Rane imunoreakcije u mononuklearnim stanicama periferne krvi uzrokovane virusom puumala

Cvetko Krajinović, Lidija

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:832620

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Lidija Cvetko Krajinović

RANE IMUNOREAKCIJE U MONONUKLEARNIM STANICAMA PERIFERNE KRVI UZROKOVANE VIRUSOM PUUMALA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Lidija Cvetko Krajinović

EARLY IMMUNOREACTIONS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS INDUCED BY PUUMALA VIRUS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014

Ovaj je doktorski rad izrađen u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Alemke Markotić u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad je izrađen uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske u sklopu projekta „Imunoreakcije na hantaviruse i leptospire“ (143-1430115-0103, voditeljica: prof. dr. sc. Alemka Markotić).

Dio rada izrađen je pod vodstvom prof. dr. sc. Slobodana Paesslera (Department of Pathology and Institute for Human Infections and Immunity, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA) te u suradnji s prof. dr. sc. Allan R. Brasierom i prof. dr. sc. Heidi Spratt (Sealy Center for Molecular Medicine, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA).

ZAHVALA

Svojoj mentorici, prof. dr. sc. Alemki Markotić, iskreno se zahvaljujem što me još davno uvela u beskrajno zanimljiv svijet virusa. Hvala na poticajima i pruženim mogućnostima za vlastiti znanstveni razvoj, na korisnim stručnim savjetima i pomoći, na pruženoj znanstvenoj samostalnosti i slobodi u znanstvenom izričaju kroz sve godine zajedničkog rada.

Bobo, tebi se zahvaljujem na povjerenju i što si pokazao interes za ovu temu. Hvala ti na pomoći i što si uskočio kad je trebalo.

Rad na ovom doktoratu imao je posebnu draž i užitak zbog ekipe koja me svakodnevno okruživala. Ante, Ivan, Petra i Branka od srca vam hvala na pomoći i podršci koju ste pružali ... Bili ste poticajni – voljela sam naše „brainstorming" trenutke u Znanstvenoj i diskusije (...oko bilo čega); bili ste zabavni i duhoviti – cijenim dobar smisao za humor, bio je pravi „lijek" koji je pomogao prevladati kritične trenutke, osobito u trenucima sumnje i poljuljane vjere kad se činilo da sve ide nizbrdo; bili ste pravi „labmates"- hvala na pomoći oko pokusa kad je ustrebalo.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Heidi Spratt i prof. dr. sc. Allan R. Brasieru sa Sealy Center for Molecular Medicine, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA na svoj pomoći oko matematičkog modeliranja. Heidi posebno hvala na trudu, strpljivosti i spremnosti da odgovori na svaki moj upit.

Hvala, prvenstveno, prof. dr. sc. Iliji Kuzmanu, dr. sc. Antei Topić, dr. sc. Roku Čivljaku, dr. sc. Oktaviji Đaković Rode kao i ostalim kliničarima i medicinskom osoblju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević" koji su pomogli u regrutiranju bolesnika, prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka te osobito na dobroj vezi i komunikaciji na relaciji Istraživanje-Klinika. Nadam se da ćemo i nadalje dobro surađivati.

Od srca i najiskrenije jedno veliko, veliko hvala upućujem maloj, ali vrijednoj znanstvenoj grupi iz Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, a nekad s Imunološkog zavoda. Dr. sc. Dubravku Forčiću, Maji, Tanji, Jeleni, Renati i još jednoj Maji hvala za nesebičnu pomoć kroz sve godine od kad se poznajemo. Hvala što su mi vaša vrata uvijek bila otvorena i što je vaš odgovor na moje upite uvijek bio „da, imamo" i „može". Puno sam od vas naučila i zaista mi je uvijek gušt doći u vaš lab.

Hvala ekipi s Mikrobiologije, uvijek rado dođem na jednu gel elektroforezu.

Iskreno hvala svim bolesnicima i zdravim kontrolama koji su pristali sudjelovati u studiji jer bez njih ova disertacija ne bi bila moguća.

Posebnu zahvalnost izražavam svojim dragim mami, tati i sestri, koji su vjerovali u mene i naoružani s puno strpljivosti, ljubavi i razumijevanja podržavali moje školovanje do današnjih dana, a pogotovo zadnje mjesece pisanja ove disertacije. Znam da vam nije bilo lako. I da, vi ste logistička pomoć kakve nema na ovom svijetu. HVALA...na svemu!

Na kraju, najveća hvala mojim dušama: Vladeku, Noli i Bugi bez kojih ovaj rad ne bi imao smisao. Bili ste najstrpljivija družina koju znam...na puno razina. S tako puno ljubavi...bezuvjetne. Vaša potpora i bodrenje bili su mi najsnažnija pozitivna sila koja mi je davala vjetar u leđa. Iako vjerojatno ne razumijete previše od onog što je unutra napisano, ovaj rad posvećujem vama jer je unutra utkan i svaki trenutak koji sam tijekom ovog razdoblja propustila s vama. Sretna sam što vas imam. Volim vas do svemira, i natrag.
P.S. Noli, kada si me ono prije dva mjeseca pitala koliko još imam redova za napisati u doktoratu, sada ti konačno mogu reći da sam napisala sve redove ☺. *Lidija/Lila/Lidek/mama*

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

RANE IMUNOREAKCIJE U MONONUKLEARNIM STANICAMA PERIFERNE KRVI UZROKOVANE VIRUSOM PUUMALA

LIDIJA CVETKO KRAJINOVIĆ
Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

Cilj ovoga istraživanja bio je istražiti komponente urođene i stečene imunosti ključne u ranom perifernom imunološkom odgovoru na hantavirusnu infekciju kao i mogući regulacijski učinak miRNA na periferni imunološki odgovor. U mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s hemoragijskom vrućicom s bubrežnim sindromom (HVBS) uzrokovanim virusom Puumala (PUUV) određivana je relativna ekspresija gena urođene i stečene imunosti kao i miRNA, tehnologijom *real-time* PCR *array*-a. Rezultati su pokazali supresiju ranog imunološkog odgovora na PUUV, tj. ekspresije gena koji kodiraju sintezu receptora za prepoznavanje obrazaca mikroorganizama, kemokina i kemokinskih receptora, drugih citokina, transkripcijskih faktora kao i pojedinih signalnih molekula. Funkcionalne analize pokazale su da supresija ekspresije opisane skupine gena modulira upalni odgovor stanica putem interferencije s različitim staničnim signalnim putovima. Po prvi je puta pokazana biološka značajnost miRNA u regulaciji imunološkog odgovora tijekom HVBS-a. Detektirane promjene na razini imunološkog odgovora mogu se dovesti u korelaciju s težinom bolesti, ali ne i s količinom virusa u krvi. MAPK8, CCR5, IL-10, STAT1, STAT4, miR21 i miR19a mogli bi biti potencijalni prediktori patogeneze HVBS-a.

(129 stranica, 24 slike, 13 tablica, 205 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *hantavirusi, virus Puumala, ekspresija miRNA, imunološki odgovor, hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom*

Mentori: prof. dr. sc. Alemka Markotić
prof. dr. sc. Slobodan Paessler

Ocjenjivači: dr. sc. Snježana Židovec Lepej, znanstvena savjetnica
dr. sc. Dubravko Forčić, znanstveni savjetnik
prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

EARLY IMMUNOREACTIONS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS INDUCED BY PUUMALA VIRUS

LIDIJA CVETKO KRAJINOVIĆ
University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

The aim of this study was to explore the components of innate and adaptive immunity important in the early peripheral immune response to hantaviral infection as well as possible regulatory effect of miRNA to peripheral immune response. Using real-time PCR array technology, the relative expression of immune response genes and miRNA was measured in peripheral blood mononuclear cells of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) infected with Puumala virus (PUUV). The results showed suppression of the early immune response to PUUV i.e. genes coding for the synthesis of pattern recognition receptors, chemokines and their receptors, other cytokines, transcription factors as well as some signalling molecules. Functional analysis showed that down regulation of the expression of described set of genes modulates the inflammatory response by interfering with various cell-signalling pathways. For the first time, the biological importance of miRNA has been shown in the regulation of immune response during HFRS. Changes detected at the immune response level have been associated with disease severity but not with viral load in the blood. MAPK8, CCR5, IL-10, STAT1, STAT4, miR21 and miR19a could be potential predictors of HFRS pathogenesis.

(129 pages, 24 figures, 13 tables, 205 references, original in Croatian)

Keywords: *hantaviruses, Puumala virus, miRNA expression, immune response, hemorrhagic fever with renal syndrome*

Supervisors: Prof Alemka Markotić, MD, PhD
Prof Slobodan Paessler, DVM, PhD

Reviewers: Snježana Židovec Lepej, PhD, Scientific Advisor
Dubravko Forčić, PhD, Scientific Advisor
Prof Mirna Ćurković Perica, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Definicija problema 1

1.2 Svrha i cilj rada 3

1.3 Radne hipoteze 3

1.4 Zadaci rada i metodologija istraživanja 3

2. LITERATURNI PREGLED 6

2.1 Hantavirusi 6

2.1.1 Karakteristike hantavirusnog genoma, proteoma i viriona 6

2.1.2 Hantavirusi i njihovi rezervoari 8

2.2 Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS) 11

2.2.1 Epidemiologija i rasprostranjenost HVBS-a 11

2.2.2 Klinička slika HVBS-a 12

2.2.2.1 Faktori koji utječu na težinu bolesti 13

2.2.2.2 Liječenje i prevencija HVBS-a 14

2.2.3 Patogeneza HVBS-a 15

2.2.3.1 Patologija inducirana virusom 16

2.2.3.2 Imunopatologija 17

2.2.4 Imunoreakcije na hantavirusnu infekciju 18

2.2.4.1 Urođena imunost 18

2.2.4.2 Stečena imunost 20

2.3 MikroRNA molekule (miRNA) 21

2.3.1 miRNA i imunološki odgovor 23

2.3.1.1 miR-146 23

2.3.1.2 miR-155 24

2.3.1.3 miR-223 24

2.3.2 miRNA i hantavirusna infekcija 24

3. ISPITANICI I METODE 26

3.1 Ispitanici 26

3.1.1 Raspodjela bolesnika s HVBS-om prema stupnju težine bolesti 26

3.2 Kontrolna skupina ispitanika 26

3.3 Materijali 27

3.3.1 Otopine i puferi 27

3.3.2 Reagensi 28

3.4 Oprema, računalni programi i potrošni materijal 31

3.5 Metode 34

3.5.1 Postupak prikupljanja uzoraka krvi 34

3.5.1.1 Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi na gradijentu gustoće 34

3.5.1.2 Postupak odvajanja seruma 34

3.5.2 Određivanje specifičnih protutijela na PUUV 35

3.5.3 Detekcija genomske RNA PUUV 35

3.5.3.1 Izolacija ukupne RNA iz pune krvi 35

3.5.3.2 Metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u jednom koraku 35
3.5.3.3 *Nested* PCR 36
3.5.4 Određivanje razine viremije PUUV 36
3.5.4.1 Izolacija ukupne RNA iz seruma 36
3.5.4.2 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu 37
3.5.5 Analiza ekspresije gena imunološkog odgovora u mononuklearnim stanicama periferne krvi 38
3.5.5.1 Izolacija ukupne RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi 39
3.5.5.2 Sinteza prvog lanca cDNA 39
3.5.5.3 *Real-time* PCR *array* 40
3.5.6 Određivanje koncentracije citokina i kemokina u serumu 40
3.5.7 Određivanje prisutnosti fosforiliranog NFκB (p65) proteina u mononuklearnim stanicama periferne krvi 41
3.5.7.1 Izolacija proteina iz mononuklearnih stanica periferne krvi 41
3.5.7.2 Western blot analiza za p-NFκB p65 42
3.5.8 Analiza ekspresije gena miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi i u serumu 42
3.5.8.1 Izolacija ukupne RNA (miRNA) iz seruma 43
3.5.8.2 Sinteza prvog lanca cDNA 43
3.5.8.3 *Real-time* PCR *array* za zrele miRNA molekule 43
3.5.9 Prikupljanje podataka o kliničkim i laboratorijskim parametrima 44
3.5.10 Statistička analiza podataka 44
3.5.11 Bioinformatička analiza podataka 45

4. REZULTATI 46

4.1 Kliničke karakteristike bolesnika s HVBS-om 46

4.2 Analiza ranog perifernog imunološkog odgovora u bolesnika s HVBS-om tijekom infekcije PUUV 48
4.2.1 Analiza ekspresije gena koji sudjeluju u urođenom i stečenom imunološkom odgovoru 48
4.2.2 Usporedba ekspresije gena koji sudjeluju u urođenom i stečenom imunološkom odgovoru prema težini kliničke slike bolesnika s HVBS-om 50
4.2.3 Određivanje koncentracije IL-10, CXCL10 i sCD40L u serumu 53
4.2.4 Mjerenje aktivacije NFκB proteina u mononuklearnim stanicama periferne krvi 60

4.3 Uloga miRNA u modulaciji ranog perifernog imunološkog odgovora virusom PUU 61
4.3.1 Identifikacija potencijalnih miRNA regulatora imunološkog odgovora domaćina na infekciju PUUV 61
4.3.2 Promjene u ekspresiji miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom infekcije PUUV spram težini bolesti 63

4.4 Analiza bioloških putova promijenjenih uslijed infekcije PUUV 65

4.5 Identifikacija imunoloških markera težine i ishoda bolesti 67
4.5.1 Kliničke karakteristike bolesnika s blagom i sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom HVBS-a uzrokovanog PUUV 67
4.5.2 Viremija u bolesnika s blagom i sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom HVBS-a uzrokovanog PUUV 72
4.5.3 Međuodnosi imunoloških parametara prema laboratorijskim parametrima i razini viremije 73
4.5.4 Identifikacija imunoloških prediktora patogeneze HVBS-a neparametrijskim modeliranjem 76

5. RASPRAVA 78

6. ZAKLJUČCI 91

7. LITERATURA 94

8. PRILOZI 118
9. ŽIVOTOPIS 126

1. UVOD

Hantavirusi su humani patogeni iz roda *Hantavirus* unutar porodice *Bunyaviridae*. U prirodi se virusi održavaju i cirkuliraju u perzistentno inficiranim domaćinima, malim sisavcima (primarno glodavcima, noviji podaci priključuju i skupinu kukcojeda, šišmiša). Širenje virusa putem inhalacije kontaminiranog aerosola uzrokuje kod ljudi jednu od dvije klinički manifestne bolesti - hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS) ili hantavirusni plućni sindrom (HPS) ovisno o kojoj vrsti virusa se radi i na kojem geografskom području ga nalazimo (1-3).

