus. PLoS Pathog. 2011;7(8):e1002173.
314. Sun L, Cornell TT, LeVine A, i sur. Dual role of interleukin-10 in the regulation of respiratory syncitial virus (RSV)-induced lung inflammation. Clin Exp Immunol. 2013;172(2):263-79.
315. Ruan Y, Okamoto Y, Matsuzaki Z, i sur. Suppressive effect of locally produced interleukin-10 on respiratory syncytial virus infection. Immunology. 2001;104(3):355-60.
316. Fan R, Wen B, Liu W, i sur. Altered regulatory cytokine profiles in cases of pediatric respiratory syncytial virus infection. Cytokine. 2018;103:57-62.
317. McCann KL, Imani F. Transforming growth factor beta enhances respiratory syncytial virus replication and tumor necrosis factor alpha induction in human epithelial cells. J Virol. 2007;81(6):2880-6.

318. Mgbemena V, Segovia J, Chang T, Bose S. Krüppel-like factor 6 regulates transforming growth factor-β gene expression during human respiratory syncytial virus infection. Virol J. 2011;8:409.
319. Wang L, Quan Y, Yue Y, Heng X, Che F. Interleukin-37: A crucial cytokine with multiple roles in disease and potentially clinical therapy. Oncol Lett. 2018;15(4):4711-9.
320. Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, Voitenok NN. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. Eur Cytokine Netw. 2000;11(2):257-66.
321. Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. J Invest Dermatol. 2004;123(3):522-9.
322. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, i sur. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. J Immunol. 2006;176(4):2455-64.
323. Rennard S, Basset G, Lecossier D, O'Donnell K, Martin P, Crystal RG. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. J Appl Physiol. 1986;60(2):532-8.
324. Marcy TW, Merrill WW, Rankin JA, Reynolds HY. Limitations of using urea to quantify epithelial lining fluid recovered by bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis. 1987;135(6):1276-80.
325. Grigg J, Amon S, Silverman M. Fractional Processing of Sequential Bronchoalveolar Lavage Fluid from Intubated Babies. Eur Respir J. 1992;5(6):727–32.
326. Ratjen F, Bruch J. Adjustment of bronchoalveolar lavage volume to body weight in children. Pediatr Pulmonol. 1996;21(3):184-8.
327. Dorschner RA, Lopez-Garcia B, Peschel A, i sur. The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. FASEB J. 2006;20(1):35–42.
328. Wohlford-Lenane CL, Meyerholz DK, Perlman S, i sur. Rhesus theta-defensin prevents death in a mouse model of severe acute respiratory syndrome coronavirus pulmonary disease. J Virol. 2009; 83(21):11385–90.
329. Sung DK, Chang YS, Sung SI, Yoo HS, Ahn SY, Park WS. Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against Escherichia coli is mediated by secretion of beta- defensin- 2 via toll- like receptor 4 signalling. Cell Microbiol. 2015;18(3):424-36.

330. Arnason JW, Murphy JC, Kooi C, i sur. Human β-defensin-2 production upon viral and bacterial co-infection is attenuated in COPD. PLoS One. 2017;12(5):e0175963.
331. Wang B, McHugh BJ, Qureshi A, i sur. IL-1β-Induced Protection of Keratinocytes against Staphylococcus aureus-Secreted Proteases Is Mediated by Human β-Defensin 2. J Invest Dermatol. 2017;137(1):95-105.
332. Hasegawa K, Mansbach JM, Ajami NJ, i sur. Serum cathelicidin, nasopharyngeal microbiota, and disease severity among infants hospitalized with bronchiolitis. J Allergy Clin Immunol. 2017;139(4):1383–6.
333. Dauletbaev N, Gropp R, Frye M, Loitsch S, Wagner TO, Bargon J. Expression of human beta defensin (HBD-1 and HBD-2) mRNA in nasal epithelia of adult cystic fibrosis patients, healthy individuals, and individuals with acute cold. Respiration 2002;69(1):46–51.
334. Mehlotra RK, Zimmerman PA, Weinberg A, Jurevic RJ. Variation in human β-defensin genes: new insights from a multi-population study. Int J Immunogenet. 2012;40(4):261-9.
335. Ryan LK, Diamond G, Amrute S, Feng Z, Weinberg A, Fitzgerald-Bocarsly P. Detection of HBD1 peptide in peripheral blood mononuclear cell subpopulations by intracellular flow cytometry. Peptides. 2003;24(11):1785–94.
336. Fang XM, Shu Q, Chen QX, i sur. Differential expression of alpha and beta-defensins in human peripheral blood. Eur J Clin Investig. 2003;33(1):82–7.
337. Rodriguez-Fernandez R, Tapia LI, Yang CF, i sur. Respiratory Syncytial Virus Genotypes, Host Immune Profiles, and Disease Severity in Young Children Hospitalized With Bronchiolitis. J Infect Dis. 2017;217(1):24-34.
338. Slovic A, Ivancic-Jelecki J, Ljubin-Sternak S, Galinović GM, Forcic D. A molecular epidemiological study of human respiratory syncytial virus in Croatia, 2011-2014. Infect Genet Evol. 2016;44:76-84.