HVBS je bolest koju geografski nalazimo na području Europe i Azije gdje cirkulira nekoliko patogenih hantavirusa [virusi Hantaan (HTNV), Seoul (SEOV), Puumala (PUUV) i Dobrava (DOBV)]. Najraširenij hantavirus u Europi je PUUV koji je ujedno i najznačajniji među njima, uzrokujući najveći broj infekcija godišnje. Unutar roda Hantavirus nalazimo i viruse koji se za sada smatraju apatogenim ili uvjetno patogenim za ljude budući da nema dovoljno čvrstih dokaza koji bi upućivali da uzrokuju bolest u ljudi (1, 4, 5).

Za razliku od prirodnih rezervoara u kojih je infekcija asimptomatska, kod HVBS bolesnika nalazimo širok spektar različitih kliničkih stanja od inaparentne ili blage bolesti do fulminantne hemoragijske bolesti s teškim bubrežnim ili kardio-pulmonalnim zatajenjem i smrću (1, 6).

Hantavirusi specifično inficiraju vaskularni endotel i shodno tome, izazivaju bolest čije su glavne patološke značajke trombocitopenija i povećana endotelna permeabilnost praćena istjecanjem intravaskularne tekućine. Pored endotelnih stanica, monociti/makrofazi i dendritičke stanice su također važne ciljne stanice ovih virusa (6-12).

1.1 Definicija problema

Mehanizmi koji, u slučaju patogenih hantavirusa, vode do HVBS-a još uvijek su vrlo slabo istraženi i malo se o njima zna jednako kao i o imunološkom odgovoru organizma na hantavirusnu infekciju. Čini se da virus *per se* nije citotoksičan i da ovi patološki događaji nisu posljedica direktnog učinka samog virusa i/ili virusom inducirane stanične nekroze. U prilog tome govori to da hantavirusi ne izazivaju citopatski efekt u endotelnim stanicama *in vivo* (9, 12) kao ni u drugim primarnim stanicama permisivnim za hantaviruse *in vitro* (13-15).

S druge pak strane povećane količine proupalnih citokina i kemokina kao i faktora koji utječu

na permeabilnost nađene su kao odgovor na infekciju u staničnim kulturama kao i kod bolesnika s HVBS-om (16-23). Prema dosadašnjim spoznajama za HVBS se smatra da je imunološki posredovana bolest u kojoj ključnu ulogu u patogenezi imaju indirektni mehanizmi kao što su snažni upalni odgovor i regrutacija upalnih stanica na mjesto inficiranih ciljnih stanica, a da sama hantavirusna infekcija samo u ograničenoj mjeri utječe na funkciju endotelnih stanica (24, 25). Ovaj model imunopatoloških odgovora na infekciju mogao bi prvenstveno objasniti kasniju fazu hantavirusne infekcije kao i razvoj patoloških promjena kod bolesnika inficiranih hantavirusima.

S druge strane studije su pokazale da u ranoj fazi infekcije patogeni hantavirusi mogu izbjeći indukciju urođenih staničnih odgovora, a koji su pak izrazito potaknuti kod infekcija nepatogenim hantavirusima. *In vitro* je pokazano da se nepatogeni hantavirusi slabo ili nikako ne repliciraju u humanim ciljnim stanicama, te da induciraju visoku razinu transkripcije gena stimuliranih interferonom. Patogeni hantavirusi sprečavaju ranu indukciju antivirusnog odgovora regulirajući i interferirajući s interferonskim signalnim putovima (17, 25-27). Također je *in vitro* pokazano da patogeni hantavirusi interferiraju sa još nekoliko signalnih putova u inficiranim humanim stanicama te potiču u njima specifične transkripcijske odgovore kako bi uspješno inficirali stanice. U kasnijoj fazi infekcije svi hantavirusi induciraju gene stimulirane interferonom što sugerira da bi patogeni hantavirusi mogli suprimirati rani antivirusni odgovor urođene imunosti (17). Spoznaje o tome što se događa u ranoj fazi hantavirusne infekcije zasada se temelje isključivo na rezultatima *in vitro* istraživanja, prvenstveno na modelu endotelnih stanica. Ono o čemu gotovo da i nema spoznaja je kako virus interferira sa stanicama imunološkog sustava u ranoj fazi infekcije budući da se pokazalo da su monociti/makrofazi i dendritičke stanice vrlo vjerojatne ciljne stanice za hantaviruse i da bi mogle posredovati u diseminaciji virusa u organizmu tijekom akutne faze HVBS-a. Kako bi razumjeli što leži u podlozi interferencije hantavirusa s normalnim staničnim funkcijama i aktivacijom imunološkog odgovora tijekom ranih događaja važno je prvo odgovoriti na pitanje koje su to ključne imunološke komponente kao i moguće regulacijske molekule koje sudjeluju u tim procesima.

1.2 Svrha i cilj rada

Kako bih to dokazala ciljevi istraživanja bili su:

1. istražiti ulogu komponenti urođene i stečene imunosti u ranom imunološkom odgovoru mononuklearnih stanica periferne krvi u bolesnika s HVBS-om uzrokovanim PUUV

2. definirati potencijalno regulacijsko djelovanje staničnih miRNA molekula na rane imunoreakcije u mononuklearnim stanicama periferne krvi i serumu u bolesnika s HVBS-om uzrokovanim PUUV

3. procijeniti biološke interakcije i vjerojatne biološke putove značajne za imunopatogenezu HVBS-a na temelju detektiranih promjena u ranom imunološkom odgovoru na razini mononuklearnih stanica periferne krvi

4. analizirati potencijalnu vrijednost detektiranih bioloških imunomarkera kao ranih prediktora težine kliničke slike i ishoda bolesti

1.3 Radne hipoteze

Osnovna hipoteza koju sam željela ispitati ovim istraživanjem je da se na osnovu analize perifernog imunološkog odgovora u ranoj fazi infekcije PUUV mogu identificirati imunološki biomarkeri za HVBS. Također sam pretpostavila da bi stanične miRNA molekule mogle imati utjecaj na status perifernog imunološkog odgovora i biti korisni molekularni marker za izučavanje imunopatološkog odgovora tijekom infekcije PUUV.

1.4 Zadaci rada i metodologija istraživanja

1. Odabir ispitanika za studiju

Studija je provedena na bolesnicima u kojih je serološki i/ili molekularno potvrđena dijagnoza HVBS-a uzrokovanog PUUV. Bolesnici su bili hospitalizirani u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu tijekom 2012. godine. Kontrolnu skupinu sačinjavali su zdravi ispitanici, zaposlenici Klinike za infektivne bolesti te ostali dobrovoljci u kojih nije bilo kliničkih znakova ili sumnje na neku akutnu infekciju, a koji su prema spolu i dobi odgovarali skupini ispitanika.

- prikupiti uzorke krvi
- detektirati specifična IgM protutijela na PUUV u serumu
- detektirati genomsku RNA PUUV

2. Određivanje viremije

- mjeriti razinu RNA PUUV u serumu HVBS bolesnika

Iz seruma bolesnika s HVBS-om izolirati virusnu RNA pomoću QIAamp Viral RNA Mini Kit-a. Nadalje, kvantitativnim *real time* RT-PCR-om detektirati i kvantificirati genom PUUV.

3. Analiza ranog perifernog imunološkog odgovora

- odrediti relativnu ekspresiju gena urođene i stečene imunosti u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Iz mononuklearnih stanica periferne krvi bolesnika s HVBS-om i zdravih kontrola izolirati ukupnu RNA koristeći TriPure Isolation Reagent. Relativnu ekspresiju gena urođene i stečene imunosti mjeriti *real-time* PCR *array*-om.

- odrediti razinu odabranih citokina i kemokina u serumu

ELISA testom mjeriti koncentracije IL-10, CXCL10 i sCD40L u serumu bolesnika s HVBS-om i zdravih kontrola.

- mjeriti aktivaciju NFκB proteina u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Iz mononuklearnih stanica periferne krvi bolesnika s HVBS-om i zdravih kontrola izolirati ukupne proteine koristeći TriPure Isolation Reagent. Metodom Western blota detektirati prisutnost fosforilirane forme p65 podjedinice NFκB kompleksa (p-NFκB p65).

4. Identifikacija potencijalnih miRNA regulatora ranog perifernog imunološkog odgovora

- odrediti relativnu ekspresiju miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi i u serumu

Iz mononuklearnih stanica periferne krvi i iz seruma bolesnika s HVBS-om i zdravih kontrola izolirati miRNA koristeći TriPure Isolation Reagent odnosno miRNeasy Serum/Plasma kit. Relativnu ekspresiju miRNA mjeriti *real-time* PCR *array*-om.

5. Analiza bioloških puteva povezanih s induciranim ranim imunološkim odgovorom

- procijeniti biološke interakcije diferencijalno eksprimiranih gena i miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi na temelju kojih ću pomoću IPA analize (IPA, od engl. *Ingenuity Pathways Analysis*) identificirati biološke funkcije, molekularne i stanične funkcije, kanonske signalne puteve važne za rani imunološki odgovor na PUUV

6. Identifikacija imunoloških markera težine i ishoda bolesti

- retrospektivno prikupiti podatke o kliničkim i laboratorijskim parametrima bolesnika s HVBS-om iz medicinske dokumentacije
- definirati razlike u kliničkim i laboratorijskim karakteristikama između bolesnika s blagom i bolesnika sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom HVBS-a uzrokovanog PUUV u ranoj akutnoj fazi bolesti neparametrijskom i deskriptivnom statistikom
- analizirati promjene u ranom imunološkom odgovoru na PUUV i njegovim mogućim regulatorima u ovisnosti o težini bolesti
- odrediti međuodnose imunoloških parametara prema kliničkim, laboratorijskim parametrima i količini PUUV u perifernoj cirkulaciji testom Spearmanove korelacije ranga
- identificirati imunološke prediktore patogeneze neparametrijskim MARS modeliranjem

2. LITERATURNI PREGLED

Hantavirusi su skupina virusa koja je objedinjena unutar roda *Hantavirus* koji pripada porodici *Bunyaviridae*. Prema International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) službeno su priznate 24 hantavirusne vrste, no posljednjih nekoliko godina otkriven je značajan broj novih hantavirusa u novim rezervoarima koji još čekaju svoju službenu potvrdu (28). U odnosu na pripadnike ostala četiri roda unutar ove porodice koji se prenose člankonošcima, hantavirusi čine iznimku, i u prirodi kruže unutar specifičnih populacija malih sisavaca (glodavci, kukcojedi, šišmiši). Neki hantavirusi koje prenose glodavci su patogeni za ljude i uzrokuju jednu od dvije klinički manifestne bolesti - hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS) ili hantavirusni plućni sindrom (HPS) ovisno o kojoj vrsti virusa se radi i na kojem geografskom području ga nalazimo. HVBS se karakteristično pojavljuje na području Europe i Azije, dok je HPS ograničen na oba američka kontinenta pa viruse koje ih uzrokuju kolokvijalno nazivamo hantavirusima Starog i Novog svijeta (1-3). Unatrag nekoliko godina Afrika postaje područje na kojem se intenzivno pronalaze nove vrste hantavirusa u različitim vrstama afričkih malih sisavaca, ali još uvijek nema dovoljno dokaza koji bi ih povezali s bolešću u ljudi (29).

2.1 Hantavirusi

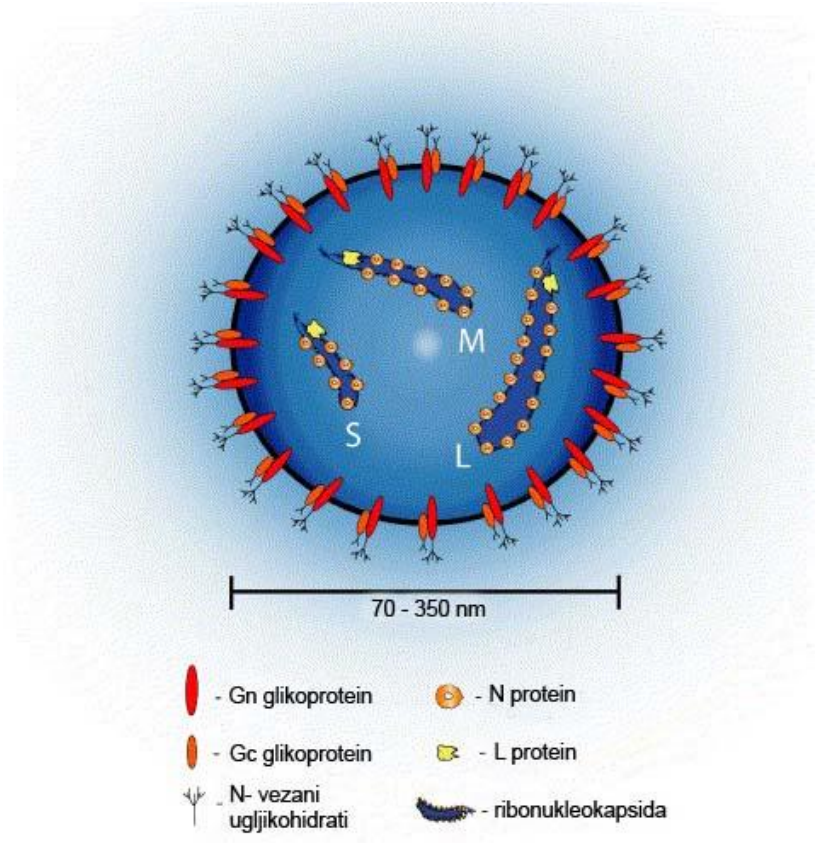
2.1.1 Karakteristike hantavirusnog genoma, proteoma i viriona

Karakteristično za sve članove porodice *Bunyaviridae*, hantavirusi su jednolančani RNA virusi negativnog polariteta s genomom raspodjeljenim u tri segmenta koji su prema svojoj veličini nazvani mali (S, od engl. *small*, 1.6-2.1 kb), srednji (M, od engl. *medium*, 3.6-3.7 kb) i veliki (L, od engl. *large*, 6.4-6.6 kb) segment (30, 31). Virusna RNA svakog segmenta sadrži otvoreni okvir čitanja (ORF, od engl. *open reading frame*) omeđen kratkim nekodirajućim regijama na 3' i 5' krajevima (32).

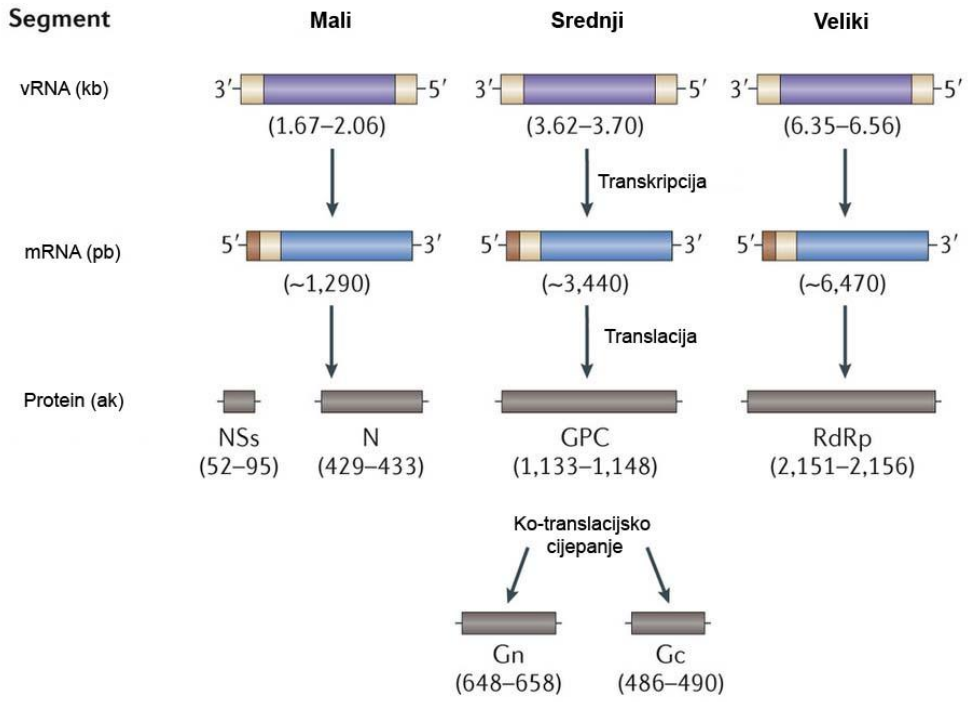
Genomski segmenti S, M i L redom kodiraju četiri strukturna proteina: nukleokapsidni protein N, dva površinska glikoproteina Gn i Gc koji ko-translacijskim procesiranjem nastaju iz jednog glikoproteinskog prekursora te protein L ili RNA-ovisnu RNA polimerazu (RdRp, od engl. *RNA-dependent RNA polymerase*) (33). Protein N je glavni strukturni protein važan u transkripciji i translaciji virusnih proteina i virusnom pakiranju dok glikoproteini Gn i Gc posreduju pri ulasku virusa u stanicu omogućavajući vezanje virusne čestice za stanične

receptore. Kod hantavirusa koje prenose glodavci iz porodice *Cricetidae* na segmentu S nalazimo dodatni ORF koji se preklapa s okvirom čitanja za protein N, a kodira nestrukturni protein (NS, od engl. *non-structural protein*) (**Slika 1** i **Slika 2**) (3, 34, 35). Protein NS ima imunomodulatornu funkciju kao slabi inhibitor interferona, ali vrlo je vjerojatno da ima i druge funkcije (36, 37).

Virusni RNA-segmenti i proteini N međusobno formiraju ribonukleoproteinske komplekse koji su, zajedno s nekoliko molekula RdRp, upakirani u okruglu ili pleiomorfnu virusnu česticu raspona veličine 70-350 nm u promjeru. Sami krajevi svakog segmenta sadrže komplementarne nukleotide s mogućnošću formiranja strukture ukosnice te tako postižu vizualni učinak kružne molekule nukleokapside. Virion je izvana obavijen lipidnom ovojnicom čiju površinu prekrivaju heteromerni izdanci formirani od virusnih glikoproteina Gn i Gc (**Slika 1**) (33, 38, 39).



Slika 1. Virion hantavirusa (modificirano prema: Jonsson i sur. 2005, ref. 35)



Slika 2. Organizacija hantavirusnog genoma i proteoma (modificirano prema: Vaheri i sur. 2013, ref. 3)

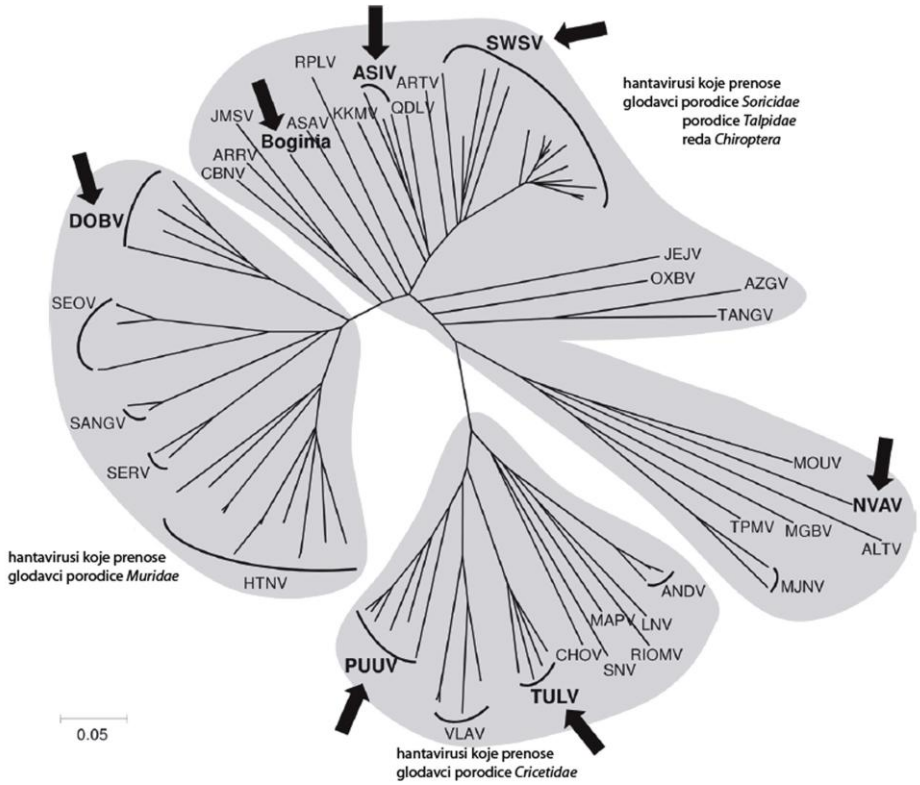
2.1.2 Hantavirusi i njihovi rezervoari

U prirodi se virusi održavaju i cirkuliraju u perzistentno inficiranim domaćinima, malim sisavcima. Osnovnim domaćinima se smatraju mali glodavci (red *Rodentia*) (2, 40). Noviji podaci hantavirusnim domaćinima pridružuju i nekoliko drugih grupa malih sisavaca - kukcojede (red *Soricomorpha*) (41-48) i šišmiše (red *Chiroptera*) (48-52) - u kojima su relativno nedavno pronađene nove vrste hantavirusa.

Općenito se smatra da kod hantavirusa vlada snažna specifičnost prema određenom domaćinu na način da je svaki hantavirus vezan uz jednu primarnu vrstu ili nekoliko blisko srodnih podvrsta rezervoara. Posljedično, maksimalni geografski domet gdje je prisutan i aktivan pojedini hantavirus limitiran je geografskim područjem gdje je rasprostranjen njegov specifični domaćin rezervoar. Ta povezanost između hantavirusa i njihovih domaćina rezervoara ogleda se u sličnosti njihovih filogenija i do sada se objašnjavala teorijom dugogodišnje zajedničke ko-evolucije (34, 40). Ipak, unatoč tom općem pravilu postoje dokazi prelaska hantavirusa na druge vrste domaćina tijekom svoje evolucije (engl. *host-switch*) što je pokazano i kod hantavirusa koje prenose glodavci i koje prenose kukcojedi (47, 53). Neka istraživanja pokazuju da je možda izvjesnije da je takva konvergentna filogenija

rezultat recentnijih događaja u evolucijskoj povijesti kao što su prelazak određenog hantavirusa na novog domaćina i njegova adaptacija u novoj vrsti (54).

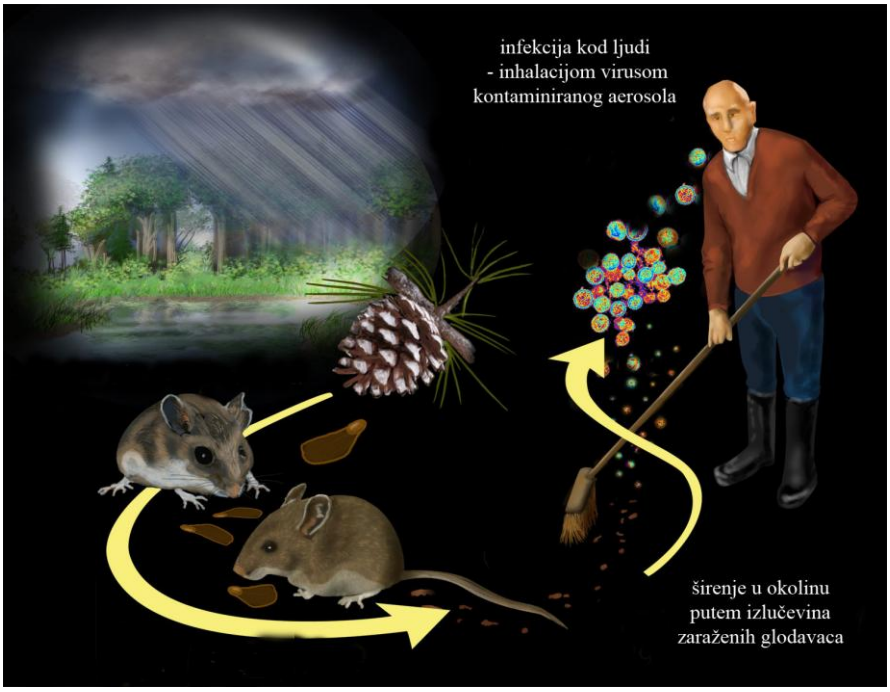
Prema rezervoarima u kojima ih nalazimo hantaviruse možemo podijeliti u nekoliko različitih skupina ili filogrupa. **Prvu** skupinu sačinjavaju virusi koje prenose glodavci iz porodice *Muridae*, podporodice *Murinae* (miševi i štakori Starog kontinenta), kao što su virus Hantaan (HTNV), virus Dobrava (DOBV), virus Seoul (SEOV), virus Sangassou (SANGV) i dr. Virusi **druge** skupine se prenose glodavcima iz porodice *Cricetidae*, podporodice *Arvicolinae* (voluharice i leminzi) i tu spadaju virus Puumala (PUUV), virus Tula (TULV), virus Prospect Hill (PHV), virus Khabarovsk (KHAV), virus Topografov (TOPV) i dr. te podporodica *Sigmodontinae* i *Neotominae* (miševi i štakori Novoga kontinenta) kojih su glavni predstavnici virus Sin Nombre (SNV), virus Andes (ANDV), visus New York (NYV), virus Black Creek Chanal (BCCV) i dr. **Treću** skupinu osim virusa Thottapalayam (TPMV), za kojeg se već dugo zna, tvore novootkriveni hantavirusi kao virus Seewis, virus Imjin, virus Nova, virus Oxbow, virus Magboi, virus Mouyassue i dr. koje prenose kukcojedi iz porodica *Soricidae* (rovke) i *Talpidae* (krtice) ili šišmiši (red Chiroptera) (**Slika 3**) (3, 48, 55).



Slika 3. Filogenetsko stablo patogenih i nepatogenih hantavirusa. Strelice označavaju hantaviruse koji su detektirani na području Europe. (modificirano prema: Klempa i sur. 2013, ref. 55)

Hantavirusi se iz zaraženih glodavaca izlučuju u okolinu putem sline, mokraće i fecesa. Prijenos hantavirusa u populaciji rezervoara je horizontalni. Događa se indirektno putem inhalacije aerosoliziranih virusom kontaminiranih izlučevina. Za sada se smatra da je ovo dominantni put prijenosa unutar populacije domaćina, iako se čini da i direktni prijenos preko ugriza ima značajnu ulogu za cirkulaciju virusa u populaciji glodavaca u prirodi (56).

Čovjek za hantaviruse predstavlja slučajnog domaćina i smatra se "slijepom ulicom" u kruženju hantavirusa u prirodi kojom se virus ne širi dalje. Infekcija hantavirusima kod ljudi rezultat je direktnog kontakta sa zaraženim glodavcima ili izlaganja njihovim izlučevinama koje sadrže patogeni virus. Uglavnom se događa inhalacijom virusom kontaminiranog aerosola, što je ujedno i glavni put prijenosa s rezervoara na ljude (**Slika 4**) (56). Kod HVBS-a se infekcija ne prenosi s čovjeka na čovjeka što je za sada opisano jedino kod infekcije ANDV koji uzrokuje HPS (57).



Slika 4. Put prijenosa hantavirusa s glodavaca na ljude
(modificirano prema: http://www.nsf.gov/news/news_images.jsp?cntn_id=107095&org=NSF, Zasluge: Zina Deretsky, National Science Foundation)

2.2 Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS)

2.2.1 Epidemiologija i rasprostranjenost HVBS-a

HVBS je zoonoza koja se endemski pojavljuje na području Europe i Azije. Među do sada identificiranim hantavirusima samo je manji broj onih koji su patogeni za ljude. HVBS uzrokuje nekoliko različitih hantavirusa: HTNV, SEOV, PUUV, DOBV, virus Amur/Soochong (AMRV/SOOV). Na azijskom kontinentu glavnina ukupnog broja HVBS slučajeva odnosi se na Kinu, Južnu Koreju i daleki istok Rusije. Bolest je primarno uzrokovana s HTNV (prototip roda Hantavirus) čiji je rezervoar prugasti poljski miš (*Apodemus agrarius*). Značajan javnozdravstveni problem predstavlja i HTNV-u sličan virus AMRV/SOOV uzrokujući teške epidemije HVBS-a, a prenosi ga korejski poljski miš (*Apodemus peninsulae*). Iako je prosječna incidencija HVBS-a u Aziji iznimno velika, geografski gledano postoje velike varijacije u incidenciji (2).

SEOV se smatra kozmopolitskim hantavirusom i više je vezan za urbana područja. Prenose ga crni i smeđi štakor (*Rattus rattus, Rattus norvegicus*) koji su raširen širom svijeta uglavnom zahvaljujući globalnoj trgovini. Uzrokuje srednje teški oblik HVBS-a, ponajviše u Aziji, ali i u drugim gradovima širom svijeta. Infekcije SEOV u Europi se čine jako rijetke. Svega je nekoliko opisanih kliničkih slučajeva uglavnom povezanih s divljim štakorima ili štakorima-kućnim ljubimcima kao izvorom infekcije (58-62).

U Europi se godišnje dijagnosticira više od 10,000 slučajeva HVBS-a, a zadnjih godina zamijećen je kontinuirani porast broja oboljelih. Za to je zaslužno nekoliko patogenih hantavirusa koji cirkuliraju na ovom prostoru. Najraširenij hantavirus u Europi je PUUV koji uzrokuje blažu formu HVBS-a zvanu *nephropathia epidemica* (NE). Ujedno je i najznačajniji među njima uzrokujući najveći broj infekcija godišnje. Prenosi ga šumska (riđa) voluharica (*Myodes glareolus*). Infekcije PUUV do sada nisu zabilježene na Britanskom otočju, južnim dijelovima Mediterana i u najsjevernijim područjima tundre (5).