11. KRATKA BIOGRAFIJA

Rođen sam u Zagrebu 30. srpnja 1971. godine, gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 1990. godine, a završio 1996. godine. Državni ispit za doktora medicine položio sam 28. studenog 1997. godine. Tijekom 1998. godine služio sam vojni rok radeći kao liječnik u ambulanti vojarne u Požegi. U Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ radim od lipnja 1999. godine. Specijalizaciju iz infektologije započeo sam u veljači 2002. godine, a specijalistički ispit položio 19. rujna 2006. godine. Od 2007. godine radim u Zavodu za infektivne bolesti djece. Završio sam poslijediplomski studij medicinske znanosti te izradio i 3.veljače 2011. obranio magistarski rad pod naslovom: “Usporedba kliničkih simptoma vrednovanih indeksom kroničnog prostatitisa i laboratorijskih nalaza kao procjena kliničke i bakteriološke djelotvornosti provedenog liječenja u bolesnika s kroničnim oblicima sindroma prostatitisa“. Autor sam ili koautor više znanstvenih radova objavljenih u domaćim i stranim stručnim časopisima. Oženjen sam i otac dvoje djece.

Srđan Roglić, dr. med.

12. PRILOZI

Prilog 1. POPIS TABLICA I SLIKA

Tablica 1. Program liofilizacije.

Tablica 2. Demografski podaci i rezultati hematološke obrade učinjene na dan uzimanja BAL-a.

Slika 1. Koncentracije proteina, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-37 i TGF-β1 u BAL-u djece u kontrolnoj skupini i djece zaražene RSV-om (svi i ovisno o postojanju bakterijske superinfekcije).

Slika 2. Koncentracije IL-6, HBD1, HBD2, HBD4, HNP1-3 i LL-37 u BAL-u djece u kontrolnoj skupini i djece zaražene RSV-om (svi i ovisno o postojanju bakterijske superinfekcije).

Slika 3. Koncentracije IL-4, IL-33, IL-31, IL-35 i IFN-γ u BAL-u djece u kontrolnoj skupini i djece zaražene RSV-om s ili bez sekundarne bakterijske infekcije.

Slika 4. Podešene (za koncentraciju proteina u BAL-u i vrijeme od početka simptoma do uzimanja uzorka) razlike u koncentraciji citokina u BAL-u bolesne djece s i bez bakterijske superinfekcije i djece u kontrolnoj skupini.

Tablica 3. Korelacija između antimikrobnih peptida i različitih citokina u BAL-u. Prikazan je Kendallov koeficijent τ i pripadajuća P-vrijednost.

Slika 5. Pojedinačni i skupni podaci za trajanje suplementacije kisika i najniže vrijednosti PaO2/fiO2 za sve bolesnike i ovisno o postojanju bakterijske superinfekcije (A) i odnos između dva ishoda (Kendallova korelacija rangova/ne-parametrijska linearna regresija) (B).

Slika 6. Univarijatni odnos najniže vrijednosti PaO2/fiO2 (A) odnosno dana suplementacije kisika (B) i koncentracije HBD2 u BAL-u (Kendallova korelacija rangova/ne-parametrijska linearna regresija).

Prilog 2. POPIS KRATICA

AMP	Antimikrobni peptid
BAL	Bronhoalveolarni ispirak
BALF	Bronhoalveolarni ispirak lišen stanica i debrisa (engl. *bronchoalveolar lavage fluid*)
CCR	Kemokinski receptor (engl. *chemokine receptor*)
CI	Granica pouzdanosti (engl. *confidence interval*)
CRP	C-reaktivni protein
DEFB	Beta-defenzin (engl. *defensin beta*)
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
ELF	Tekućina koja prekriva respiratorni epitel (engl. *epithelial lining fluid*)
ELISA	Imunoenzimski test (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*)
GMR	Geometrijska srednja vrijednost (engl. *geometric mean ratio*)
HBD	Ljudski beta-defenzin (engl. *human beta-defensin*)
hCAP	Ljudski kationski antimikrobni protein (engl. *human cathionic antimicrobial peptide*)
HD	Ljudski alfa-defenzin
HIV	Virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)
HNP	Ljudski neutrofilni peptid (engl. *human neutrophil peptide*)
IFN	Interferon
IL	Interleukin

KZIB	Klinika za infektivne bolesti „Dr Fran Mihaljević“
NK	Prirodno ubilački (engl. *natural killer*)
PBS	Puferirana otopina fosfatnih soli (engl. *phosphate buffered saline*)
PIM2	Pedijatrijski indeks mortaliteta 2
PIV	Virus parainfluence
RNK	Ribonukleinska kiselina
RSV	Respiratorni sincicijski virus
SpO2	Zasićenost periferne krvi kisikom
TGF	Transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*)
Th17	Pomoćnički 17 limfocit T
TLR	Receptor sličan *tollu* (engl. *toll-like receptor*)
TNF	Čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)
Treg	Regulacijski limfocit T