Drugi važan, ali i virulentniji virus (ili virusi) na području Europe je patogen koji je pronađen u nekoliko različitih vrsta miševa iz roda *Apodemus*. U hantavirusnom znanstvenom svijetu vode se dugogodišnje polemike oko nomenklature hantavirusa pronađenih u europskim miševima iz roda *Apodemus*. Trenutno su na ICTV listi virusa priznate dvije neovisne vrste DOBV i virus Saaremaa (SAAV) (28). Sve veći broj novih spoznaja dovodi u pitanje postojeću klasifikaciju. Za sada još uvijek nije postignuto suglasje, ali predložena je nova, unutar-vrsna klasifikacija prema kojoj bi unutar jedne hantavirusne vrste DOBV postojala

četiri genotipa (Dobrava, Kurkino, Saaremaa i Sochi). DOBV u Europi i europskom dijelu Rusije cirkulira unutar tri vrste prirodnih rezervoara. Infekcije u ljudi uzrokovane DOBV-genotipom Dobrava uglavnom se detektiraju na području jugoistočne Europe, a samo povremeno se registriraju i u centralnoj Europi te je za njih odgovoran žutogrli šumski miš (*Apodemus flavicollis*). U centralnoj Europi kao i u središnjoj Rusiji (europski dio) glavni uzročnik je DOBV-genotip Kurkino kojeg prenosi *A. agrarius*. *A. agrarius* također je rezervoar i DOBV-genotip Saaremaa koji je prisutan na manjem izoliranom otočnom dijelu Estonije. Za sada nema molekularne potvrde koja bi povezala infekcije u ljudi s genotipom Saaremaa, osim nekoliko serološki potvrđenih slučajeva HVBS-a iz tog dijela Estonije. U endemskom području južne Rusije (europski dio), srednje teške do teške slučajeva HVBS-a uzrokuje DOBV-genotip Sochi, a prenosi ga crnomorski poljski miš (*Apodemus ponticus*) (63). Epidemije HVBS-a prostorno su povezane s prirodnim habitatima glodavaca prenosioca hantavirusa. Veće epidemije se ciklički javljaju svakih nekoliko godina i prate dinamiku glodavaca na određenom prostoru. Možemo reći da na području klimatski umjerene Europe, godine bogate šumskim urodom prethode pojavi epidemija HVBS-a. Velika količina uroda žira i bukvice pogoduje ekstremnom povećanju brojnosti populacija *M. glareolus* i *A. flavicollis*, a time i virusom inficiranih jedinki. Svemu tome pogoduju i brojni klimatski čimbenici (64-66).

Populacije ljudi koje su izložene najvećem riziku oboljevanja od HVBS-a su ljudi koji zbog svoje profesije ili svojih aktivnosti dolaze u kontakt s populacijama glodavaca i njihovim staništima. Tu prvenstveno spadaju: šumari, zemljoradnici, lovci, vojnici, izletnici te stanovnici endemskih područja (67).

2.2.2 Klinička slika HVBS-a

Za razliku od prirodnih rezervoara u kojih je infekcija kronična i gotovo asimptomatska (68), HVBS je u ljudi akutna bolest koja može zahvatiti više različitih organa i organskih sustava (bubreg, kardiocirkulatorni sustav, pluća, središnji živčani sustav, a opisano je djelovanje i na endokrini sustav) i doživljava se kao generalizirana infekcija. U bolesnika s HVBS-om nalazimo široki spektar različitih kliničkih stanja od često inaparentne ili blage bolesti do fulminantne hemoragijske bolesti s teškim bubrežnim ili kardio-pulmonalnim zatajenjem i mogućim smrtnim ishodom (1, 3, 69). Klasični klinički tijek HVBS-a prolazi kroz pet različitih faza: febrilna, hipotenzivna, oligurijska, poliurijska i rekonvalescentna, iako se najčešće bolest ne prezentira kroz svih pet faza. Nakon 2-4 tjedna inkubacije (može varirati od

1-6 tjedana) bolest počinje naglom pojavom kliničkih simptoma. Tijekom rane febrilne faze u trajanju od 3-7 dana, bolesnici s HVBS-om se prezentiraju s vrućicom, glavoboljom, slabošću, bolovima u mišićima i leđima, bolovima u trbuhu, mučninom s ili bez povraćanja i proljevom. Često su prisutni i poremećaji vida koji se najčešće manifestiraju kao tzv. zamućenje vida. Jedan od tipičnih ranih znakova bolesti je difuzno crvenilo lica i vrata te gornjeg dijela prsnog koša. Febrilnu fazu slijedi kratka hipotenzivna faza u trajanju 1-2 dana, a karakterizirana je padom krvnog tlaka kao posljedice povećane propusnosti vaskularoga endotela i istjecanja tekućine iz intravaskularnog prostora u intersticij. Može rezultirati kardiogenim šokom i posljedičnom smrću. Pri blažem obliku bolesti hipotenzija se ne registrira ili je samo prolazna pojava. Tijekom oligurijske ili anurijske faze, koja obično nastupa početkom drugog tjedna bolesti, bolesnici uglavnom pokazuju znakove pogoršanja bubrežne funkcije sve do bubrežnog zatajenja, gdje je kod težih slučajeva potrebno provesti liječenje hemodijalizom. Pored kardiogenog šoka, bubrežno zatajenje je također jedan od čestih razloga letalnog ishoda. Početak diuretičke faze je pozitivni prognostički znak za bolesnika. Tijekom poliurijske faze, kao kompenzacijski mehanizam, dolazi do izlučivanja velike količine urina. Uspostavom normalne diureze nastupa brzo kliničko poboljšanje. Nakon nekoliko dana započinje period rekonvalescencije. Oporavak je spor i postupan i može trajati od nekoliko tjedana pa čak do nekoliko mjeseci (2, 4, 69-71).

2.2.2.1 Faktori koji utječu na težinu bolesti

Postoje velike razlike u težini kliničkog tijeka HVBS-a (od blagog do vrlo teškog s letalnim ishodom).

Prosječna težina bolesti, između ostalog, ovisi o vrsti (genotipu) infektivnog agensa pa tako možemo reći da HTNV i AMRV/SOOV uzrokuju općenito težu kliničku sliku, SEOV srednje tešku, a PUUV blažu kliničku sliku. Stope smrtnosti HVBS-a kreću se oko 15% za HTNV i AMRV/SOOV, <1% za SEOV i do 0,4% za bolest uzrokovanu s PUUV (2, 4, 69-71). Također je vrlo zanimljivo da različiti genotipovi DOBV, unatoč međusobno velikoj genetskoj sličnosti, pokazuju razlike u virulenciji i izazivaju različiti stupanj težine HVBS-a. Najteži tijek bolesti sa stopom smrtnosti 10-12% opisuje se u jugoistočnoj Europi gdje infekcije u ljudi izaziva genotip Dobrava. Kliničke manifestacije infekcija genotipom Sochi su također srednje teške do teške sa stopom smrtnosti >6%, dok genotip Kurkino uzrokuje uglavnom blagi do umjereno teški tijek bolesti sa smrtnim ishodom u 0,3-0,9% slučajeva. Do sada nema registriranih kliničkih slučajeva Saaremaa infekcije pa se čini da je infekcija

uglavnom asimptomatskog karaktera (5, 63, 70, 72-74). Osim što postoji razlika u težini bolesti među različitim tipovima hantavirusa, postoji i značajna varijabilnost u kliničkoj prezentaciji bolesti uzrokovana istom vrstom virusa.

Zanimljivo je istaknuti i značajnu razliku u patogeničnosti između virusa koji se održavaju u istoj vrsti prirodnog rezervoara. Tako hantavirusi koje prenosi *A. agrarius* u Europi (DOBV genotipovi Kurkino i Saaremaa) uglavnom uzrokuju blagu bolest ili potpuno asimptomatsku infekciju (72-74), dok HTNV koji u istom rezervoaru cirkulira na području Azije rezultira teškom, životno ugrožavajućom infekcijom (2).

Opseg i trajanje viremije može znatno varirati i uvelike ovisi o tipu hantavirusa. Općenito govoreći, velika količina virusa u plazmi pronađena je kod teških hantavirusnih infekcija uzrokovanih npr. HTNV, DOBV, SNV, ANDV, dok je razina viremije znatno niža u blažoj formi HVBS-a uzrokovanog PUUV (75-81). Nekoliko studija je pokazalo povezanost razine viremije s težinom bolesti, gdje su bolesnici s težom kliničkom slikom imali značajno veću razinu virusa u cirkulaciji od bolesnika s blažim tijekom bolesti (75, 76, 78, 79). Čini se da količina PUUV u krvi nije povezana s težinom HVBS-a (81). Također je pokazano da viremija kod HVBS-a traje puno duže nego što se prije mislilo, a dužina trajanja ovisi o patogeničnosti virusa (80). Visoka viremija u ranoj fazi razvoja HVBS-a mogla bi biti pokazatelj nepovoljnog ishoda bolesti.

Osim genetskih čimbenika samih virusa odnosno virusnih genotipova, na ishod bolesti također utječu i genetski (predisponirajući) čimbenici domaćina. Pokazano je da su učestalost pojedinih HLA haplotipova u populaciji kao i polimorfizmi određenih gena domaćina povezani s različitom težinom kliničke slike HVBS-a uzrokovanog različitim hantavirusima (82-85).

2.2.2.2 Liječenje i prevencija HVBS-a

Za sada ne postoji sigurni i učinkoviti specifični antivirusni lijek, cjepivo ili imunomodulator koji je odobren za liječenje virusnih hemoragijskih vrućica, uključujući HVBS i NE. Liječenje HVBS-a zasniva se na simptomatskom liječenju uz balansiranu nadoknadu tekućine i elektrolita. Obuhvaća kontinuirano praćenje vitalnih parametara, rješavanje hipotenzije ili šoka, dehidracije, oligurije, krvarenja, plućnog edema. U slučaju akutnog bubrežnog zatajenja tijekom oligurijske faze provodi se liječenje hemodijalizom.

Jedina kontrolirana klinička studija provedena na bolesnicima s HVBS-om u Kini pokazala je pozitivan učinak ribavirina (analog nukleozida) na tijek bolesti smanjenjem rizika od smrtnog

ishoda, ako se s terapijom započne u ranoj fazi bolesti. Ovi rezultati su nedavno potvrđeni i činjenicom da ribavirin smanjuje pojavu oligurije i težinu bubrežne insuficijencije. Kao kratkotrajna neželjena pojava pri primjeni ribavirina zabilježena je anemija (86, 87). Budući da još nije registriran za tu indikaciju ribavirin se ne primjenjuje u kliničkoj praksi.

Razvoj cjepiva protiv HVBS-a ide u dva smjera. U Aziji je fokus uglavnom na inaktiviranim cjepivima. Nekoliko je cjepiva protiv HTNV i/ili SEOV, u kliničkim studijama provedenim u Kini i Koreji, pokazalo obećavajuće rezultate, ali još uvijek nema dovoljno uvjerljivih podataka o njihovoj stvarnoj učinkovitosti. Drugi je pristup razvoj molekularnih cjepiva. Do danas su samo dva takva cjepiva protiv HVBS-a testirana na ljudima. Jedno je rekombinantno cjepivo protiv HTNV, a drugo kombinirano DNA cjepivo koje bi trebalo pružati zaštitu protiv svih uzročnika HVBS-a zajedno (88, 89).

Kako trenutno nema specifičnog lijeka ni profilakse, mogućnost je jedino da se infekcija HVBS-a prevenira kontrolom prirodnih rezervoara i prakticiranjem mjera opreza kada se dolazi u kontakt s područjima gdje obitavaju glodavci.

2.2.3 Patogeneza HVBS-a

Mehanizmi koji vode do HVBS-a još uvijek su vrlo slabo istraženi i malo se zna o samoj patogenezi bolesti. Faktori koji otežavaju istraživanje patogeneze prvenstveno leže u nedostatku zadovoljavajućeg animalnog modela kojim bi se bolest mogla simulirati. Stoga se glavnina spoznaja o patogenezi bazira na *in vitro*/*ex vivo* istraživanjima te rijetkim kliničkim studijama. I ta istraživanja su dodatno otežana potrebom za specijaliziranim laboratorijima 3. stupnja biosigurnosti za rad s hantavirusima zbog, kod većine, njihovog visokopatogenog karaktera.

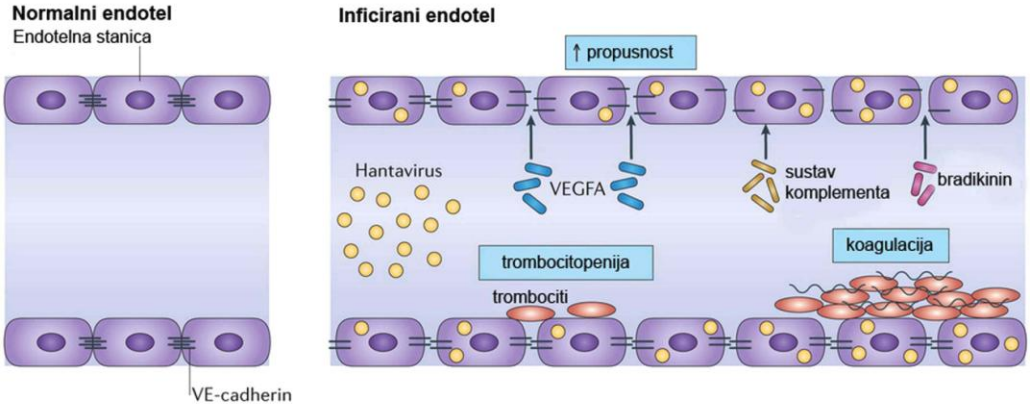
Povećana endotelna permeabilnost praćena istjecanjem intravaskularne tekućine (u vidu hemoragija ili edema) i akutna trombocitopenija, glavne su patološke značajke hantavirusne infekcije i smatra se da čine osnovu patogeneze HVBS-a (9, 12, 90). Njima bi se mogla objasniti većina simptoma i odlika infekcije u ljudi kao što su hipotenzija i bolovi u trbuhu, ekstravazacija tekućine u alveolarne prostore i nastanak edema pluća, kao i različite manifestacije krvarenja. Hantavirusi su jedni od samo nekoliko humanih patogena koji specifično inficiraju vaskularni endotel i pretežno se repliciraju u endotelnim stanicama kapilara različitih organa (7-9, 12, 91). No hantavirusna infekcija nije litička. Čini se da virus *per se* nije citotoksičan i da ovi patološki događaji nisu posljedica neposrednog učinka virusa na inficirane stanice i/ili virusom inducirane stanične nekroze. U prilog tome govori činjenica

da hantavirusi ne izazivaju citopatski efekt u inficiranom endotelu (9, 12) kao ni u drugim primarnim stanicama permisivnim za hantaviruse *in vitro* (13-15). Do sada istraživanja ukazuju da je vjerojatnije da je patogeneza HVBS-a kompleksan multifaktorijalan proces i da je nastanak bolesti rezultat i direktnog i indirektnog djelovanja hantavirusa (**Slika 5**).

2.2.3.1 Patologija inducirana virusom

Direktni učinci hantavirusa koji bi doprinosili patogenezi rezultat su djelovanja hantavirusnih proteina (ili drugih virusnih komponenti) na stanične proteine, signalne puteve i/ili međustaničnu komunikaciju što potencijalno rezultira deregulacijom normalne stanične fiziologije (24, 92). Patogeni hantavirusi koriste β_3 integrine kao receptore za ulazak u stanicu i pokazalo se da prilikom te interakcije mogu deregulirati funkciju integrina na endotelnim stanicama (93, 94). Poznato je da β_3 integrini imaju primarnu ulogu u regulaciji vaskularnog integriteta, permeabilnosti endotelnih stanica i funkcije trombocita (24).

Tako vezanjem hantavirusa za β_3 integrine dolazi do poremećene regulacije lučenja faktora permeabilnosti VEGF (od engl. *vascular endothelial growth factor*) i njime posredovane hiperpermeabilnosti (19) što sugerira da bi direktna interakcija hantavirusa i staničnog receptora mogla pridonositi propusnosti vaskularnog endotela (**Slika 5**) (24).



Slika 5. Mogući patogenetski mehanizmi na vaskularnom endotelu tijekom infekcije hantavirusima (modificirano prema: Vaheri i sur. 2013, ref. 3)

Inficirane endotelne stanice na svojoj površini adheriraju mirujuće trombocite gdje hantavirusi predstavljaju most, vežući se glikoproteinima za površinske β_3 integrine eksprimirane na obje vrsta stanica. Ovo može utjecati na funkciju i endotelnih stanica i

trombocita i moglo bi objasniti mehanizam nastanka trombocitopenije (**Slika 5**) (95). Dosadašnje spoznaje ukazuju da se direktnom interakcijom hantavirusa s integrinskim receptorima mogu objasniti neke od patofizioloških pojava uočenih kod inficiranih bolesnika i da bi takva vrsta interakcije mogla doprinijeti patogenezi bolesti.

2.2.3.2 Imunopatologija

U naporu imunološkog sustava da riješi infekciju, možda čak veći doprinos patogenezi imaju učinci indirektnog djelovanja hantavirusa tzv. imunopatogenetski učinci. To su učinci različitih komponenti imunološkog sustava, nastali bilo kao rezultat virusom inducirane deregulacije imunološkog odgovora ili kao rezultat prirodnog odgovora na hantavirusnu infekciju, što u oba slučaja potencijalno rezultira imunološki-posredovanim oštećenjem (92, 96, 97). I zaista, HVBS se danas primarno smatra imunološki posredovanom bolešću i predloženo je nekoliko mehanizama hantavirusne imunopatogeneze koji najvjerojatnije zajedno pridonose razvoju bolesti.

Malobrojna istraživanja ukazuju na to da su citokini važni za patogenezu HVBS-a. Različite stanice npr. monociti, makrofazi, limfociti luče citokine kao odgovor na proupalne signale budući da oni sudjeluju u regulaciji upalnog odgovora. Povećane vrijednosti različitih citokina, prvenstveno proinflamatornih IL-1, IL-6 i TNF-α, pronađene su u serumu, urinu i tkivima bolesnika s HVBS-om tijekom akutne faze bolesti (20-23, 98-104). Jedno vrijeme se smatralo da je tzv. „citokinska oluja“ jedan od glavnih uzroka nastanka simptoma tijekom hantavirusne infekcije.

Stanični imunološki odgovor se također povezuje s imunopatologijom (105, 106). Tijekom akutne hantavirusne infekcije dolazi do snažnog T-staničnog odgovora u kojem sudjeluju i citotoksični (CD8+ ili CTL, od engl. *cytotoxic T lymphocytes*) i pomoćnički (CD4+ ili Th, od engl. *helper T lymphocytes*) T-limfociti. Smatra se da citotoksični T-limfociti doprinose kapilarnom istjecanju tekućine kod HVBS-a ili prekomjernom sekrecijom proinflamatornih citokina ili direktnim ubijanjem virusom inficiranih endotelnih stanica. Nekoliko je manje ili više indirektnih dokaza koji to potvrđuju kao npr. korelacija izvanstanične razine perforina i laktat dehidrogenaze u serumu, markera oštećenja stanične membrane (107). Na uzorcima biopsije otkriveno je da se citotoksični T-limfociti akumuliraju u bubrezima, a posebno se lokaliziraju na mjestima tkivnog oštećenja (21, 108). To bi moglo biti povezano s propuštanjem i oštećenjem epitelnog sloja te pridonositi akutnom bubrežnom oštećenju. No nedavna studija je pokazala da su inficirane endotelne stanice zaštićene od citotoksičnog

djelovanja CD8+ T-limfocita tako što hantavirusni protein N inhibira djelovanje granzima B i kaspaze 3, centralnih molekula u procesu T-staničnog ubijanja, te u njima ne dolazi do indukcije apoptoze. Ovo je mehanizam koji bi mogao objasniti zašto usprkos snažnom citotoksičnom odgovoru limfocita tijekom hantavirusne infekcije, inficirane endotelne stanice u bolesnika s HVBS-om nisu uništene (109).

2.2.4 Imunoreakcije na hantavirusnu infekciju

2.2.4.1 Urođena imunost

Pravovremeno i učinkovito aktiviranje antivirusnog stanja kao odgovor na virusni patogen važno je za uspostavu kontrole nad infekcijom, odnosno za sprječavanje nekontrolirane virusne replikacije i njegove diseminacije u domaćinu. U ranoj fazi hantavirusne infekcije nalazimo različit urođeni imunološki odgovor domaćina na infekciju patogenim hantavirusima u odnosu na infekciju nepatogenim hantavirusima. Upravo je ta razlika važna i zanimljiva budući bi mogla određivati virulenciju, diseminaciju i patologiju hantavirusa. U više studija je pokazano da u ranoj fazi infekcije patogeni hantavirusi mogu izbjeći indukciju urođenih staničnih odgovora koji su pak izrazito potaknuti kod infekcija nepatogenim hantavirusima (17, 25-27, 110-112). Za sada je malo podataka o tome kako dolazi do prepoznavanja hantavirusa od strane urođenog imunološkog odgovora. Čini se da bi, barem kod patogenih hantavirusa, prepoznavanje moglo ići preko TLR-3 receptora tijekom čega dolazi do odgođene aktivacije antivirusnog odgovora tek u kasnijoj fazi infekcije, a istovremeno s njim javlja se i upalni odgovor (112). Centralnu ulogu u regulaciji urođenog imunološkog odgovora i kontroli hantavirusne infekcije *in vitro* igraju interferoni tipa I. Patogeni hantavirusi sprječavaju ranu indukciju interferonskog odgovora u stanici regulirajući njegovu transkripciju putem virusnih proteina te na taj način omogućavaju replikaciju virusa unutar humanih endotelnih stanica (26, 27, 111, 112). Nedavno je pokazano da je pored IFN tipa I u kontrolu antivirusnog odgovora potaknutog hantavirusima uključen i IFN tipa III (113, 114).

I dok nepatogeni hantavirusi u endotelnim stanicama rano potiču visoku razinu transkripcije gena stimuliranih interferonom (ISG, od engl. *interferon-stimulated genes*), kod patogenih hantavirusa otpor stanice na infekciju se razvija, ali s pomakom u fazi, budući da do indukcije ISG dolazi tek u kasnijoj fazi infekcije. To snažno sugerira da bi patogeni hantavirusi mogli suprimirati rani antivirusni odgovor urođene imunosti (17, 25, 115). Usporedne studije

potvrdile su i različitu indukciju MxA proteina, koji se smatra pouzdanim aktivacijskim markerom urođenog interferonskog sustava (tip I i tip III) (26, 112, 114). Svi tipovi interferona i sami pokazuju antivirusno djelovanje na hantaviruse (116, 117) ako je prisutan prije same infekcije. No nakon već uspostavljene infekcije učinak interferona na blokiranje virusne replikacije je značajno umanjen (27, 113). Način na koji se patogeni hantavirusi u kasnijoj fazi infekcije repliciraju usprkos prisustvu visoke razine ISG u stanici ostaje za daljnja istraživanja. Uzrok rezistencije na interferon kod već uspostavljene infekcije mogla bi biti prisutnost velike količine virusnih produkata u stanici domaćina koja prelazi količinu antivirusnih efektora. Kakva će biti sudbina hantavirusne infekcije mogla bi ovisiti upravo o ravnoteži između proizvedenih virusnih produkata i količine antivirusnih efektora koji se susreću u stanici domaćina.

Spoznaje što se događa u ranoj fazi hantavirusne infekcije za sada se temelje isključivo na rezultatima *in vitro* istraživanja primarno na modelima endotenih stanica, glavnih ciljnih stanica koje inficiraju hantavirusi. Histopatološke analize tkiva bolesnika s HPS-om uputile su na činjenicu da monociti/makrofazi također predstavljaju ciljne stanice za hantaviruse (9, 118). Monociti/makrofazi izolirani iz periferne krvi bili su prijemčljivi na infekciju različitim hantavirusima (15, 18, 116, 119, 120), a pokazano je i da mogu inficirati humane alveolarne makrofage (121). Inficirani makrofazi producirali su vrlo niske razine TNF-α koje su bile nedostatne da induciraju patološke promjene u endotelnim stanicama. Infekcija patogenim hantavirusima potaknula je u monocitima diferencijaciju prema dendritičkim stanicama uz povišenu ekspresiju ko-stimulatorih molekula (18). Hantavirusi mogu inficirati i nezrele dendritičke stanice istovremeno ih aktivirajući vodeći pojačanoj ekspresiji ko-stimulatornih, adhezijskih i molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, od engl. *major histocompatibility complex*). Tijekom infekcije dolazi i do značajne produkcije proupalnih citokina (122). Monociti/makrofazi i dendritičke stanice su općenito imunološki važne stanice budući da mogu producirati IFN tip I i druge upalne citokine, a pokazano je da hantavirusi potiču stanoviti imunološki odgovor u njima.

Prirodnoubilačke stanice (NK, od engl. *natural killer cells*) su uključene u stanični imunološki odgovor na hantavirusnu infekciju kao dio urođene imunosti. Tijekom akutne infekcije dolazi do rapidne ekspanzije NK-stanica čiji broj ostaje povišen duže od dva mjeseca. Takva populacija NK-stanica eksprimira na svojoj površini aktivacijske stanične receptore i pokazano je da je funkcionalna *ex vivo*. Ovi nalazi sugeriraju na mogućnost postojanja stanovite NK-stanične memorije i nakon što je virus uklonjen iz organizma (123).

Vrlo malo toga znamo što se događa u HVBS bolesnika tijekom rane akutne faze infekcije. Kako bi razumjeli što leži u podlozi interferencije hantavirusa s normalnim staničnim funkcijama i aktivacijom imunološkog odgovora tijekom ovih ranih događaja, važno je prvo definirati koji su to aktivacijski signali i putovi koje hantavirusi induciraju i reguliraju, odnosno odgovoriti na pitanje koje su to ključne imunološke komponente koje sudjeluju u tim procesima.

2.2.4.2 Stečena imunost

Hantavirusi induciraju vrlo rani humoralni imunološki odgovor koji je stabilan i perzistira tijekom cijelog trajanja bolesti. Već kod pojave prvih simptoma u serumu se mogu detektirati protutijela svih subklasa dominantno specifična za protein N, glavni hantavirusni antigen. Neutralizirajuća protutijela stvaraju se kasnije tijekom progresije bolesti i to primarno specifična za Gn i Gc glikoproteine (124). U ranoj fazi bolesti važan je učinkovit odgovor specifičnih protutijela da bi se što više smanjila diseminacija virusa i ograničio broj virusom inficiranih endotelnih stanica. Titar protutijela bilježi se relativno dugo nakon preboljele hantavirusne infekcije (i do nekoliko desetaka godina nakon infekcije PUUV) što sugerira moguću zaštitu od reinfekcije (125-127). Nekoliko studija je pokazalo da je humoralni imunološki odgovor povezan s težinom bolesti. Kod težeg oblika bolesti bio je značajno niži specifični IgG odgovor (80, 81, 128).

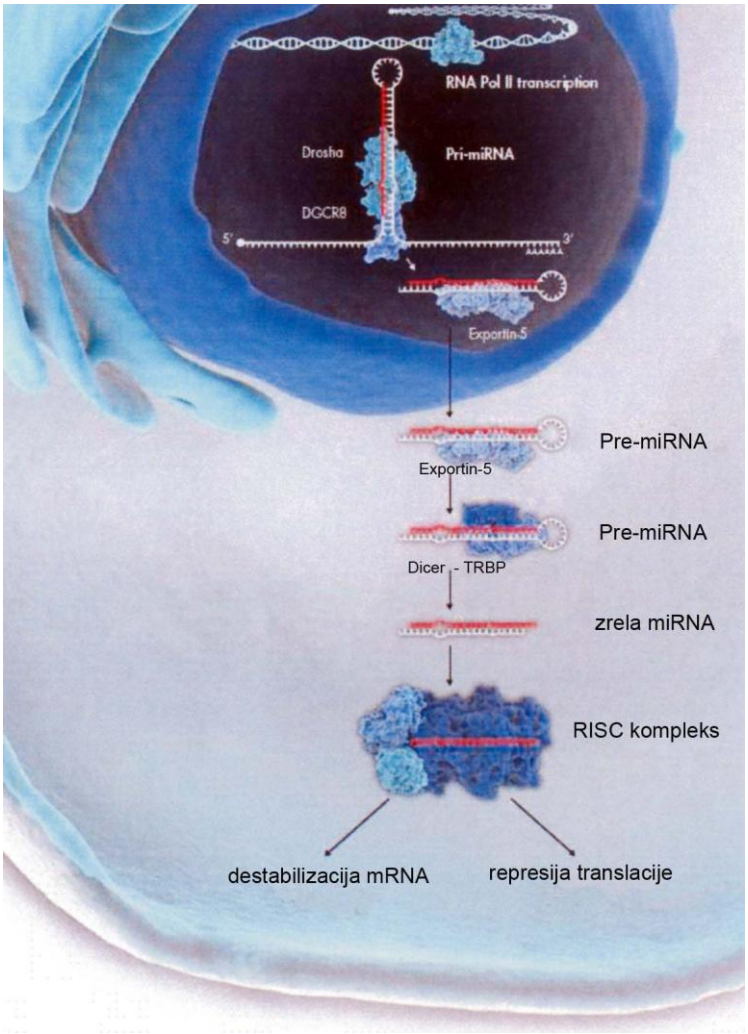
Neutralizirajuća protutijela važna su za redukciju viremije u plazmi, ali ona ne eliminiraju virusnu replikaciju u tkivima. Za eliminaciju hantavirusa iz tkiva važna je T-stanična imunost. U kontrolu hantavirusne replikacije uključeni su i CD8+ i CD4+ T-limfociti. Hantavirusni protein N je imunodominantni virusni antigen kojeg prepoznaju antivirusni T-limfociti. On je najkonzerviraniji u odnosu na ostale strukturne proteine i ujedno najzastupljeniji virusni protein koji se stvara tijekom infekcije (129). T-stanični odgovor obično doseže vrhunac već kod pojave simptoma, u febrilnoj fazi bolesti (130, 131). Efektorske molekule, kao što su perforin i granzim B u velikoj su mjeri eksprimirane na površini stanica što sugerira da su ove efektorske stanice visoko aktivne.

Kod bolesnika s akutnom infekcijom PUUV u bioptatima bubrega nađeni su infiltrati T-limfocita (uglavnom CD8+) u kolokalizaciji s virusnim antigenom i RNA (21, 108). Ograničene studije na makaki majmunima inficiranim PUUV pokazali su rezultate slične opservacijama u ljudi (132). Tijekom rane faze infekcije HVBS bolesnici imaju povišen Th1 odgovor (tj. IFNγ i IgG3), a Th2 odgovor (tj. IL-6, IL-10 i IgG1) tijekom kasne faze bolesti.

Kako se viremija rješava, frekvencija efektorskih T-limfocita se smanjuje (130, 131). Regulacija i obuzdavanje T-staničnog odgovora vjerojatno je rezultat negativnih regulacijskih signala unutar samih efektorskih stanica kao i vanjske regulacije, moguće putem regulatornih T-limfocita. Aktivnost regulatornih T-limfocita je suprimirana tijekom simptomatske infekcije HTNV u ljudi, budući da odgovor na hantavirusnu infekciju uključuje prekomjernu produkciju proupalnih citokina (133). Na postojanje dugoročne efikasne T-stanične memorije upućuje prisustvo memorijskih CD8+ T-limfocita specifičnih za epitope proteina N čak 15 godina nakon akutne hantavirusne infekcije (134).

2.3 MikroRNA molekule (miRNA)

Prije otprilike 20-ak godina u organizmu *Caenorhabditis elegans* otkrivena je klasa malih nekodirajućih jednolančanih RNA molekula veličine 20-25 parova baza koje su nazvane mikro RNA molekule (miRNA, od engl. *microRNA*). Od tog vremena broj novootkrivenih miRNA drastično je porastao i trenutno ih ima oko 1500 identificiranih u ljudi. Njihova osnovna biološka funkcija u stanicama sisavaca je posttranskripcijska regulacija genske ekspresije putem RNA interferencije. Biogeneza miRNA strogo je regulirani proces i ide u nekoliko koraka. Započinje u jezgri stvaranjem prekursora miRNA tzv. pri-miRNA koja daljnjim procesiranjem prelazi u drugu prekursorsku formu tzv. pre-miRNA. Pre-miRNA prelazi iz jezgre u citoplazmu gdje dodatnim procesiranjem gubi formu ukosnice i nastaje RNA dupleks. Obično jedan lanac iz dupleksa, odnosno zrela miRNA, bude inkorporirana u RISC kompleks (od engl. *RNA-induced silencing complex*) gdje se odvija interakcija miRNA i ciljne mRNA molekule po principu komplementarnosti sekvenci. Do utišavanja gena dolazi na dva načina ili snižavanjem razina ciljnih mRNA molekula njihovom destabilizacijom ili represijom translacije odnosno sprječavanjem prevođenja mRNA u protein (**Slika 6**) (135). Funkcija miRNA vrši se u tzv. procesirajućim tijelima (P-bodies, od engl. *processing bodies*) unutar citoplazme gdje se akumuliraju zajedno sa svojim ciljnim mRNA (136). Određena miRNA može imati više različitih ciljnih mRNA molekula s kojima stupa u interakciju, a također pojedina mRNA može biti ciljna struktura za više različitih miRNA koje mogu djelovati u suradnji da bi potisnuli njenu translaciju (137, 138).



Slika 6. Biogeneza miRNA (modificirano prema: http://www.sabiosciences.com/manuals/BRO_GEF_miRNA_0212_lr.pdf)

Pokazano je da ove molekule u stanicama sisavaca sudjeluju u regulaciji niza staničnih funkcija (npr. stanični rast i razvoj, diferencijacija, homeostaza, metabolizam). U različitim tipovima stanica i tkiva nalaze se eksprimirani različiti setovi miRNA (139). Sukladno s tim, ne čudi da miRNA imaju sastavnu ulogu u regulaciji brojnih bioloških procesa.

Njihova disregulacija je česta u različitim bolestima u ljudi. Najviše su istraživane u tumorima, a povezuju se i s kardiovaskularnim, upalnim, autoimunim i bolestima jetre, mišića i kože (140). Mikro RNA koje nisu eksprimirane na odgovarajući način tj. koje nemaju normalnu ekspresiju uzrokuju značajne promjene u ključnim biološkim putovima i pokretači su patogeneze bolesti.

2.3.1 miRNA i imunološki odgovor

Iako je njihova uloga u imunosti tek nedavno identificirana, brojne studije koje se pojavljuju sugeriraju da miRNA igraju značajnu i važnu ulogu u imunološkom odgovoru organizma. Mikro RNA sudjeluju u regulaciji različitih aspekata imunološkog odgovora kao što su razvoj i diferencijacija B- i T-limfocita, proliferacija stanica imunološkog sustava, prekapčanje protutijela, otpuštanje medijatora upale (141). Pokazano je također da miRNA imaju direktni antivirusni učinak djelujući na ključne proteine i putove kojima se koriste neki virusi (142-144).

Prvu naznaku da bi miRNA mogle regulirati imunološki odgovor dali su 2004. godine Chen i sur. kada su pokazali selektivnu ekspresiju nekoliko miRNA u timusu i koštanoj srži (145). Do danas je u hematopoetskim stanicama identificiran značajan broj miRNA. Mnoge se od tih miRNA specifično eksprimiraju u stanicama i tkivima imunološkog sustava pa se tako na osnovu specifičnih ekspresijskih profila miRNA mogu selektivno razlikovati od stanica drugih tkiva. Sve hematopoetske stanice eksprimiraju pet visoko specifičnih miRNA – miR-142, miR-144, miR-150, miR-155 i miR-223 (146).

Vrlo je važno da procesi detekcije patogena, inicijacije upalnog odgovora kao i započinjanja specifičnog stečenog imunološkog odgovora budu strogo regulirani kako bi se izbjegao pretjerani upalni odgovor. Mikro RNA bi mogle biti važna veza između urođene i stečene imunosti i njihova disregulacija bi mogla imati ulogu u patogenezi upalnih bolesti (141, 147).

U nastavku slijede opisi regulatornog djelovanja nekoliko miRNA za koje je pokazano da su važne u imunološkom odgovoru.

2.3.1.1 miR-146

Porodica miR-146 sastoji se od dva člana miR-146a i miR-146b i oba su uključena u urođeni imunološki odgovor. Povećana ekspresija miR-146 detektirana je u mijeloidnim stanicama nakon njihove aktivacije putem TLR-2, -4 ili -5 ili nakon izlaganja proupalnim citokinima (TNF-α i IL-1β) (148, 149). S druge strane aktivacija TLR-3, -7 i -9 nije dovela do povećane ekspresije miR-146a (148). Pokazalo se da bi IRAK1 i TRAF6 mogle biti potencijalne mete za miR-146, a one su dio zajedničkog signalnog puta TLR-2, -4, -5 i IL-1β receptora. Mikro RNA-146a je negativno regulirao IL-8 i RANTES inducirane preko IL-1β, ali samo u prisutnosti visokih koncentracija IL-1β. To upućuje da je negativna sprega aktivirana samo tijekom jakog upalnog odgovora te da bi to moglo biti ključno u sprječavanju upalnog

odgovora da izmakne kontroli (149). Tako bi miR-146a mogao djelovati kao negativni regulator urođenog imunološkog odgovora.

2.3.1.2 miR-155

Centralna uloga miR-155 je u regulaciji T- i B-staničnog odgovora tijekom stečenog imunološkog odgovora. "Knockout" miševi za miR-155 pokazali su smanjenu produkciju protutijela i B-stanične memorije (150, 151). Također naivni T-limfociti imali su povećanu sklonost diferencijaciji u Th2 stanice radije nego u Th1 s pratećom produkcijom Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-10). T-stanični odgovor je bio narušen, a stanice su pokazale smanjenu produkciju IL-2 i IFN-γ kao odgovor na antigen (151, 152). Mikro RNA-155 vezan je i za urođeni imunološki odgovor budući da dolazi do njegove povećane ekspresije u makrofazima i monocitima uslijed aktivacije TLR-2, -3, -4, -9 (153). Za razliku od miR-146a, čini se da je miR-155 pozitivni regulator produkcije proupalnih medijatora tijekom urođenog imunološkog odgovora, jer je povećavao produkciju TNF-α u HEK293 stanicama. Također, stimulira proliferaciju granulocita i monocita. Regulacija ekspresije miR-155 ide preko transkripcijskih faktora AP-1 i NF-κB (151, 153).

2.3.1.3 miR-223

Ekspresija miR-223 vezana je za mijeloidne stanice u koštanoj srži i njegova povećana ekspresija vodi diferencijaciji u neutrofile. Pokazalo se da je negativni regulator proliferacije i aktivacije neutrofila (154, 155).

2.3.2 miRNA i hantavirusna infekcija

Poznato je da stanične miRNA igraju ključnu ulogu u regulaciji stanične ekspresije gena u različitim virusnim infekcijama (156, 157). Virusi su također razvili načine da naruše taj proces. Jedan od načina koji su virusi razvili je sposobnost da smanje ili povećaju ekspresiju specifičnih staničnih miRNA kako bi na taj način povećali svoju replikaciju (158). Imunoreakcije u hantavirusnoj infekciji igraju važnu ulogu u razvoju bolesti. Hantavirusi također reguliraju određene imunološke odgovore i interferiraju s različitim staničnim signalnim putevima u domaćinu kako bi uspješno uspostavili infekciju. No još uvijek vrlo slabo razumijemo mehanizme modulacije stanične imunosti u domaćinu inducirane hantavirusima. Moguće da bi baš mehanizmi koji leže u pozadini imunoreakcija tijekom

hantavirusne infekcije mogli biti posljedica promijenjene funkcije specifičnih miRNA važnih za regulaciju imunološkog odgovora.

Na koji način miRNA sudjeluju u hantavirusnoj infekciji gotovo da i nema podataka. Recentna literatura donosi tek dvije studije koje pokazuju da su miRNA uključene i u hantavirusnu infekciju. Pepini i sur. pokazali su da tijekom infekcije endotelnih stanica ANDV dolazi do promjene razina specifičnih miRNA, prvenstveno onih koje reguliraju procese angiogeneze i vaskularnog integriteta. Interferencija ANDV sa staničnim miRNA doprinijela je povećanoj permeabilnosti inficiranih endotelnih stanica. Ovo istraživanje je uputilo na moguću ulogu miRNA u patogenezi hantavirusne infekcije (159). Druga grupa autora je pokazala da su hantavirusi inducirali različite profile ekspresije miRNA u različitim vrstama stanica koje su inficirali, ali i da su se profili ekspresije značajno razlikovali između patogenih i nepatogenih hantavirusa. Mikro RNA u kojima je došlo do promjena uslijed infekcije bile su povezane s upalnim odgovorom i signalnim putevima posredovanim receptorima urođene imunosti (160).

Interferencija hantavirusa s normalnim funkcijama miRNA u stanicama imunološkog sustava mogla bi doprinijeti sprječavanju pravovremenog i adekvatnog imunološkog odgovora na infekciju i biti jedna od determinanti hantavirusne patogeničnosti.

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Ispitanici

U ovo istraživanje bili su uključeni bolesnici koji su zbog akutnog HVBS-a bili bolnički liječeni u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu tijekom 2012. godine. Dijagnoza HVBS-a postavljena je na temelju kliničke slike i potvrđena je laboratorijskom dijagnostikom. U istraživanje su uključeni samo bolesnici koji su imali serološki i/ili molekularno potvrđenu infekciju PUUV. Grupu ispitanika ukupno je sačinjavalo 39 bolesnika (35 muškaraca i 4 žene) u dobi između 25-71 godinu (**Tablica 1**).

Svi ispitanici dali su pismeni i usmeni informirani pristanak za sudjelovanje u studiji, a istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" kao i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.1 Raspodjela bolesnika s HVBS-om prema stupnju težine bolesti

Na temelju kliničkih i laboratorijskih pokazatelja u akutnoj fazi HVBS-a prikupljenih iz povijesti bolesti te uz pomoć bodovne ljestvice za procjenu težine bolesti (**Prilog 2** (**A** i **B**)) (161), bolesnici su bili razvrstani u tri skupine: bolesnici s blagim, srednje teškim i teškim tijekom bolesti. Budući da se radilo o bolesnicima inficiranim PUUV, gdje obično nalazimo lakši oblik bolesti, očekivano je bio mali broj onih s teškom kliničkom slikom. Stoga su u svrhu ovog istraživanja bolesnici raspodjeljeni u dvije skupine: bolesnici s blažom i bolesnici sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom gdje su posljednje dvije skupine bolesnika grupirane u jednu. Bolesnici koji su svrstani u skupinu sa srednje teškom/teškom bolesti, najčešće su imali jedan ili više od navedenih kriterija: liječenje u jedinici intenzivne njege, hipotenzija (sistolički krvni tlak $\leq$ 90 mmHg), tahikardija veća od 120 otkucaja/min., različite manifestacije krvarenja, potreba za transfuzijom, potreba za dijalizom, izrazito povišene vrijednosti ureje i kreatinina i radiološki potvrđene promjene na plućima (pneumonitis, pleuralni izljev).

3.2 Kontrolna skupina ispitanika

Kontrolnu skupinu sačinjavalo je 20 zdravih ispitanika, zaposlenika Klinike za infektivne bolesti te ostalih dobrovoljaca. Kriteriji za uključivanje u kontrolnu skupinu bili su da neposredno prije uzimanja uzoraka krvi kod kandidata nije bilo kliničkih znakova ili sumnje

na neku akutnu infekciju. Zdravi ispitanici su prema spolu i dobi odgovarali skupini bolesnika (**Tablica 1**).

Tablica 1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika

	HVBS bolesnici (N=39)	**Zdrave kontrole (N=20)**
Spol [M:Ž]	35:4	18:2
Dob, godine [medijan (raspon)]	41 (25-71)	37 (24-55)
Težina bolesti - Blagi - Srednje teški/teški	 24/39 15/39	

3.3 Materijali

Korišteni su reagensi visokog stupnja čistoće i kvalitete. Svojstva pojedinih reagensa navedena su u dokumentaciji priloženoj od strane proizvođača.

3.3.1 Otopine i puferi

- otopina fikola (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Uppsala, Švedska)
- otopina fenola i gvanidin tiocijanata za izolaciju nukleinskih kiselina i proteina (TriPure Isolation Reagent, Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka)
- otopina 0,3 M gvanidin-hidroklorida u 95% etanolu
- otopina 8 M ureje u Tris-HCl, pH 8,5
- **PBS pufer (fosfatni pufer)**
    - Sadrži: 1 tableta, otopiti u 500 ml destilirane vode (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Škotska, UK)
- **TE pufer**
    - Sadrži: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)
- **10X TBE pufer (Tris-boratni EDTA pufer, 50 mM)**
    - Sadrži: 108 g Tris baze, 55 g borne kiseline, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), dopuniti do 1 L destiliranom vodom

- **4X pufer za nanošenje uzoraka na gel**
    - Sadrži: 1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 4 ml 10% SDS, 4 ml glicerol, 200 µl bromofenolnog modrila, 40 µl 1M DTT, 4 µl 0,5 M EDTA, dopuniti do 10 ml destiliranom vodom
- **10X pufer za SDS-PAGE elektroforezu**
    - Sadrži: 25 mM Tris-HCl, 200 mM glicin, 0,1% SDS
- **1X pufer za transfer proteina**
    - Sadrži: 3 g Tris, 14,4 g glicin, 10 ml 10% SDS, 200 ml metanol, dopuniti do 1 L destiliranom vodom
- **1X TBS-T pufer (pufer za ispiranje)**
    - Sadrži: 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,05% Tween-20
- **1X pufer za blokiranje**
    - Sadrži: 5% BSA u TBS-T puferu

3.3.2 Reagensi

- **Reagena POC® PUUMALA IgM** (Reagena International Oy, Toivala, Finska)
    - Sadržaj kita: testna pločica; pufer
- **QIAamp Viral RNA Mini Kit** (Qiagen Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
    - Sadržaj kita: QIAamp Mini Spin kolonice; tubice za sakupljanje; AVL pufer; AW1 pufer; AW2 pufer; AVE pufer; RNA nosač (poli A)
- **RNeasy Mini Kit** (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
    - Sadržaj kita: RNeasy Mini Spin kolonice; tubice za sakupljanje (1,5 ml, 2 ml); RLT pufer; RPE pufer; RNaza-DNaza čista voda
- **miRNeasy Serum/Plasma kit** (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
    - Sadržaj kita: QIAzol® reagens za lizu; RNeasy® MinElute® Spin kolonice; tubice za sakupljanje (1,5 ml, 2 ml); RWT pufer; RPE pufer, RNaza-DNaza čista voda
- **Access RT-PCR System** (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
    - Sadržaj kita: AMV reverzna transkriptaza, 5 U/µl; *Tfl* DNA polimeraza, 5 U/µl; AMV/*Tfl* 5X reakcijski pufer; $MgSO_4$, 25 mM; dNTP mješavina, 10 mM svaki dATP, dCTP, dGTP i dTTP; RNaza-DNaza čista voda

- **miScript II RT kit** (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
    - Sadržaj kita: miScript mješavina reverzne transkriptaze; 10X miScript mješavina nukleotida; 5X miScript HiSpec pufer; RNaza-DNaza čista voda
- **LightCycler TaqMan Master** (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka)
    - Sadržaj kita: LightCycler® FastStart enzim (FastStart Taq DNA polimeraza); LightCycler® FastStart TaqMan® reakcijska mješavina (reakcijski pufer, $MgCl_2$, dNTP mješavina); RNaza-DNaza čista voda
- **RT^2 SYBR Green ROX qPCR Mastermix** (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
    - Sadrži: 2X RT^2 SYBR Green ROX qPCR reakcijsku mješavinu (HotStart DNA Taq polimeraza, PCR pufer, dNTP mješavina, SYBR Green boja)
- **miScript SYBR Green PCR kit** (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
    - Sadržaj kita: 2X QuantiTect® SYBR Green PCR reakcijska mješavina (HotStarTaq® DNA polimeraza, QuantiTect SYBR Green PCR pufer, dNTP mješavina, SYBR Green I boja, ROX™ referentna boja, $MgCl_2$, 5 mM); 10X miScript univerzalna početnica; RNaza-DNaza čista voda
- **Human Innate and Adaptive Immune Responses PCR array** (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
    - Sadrži: pločicu za PCR s 96 tubica od kojih svaka sadrži specifični par početnica za pojedini gen ili kontrolu; poklopce u obliku stripova
- **miRNA PCR array** (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
    - Sadrži: pločicu za PCR s 96 tubica od kojih svaka sadrži specifičnu uzvodnu početnicu za pojedinu miRNA ili kontrolu; poklopce u obliku stripova
- **ELISA test za IL-10** (Human IL-10 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems Europe, Abingdon, UK)
    - Sadržaj kita: mikrotitarska pločica s 96 udubina presvučena s mišjim monoklonskim protutijelom protiv IL-10; IL-10 standard, 5 ng/vijalici (rekombinantni ljudski IL-10); konjugat (mišje monoklonsko protutijelo protiv IL-10 konjugirano s peroksidazom iz hrena); Assay Diluent RD1W; Calibrator Diluent RD6P; pufer za ispiranje; reagens A (vodik-peroksid); reagens B (TMB supstrat); otopina za zaustavljanje reakcije (2 N sulfatna kiselina); pokrovne folije

- **ELISA test za CXCL-10** (Human CXCL10/IP-10 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems Europe, Abingdon, UK)
    - Sadržaj kita: mikrotitarska pločica s 96 udubina presvučena s mišjim monoklonskim protutijelom protiv CXCL-10; CXCL-10 standard, 5 ng/vijalici (rekombinantni ljudski CXCL-10); konjugat (poliklonsko protutijelo protiv CXCL-10 konjugirano s peroksidazom iz hrena); Assay Diluent RD1-56; Calibrator Diluent RD6Q; pufer za ispiranje; reagens A (vodik-peroksid); reagens B (TMB supstrat); otopina za zaustavljanje reakcije (2 N sulfatna kiselina); pokrovne folije
- **ELISA test za sCD40L** (Human CD40 Ligand/TNFSF5 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems Europe, Abingdon, UK)
    - Sadržaj kita: mikrotitarska pločica s 96 udubina presvučena s poliklonskim protutijelom protiv CD40L; CD40L standard, 40 ng/vijalici (rekombinantni ljudski CD40L); konjugat (poliklonsko protutijelo protiv CD40L konjugirano s peroksidazom iz hrena); Assay Diluent RD1-65; Calibrator Diluent RD5P; pufer za ispiranje; reagens A (vodik-peroksid); reagens B (TMB supstrat); otopina za zaustavljanje reakcije (2 N sulfatna kiselina); pokrovne folije
- nasumične početnice, 500 μg/ml (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
- specifične početnice za PUUV S segment, 50 μM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD; TIB Molbiol GmbH, Berlin, Njemačka) (Tablica 2)
- fluorescentno obilježena proba bojama FAM/TAMRA, 20 μM (Applied Biosystems, Life Technologies, SAD) (Tablica 2)
- dNTP mješavina, 10 mM svaki dATP, dCTP, dGTP i dTTP (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
- inhibitor RNaze, 40 U/μl (Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
- MMLV reverzna transkriptaza, 200 U/μl (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
    - Sadrži: 5X reakcijski pufer
- HotStart Taq polimeraza, 5 U/μl (Jena Bioscience, Jena, Njemačka)
    - Sadrži: 10X reakcijski pufer; $MgCl_2$, 25 mM
- DNaza, 1 U/μl (RQ RNase-free DNase, Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
    - Sadrži: 10X reakcijski pufer; otopina za zaustavljanje reakcije
- tRNA iz kvasca, ~10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD)

- standard RNA PUUV (10^8 kop/ml) (dobiven ljubaznošću Prof M. Weidmann-a)
- miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
- RNaza-DNaza čista voda (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
- voda za injekcije (B. Braun Melsungen, Melsungen, Njemačka)
- kloroform (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- 2-propanol (Kemig, Sesvete-Soblinec, Hrvatska)
- etanol (75%, 80%, 100%) (Claro-prom, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- agaroza (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD)
- boja za vizualizaciju DNA u agaroznom gelu (SYBR® Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, Life Technologies, SAD)
- DNA Loading Buffer, 6X (Thermo Scientific, SAD)
- DNA marker, 0,5 μg/μl (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Invitrogen, Life Technologies, SAD)
- poliakrilamid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD)
- bisakrilamid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD)
- Proteinski marker (ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Mol wt 8-220 kDa, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD)
- zečje poliklonsko protutijelo specifično za NFκB podjedinice p65 fosforilirane na poziciji Ser 536 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, SAD)
- zečje poliklonsko protutijelo specifično za β-aktin (abcam, Cambridge, UK)
- kozje anti-zečje IgG protutijelo konjugirano enzimom alkalna fosfataza (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, SAD)
- polyvinylidene difluoride (PVDF) membrana (Amersham Hybond-P, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švedska)
- Whatman papir (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švedska)
- kemiluminiscentni supstrat za alkalnu fosfatazu (ECF Substrate, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švedska)

3.4 Oprema, računalni programi i potrošni materijal

- stolna centrifuga Heraeus Multifuge 3L-R (Thermo Electron Corporation, Osterode, Njemačka)

- stolna centrifuga Rotofix 32A (Hettich Holding, Kirchlengern, Njemačka)
- stolna centrifuga s hlađenjem Mikro 200 R (Hettich Holding, Kirchlengern, Njemačka)
- LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka)
- PCR uređaj Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- real-time PCR uređaj LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka)
- program LightCycler Software, ver. 4.1.1.21 (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka)
- real-time PCR uređaj ABI 7500 Standard (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- program 7500 System SDS Software, ver. 1.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- program Microsoft Office Excel 2007 (Redmond, Washington, SAD)
- program STATISTICA, ver. 10.0 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, SAD)
- RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 (QIAGEN-SABiosciences, Frederick, Maryland, SAD)
- miScript miRNA PCR Array Data Analysis (QIAGEN-SABiosciences, Frederick, Maryland, SAD)
- Ingenuity pathways analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, Kalifornija, SAD)
- Multivariate adaptive regression splines (MARS) (Salford Systems, San Diego, Kalifornija, SAD)
- aparatura za horizontalnu gel elektroforezu Mini Sub CELL GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)
- uređaj za snimanje gelova ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)
- aparatura za vertikalnu SDS-PAGE elektroforezu (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švedska)
- transiluminator Kodak Digital Science Image Station 440CF (Kodak, Rochester, New York, SAD)
- vaga PB303-S DeltaRange (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- termoblok Thermomixer comfort 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- spektrofotometar BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- spektrofotometar za pločice PR 3100 TSC Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)

- horizontalna orbitalna tresilica za mikrotitarske pločice Titramax 1000 (Heidolph instruments, Schwabach, Germany)
- vorteks Lab dancer (IKA®-Werke, Staufen, Njemačka)
- automatske pipete s promjenjivim volumenom (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf, Hamburg, Njemačka; Thermo Scientific, SAD)
- multikanalne pipete s promjenjivim volumenom (10-100 µl, 30-300 µl) (Eppendorf, Hamburg, Njemačka; Thermo Scientific, SAD)
- pipetor Easy-pet (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vertikalni "laminarflow" kabinet, model KTP-A-IV (Klimaoprema, Samobor, Hrvatska)
- sigurnosni mikrobiološki kabineti, model KTB-NS-II (Klimaoprema, Samobor, Hrvatska)
- kombinirani hladnjaci 2-8 °C, -20 °C ili niže (Končar, Zagreb, Hrvatska)
- ledenica -80 °C ili niže Hera freeze (Thermo Scientific, SAD)
- vakutejneri (3, 6 ml; Z serum aktivator zgrušavanja, K_3EDTA) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Njemačka)
- LightCycler® kapilare (20 µl) (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka)
- PCR tubice (0,2 ml) (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- mikrotubice (1,5 ml, 2 ml) (Eppendorf, Hamburg, Njemačka; Starlab, Hamburg, Njemačka)
- polipropilenske tubice s čepom (5 ml) (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- tubice za reagense i centrifugiranje (15 ml, 50 ml) (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka; Starlab, Hamburg, Njemačka)
- kivete za spektrofotometar (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- sterilni nastavci s filterom za pipete (10, 20, 100, 200, 1000 µl) (Eppendorf, Hamburg, Njemačka; Starlab, Hamburg, Njemačka)
- serološke pipete za jednokratnu upotrebu (2, 5, 10, 25 ml) (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švicarska)
- transfer pipete (3,5 ml) (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- RT^2 PCR Array kadice (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD)
- kadice za ELISA-u (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)
- parafilm "M" (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, SAD)

3.5 Metode

3.5.1 Postupak prikupljanja uzoraka krvi

U istraživanju smo koristili perifernu punu krv bolesnika s HVBS-om koja je prikupljana i korištena dijelom za molekularnu i serološku dijagnostiku hantavirusa tijekom rutinske dijagnostičke obrade (u Odjelu za znanstvena istraživanja i Odjelu za virusologiju Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu), a dijelom za planirana testiranja u ovom istraživanju. Svakom ispitaniku izvađene su dvije epruvete venske krvi: jedna epruveta s aktivatorom zgrušavanja i jedna epruveta s dodatkom K_3EDTA kao antikoagulansom. Uzorci krvi uzimani su venepunkcijom kod dolaska u bolnicu tj. u ranoj akutnoj fazi HVBS-a. Kod određenog broja bolesnika prikupljeni su uzorci krvi i u drugoj točki tj. u kasnoj akutnoj fazi HVBS-a odnosno prije otpusta iz bolnice. Svi uzorci su uzimani u sklopu rutinskih pretraga i kontrola. Zdravim ispitanicima jednokratno je izvađen jedan set od dvije epruvete venske krvi.
Odmah po primitku krvi, a nakon odvajanja dijela uzorka za rutinsku dijagnostiku, pristupilo se izolaciji mononuklearnih stanica i odvajanju seruma koji su po završetku pohranjeni na -80 °C u Odjelu za znanstvena istraživanja za daljnja testiranja.

3.5.1.1 Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi na gradijentu gustoće

Mononuklearne stanice periferne krvi izolirane su iz epruvete s dodatkom antikoagulansa (K_3EDTA) metodom razdvajanja na gradijentu gustoće. Ukratko, ukupna količina krvi prethodno razrijeđena fosfatnim puferom (PBS, od engl. *phosphate buffered saline*) (u omjeru 1:1) polagano je nadslojavana na otopinu fikola (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Uppsala, Švedska) volumena koji je odgovarao volumenu nerazrijeđene krvi. Nakon centrifugiranja na 900 x g kroz 30 min. razdvojile su se tri faze. Mononuklearne stanice prisutne u tzv. fikolnom prstenu pažljivo su izdvojene Pasteurovom pipetom u novu epruvetu. Stanice su dva puta isprane u PBS-u te je njihov talog pohranjen na -80 °C do daljnje obrade.

3.5.1.2 Postupak odvajanja seruma

Serum je iz epruvete s aktivatorom zgrušavanja nakon zgrušavanja krvi odvojen centrifugiranjem na 3000 x g tijekom 10 min. Alikvotiran je i također pohranjen na -80 °C do daljnje obrade.

3.5.2 Određivanje specifičnih protutijela na PUUV

Akutna infekcija PUUV dijagnosticirana je kod dolaska u bolnicu detekcijom specifičnih IgM protutijela na PUUV u serumu bolesnika. U tu svrhu korišten je brzi imunokromatografski, poin-of-care test Reagena POC® PUUMALA IgM (Reagena International Oy Ltd, Toivala, Finska). Specifičnost i osjetljivost testa varira između 83-100%.

3.5.3 Detekcija genomske RNA PUUV

Molekularna dijagnostika akutne infekcije PUUV zasniva se na detekciji genomske RNA PUUV u punoj krvi ili serumu bolesnika već uspostavljenom metodom "klasičnog" *nested* RT-PCR-a (162, 163). Metoda se sastoji od dva koraka, odnosno dvije reakcije PCR-a, pri čemu se u prvom koraku reverzna transkripcija i prva PCR reakcija odvijaju u istoj reakcijskoj smjesi.

3.5.3.1 Izolacija ukupne RNA iz pune krvi

Ukupna RNA izolirana je iz pune krvi upotrebom otopine na bazi fenola i gvanidin tiocijanata - TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka). Prema preporuci proizvođača korišten je protokol koji je poboljšana verzija metode izolacije RNA u jednom koraku koju su razvili Chomczynski i Sacchi (164). Ukratko, RNA je izolirana iz 250 µl pune krvi dodatkom 750 µl TriPure reagensa u međusobnom volumnom omjeru 1:3. Tijekom ovog koraka dolazi do liziranja svih stanica u uzorku i oslobađanja staničnih komponenti izvan stanica. Nakon dodatka kloroforma i centrifugiranja otopina se razdvojila u tri faze – bezbojnu (vodenu) gornju fazu, bijelu interfazu i crvenu (organsku) donju fazu. Gornja faza prenešena je u novu tubicu iz koje je RNA precipitirana izopropanolom. Etanolom isprani i osušeni talog RNA otopljen je u 20 µl RNaza-DNaza čiste vode te pospremljen na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.5.3.2 Metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u jednom koraku

Za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom u jednom koraku upotrebljen je komercijalni komplet reagencija Access RT-PCR System (Promega, Madison, Wisconsin, SAD). Reakcijska smjesa s konačnim volumenom 50 µl sadržavala je: 1 µM početnice PPT 334C, 1 µM početnice PPT 986R (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD) i 5 µl RNA kalupa. Koncentracije ostalih reagencija u reakciji su bile u skladu s uputama proizvođača.

Reakcija se provela u PCR uređaju Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Reverznu transkripciju (60 min. na 42 °C) slijedila je inaktivacija reverzne transkriptaze i aktivacija polimeraze (2 min. na 94 °C) te rekcija umnožavanja s 40 temperaturnih ciklusa: 30 sek. na 94 °C, 1 min. na 45 °C i 2 min. na 68 °C te završnim korakom 7 min. na 68 °C. Ovim postupkom umnožen je 653 pb dugačak fragment S segmenta PUUV. Nukleotidni slijed početnica je naveden u **Tablici 2**.

3.5.3.3 *Nested* PCR

Da bi se povećala osjetljivost metode detekcije virusne RNA pristupilo se *nested* PCR-u. Produkt prve rekcije PCR služi kao DNA kalup u drugoj reakciji. U *nested* PCR-u korišten je drugi par početnica PPT 376C i PPT 716R (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD) svaka u konačnoj koncentraciji 0,5 µM. Reakcijska smjesa konačnog volumena 50 µl još je sadržavala i 1 µl DNA kalupa, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM mješavine dNTP, 2,5 U Taq polimeraze (Jena Bioscience GmbH, Jena, Njemačka). Nakon aktivacijskog koraka 2 min. na 94 °C reakcija je tekla kroz 36 ciklusa temperaturnog profila: 30 sek. na 94 °C, 1 min. na 49 °C i 2 min. na 72 °C u PCR uređaju Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). PCR produkti vizualizirani su na 1% agaroznom gelu. Prisutnost fragmenta veličine 341 pb smatrala se potvrdom prisutnosti RNA PUUV u testiranom uzorku. Nukleotidni slijed početnica je naveden u **Tablici 2**.

3.5.4 Određivanje razine viremije PUUV

Viremija, odnosno koncentracija RNA PUUV je određivana u serumu bolesnika s HVBS-om u dva koraka - metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR, od engl. *quantitative real-time PCR*) upotrebom TaqMan probe koji je već ranije opisan u literaturi (165), u kombinaciji s klasičnim RT-PCR-om.

3.5.4.1 Izolacija ukupne RNA iz seruma

Ukupna RNA izolirana je iz seruma preko sistema mini kolonica pomoću komercijalnog kita QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD) prema uputama proizvođača. Ukupni volumen seruma s kojim se krenulo u izolaciju bio je 140 µl. Uzorak je prvo liziran puferom za lizu pod visoko denaturirajućim uvjetima uz dodatak RNA nosača (engl. *carrier RNA*) kako bi se inaktivirale RNaze i osigurala izolacija intaktne RNA

PUUV te je potom nanesen u mini kolonicu. Tijekom dva kratka koraka centrifugiranja RNA se vezala za silikonsku membranu. Nakon dva koraka ispiranja koja su uslijedila, RNA vezana za silikonsku membranu eluirana je u 30 µl RNaza čistog pufera. Ovako pripremljena RNA bila je pospremljena na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.5.4.2 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

Izolirana RNA prvo je amplificirana metodom klasičnog RT-PCR-a (opisanog u poglavlju 3.5.3.2), a zatim se u drugom koraku pristupilo kvantitativnom *real-time* PCR-u koji je zapravo u ovom slučaju bio *nested* PCR. Korišten je komercijalni komplet reagencija LightCycler TaqMan Master (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka). Reakcijska smjesa s konačnim volumenom 20 µl je sadržavala: 1 µM početnice PUUV CroFP, 1 µM početnice PUUV CroRP (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Njemačka), 200 nM probe PUU S (Applied Biosystems by Life Technologies) i 5 µl PCR produkta iz predhodnog PCR-a kao kalupa te preporučenu količinu PCR mješavine sa svim ostalim potrebnim komponentama. Reakcija je izvođena u real-time PCR uređaju LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka). Početnu aktivaciju polimeraze (10 min. na 95 °C) slijedila je reakcija umnožavanja s 45 temperaturnih ciklusa: 10 sek. na 95 °C , 15 sek. na 50 °C i 15 sek. na 72 °C. Po završetku reakcije rezultati su obrađeni i analizirani u programu LightCycler Software Version 4.1.1.21 (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka) metodom Fit Points uz samostalno postavljanje praga (engl. *treshold*). Standardna krivulja za određivanje koncentracije PUUV temeljila se na nizu standardnih razrijeđenja u rasponu koncentracija 10^7 do 10^1 RNA kopija po ml. Nukleotidni slijedovi početnica i probe navedeni su u **Tablici 2**.

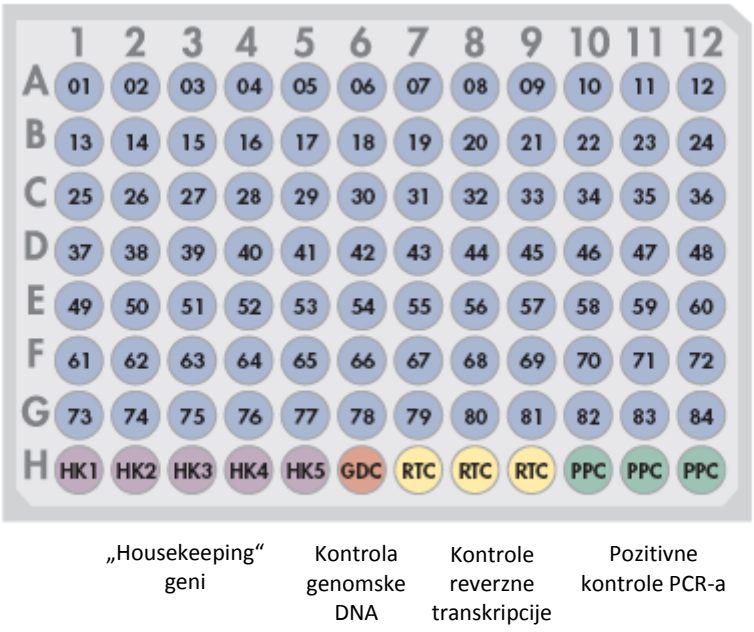
Tablica 2. Izabrane nukleotidne sekvence početnica i probe korištenih za detekciju RNA i određivanje viremije PUUV

Početnica/ Proba	**Nukleotidni slijed (5'-3')**	**Pozicija**	**Segment**	**Ref.**
PPT 334C **PPT 986R**	TATGGIAATGTCCTTGATGT GCACAIGCAAAIACCCA	334-986	S	162
PPT 376C **PPT 716R**	CCIAGTGGICAIACAGC AAICCIATIACICCCAT	376-716	S	163
PUUV CroFP **PUUV CroRP**	TAARGATGATACATCATTTGARGACATC CTGCCTGGAGTAAGYTCTTCTGC		S	nove

PUU S	(FAM)TCCATGCCAACAGCCCAGTCAAC(TAMRA)	580-602	S	165

3.5.5 Analiza ekspresije gena imunološkog odgovora u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Za analiziranje ekspresije gena odgovornih u imunološkom odgovoru korištena je metoda PCR array-a u stvarnom vremenu (od engl. *real-time PCR array*). Ova tehnologija unutar sebe objedinjava prednosti visoko osjetljive i pouzdane tehnologije PCR-a u stvarnom vremenu i mogućnosti „microarray-a“ da se ekspresija može detektirati istovremeno kod više gena. Za analiziranje ekspresije gena koji sudjeluju u imunološkom odgovoru odabran je Human Innate and Adaptive Immune Responses PCR array (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD) u formatu PCR pločice s 96 tubica. *Real-time* PCR *array* sadržava 84 gena imunološkog odgovora te 12 kontrola, redom su to: pet „housekeeping“ gena (normalizacija dobivenih rezultata), jedna kontrola za genomsku DNA (detekcija kontaminacije genomskom DNA), tri kontrole reverzne transkripcije (testiranje učinkovitosti reakcije reverzne transkripcije) i tri pozitivne kontrole PCR-a (testiranje učinkovitosti PCR reakcije) (**Slika 7**). Popis svih gena koji su testirani *real-time* PCR *array*-om nalazi se u **Prilogu 3**.



Slika 7. Shematski prikaz *real-time* PCR *array* pločice

3.5.5.1 Izolacija ukupne RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi

Za analizu genske ekspresije bilo je potrebno dobiti RNA visoke kvalitete. Ukupna RNA izolirana je iz mononuklearmih stanica periferne krvi upotrebom otopine TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka). Na stanični talog dodan je 1 ml TriPure reagensa za lizu stanica, a protokol je dalje slijedio sve korake prethodno opisane kao za postupak izolacije ukupne RNA iz pune krvi. Nakon postupka izolacije, u uzorcima RNA napravljena je digestija DNazom (RQ RNase-free DNase, Promega, Madison, Wisconsin, SAD) (1 U enzima na 1 μg RNA) da se ukloni prisutnost genomske DNA nakon čega je RNA pročišćena preko sistema kolonica koristeći RNeasy Mini Kit (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD) i eluirana u 30 μl RNaza-DNaza čiste vode. Koncentracija i čistoća izolirane RNA za svaki je uzorak određena spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancija (A_{230}, A_{260} i A_{280}) u TE puferu na spektrofotometru BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Čistoća RNA bila je zadovoljavajuća ukoliko je omjer $A_{260/280}$ bio između 1,8-2,1 i omjer $A_{260/230}$ veći od 1,7. Kvaliteta izolirane RNA dodatno je provjerena testom integriteta. Prisutnost dva oštra benda na 1% agaroznom gelu, koji odgovaraju 18S i 28S ribosomalnoj RNA, smatrala se potvrdom da je integritet RNA zadovoljavajuće kvalitete. RNA je bila pospremljena na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.5.5.2 Sinteza prvog lanca cDNA

U sintezi prvog lanca cDNA korišteno je 2 μg ukupne RNA i jednaka količina RNA kalupa korištena je za sve uzorke kroz cijeli eksperiment. Smjesi RNA kalupa i odgovarajuće količine RNaza-DNaza čiste vode dodana su 2 μl nasumičnih početnica (c=500 μg/ml) (od engl. *random primers*) (Promega, Madison, Wisconsin, SAD) te je nakon inkubacije 3 min. na 70 °C i 10 min. na 37 °C došlo do denaturacije kalupa, a potom do sparivanja početnica s kalupom. U reakcijsku smjesu su zatim dodani 5X reakcijski pufer, dNTP mješavina, inhibitor RNaze (Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor) i enzim reverzna transkriptaza (MMLV Reverse Transcriptase) (svi Promega, Madison, Wisconsin, SAD) do konačnog volumena 40 μl. Reakcija reverzne transkripcije odvijala se na 37 °C kroz 60 min., uz inaktivaciju 5 min. na 95 °C u PCR uređaju Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

3.5.5.3 *Real-time* PCR *array*

Za analiziranje ekspresije gena koji sudjeluju u imunološkom odgovoru odabran je Human Innate and Adaptive Immune Responses PCR array (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD). Kao kalup je korištena cDNA pripremljena u prethodnom koraku. Prema preporuci proizvođača smjesa cDNA razrijeđena je s RNaza-DNaza čistom vodom i u odgovarajućem omjeru pomiješana s ostalim komponentama za PCR reakciju (izuzev početnica) objedinjenih u gotovoj PCR mješavini RT^2 SYBR Green ROX qPCR Mastermix (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD), a potom je multikanalnom pipetom po 25 μl prenešeno u svaku tubicu PCR *arraya*. Svaka tubica sadržavala je po jedan set specifičnih početnica ili za željeni gen ili određenu kontrolu. Reakcija je izvedena pod slijedećim uvjetima: 10 min. na 95 °C, zatim 40 ciklusa 15 sek. na 95 °C, 1 min. na 60 °C u real-time PCR uređaju ABI 7500 Standard (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD). Za određivanje disocijacijske krivulje korišten je program određen uređajem (95 °C, 15 sek.; 60 °C, 1 min.; 95 °C, 15 sek.; 60 °C, 1 min.). Analiza i izračun C_t vrijednosti po završetku reakcije (C_t, od engl. *threshold cycle*), kao i analiza disocijacijske krivulje napravljeni su koristeći pripadajući program uređaja 7500 System SDS Software, ver. 1.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD).

3.5.6 Određivanje koncentracije citokina i kemokina u serumu

Za određivanje koncentracije odabranih citokina i kemokina u serumima bolesnika s HVBS-om korišten je enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA, od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Koncentracije interleukina 10 (IL-10, od engl. *interleukin 10*), interferonom gama stimuliranog proteina 10 (IP-10/CXCL10, od engl. *interferon gamma-induced protein 10/C-X-C motif chemokine 10*) i solubilnog CD40 liganda (sCD40L, od engl. *solubile CD40 ligand*) u serumu su redom određene komercijalno dostupnim ELISA testovima Human IL-10 Quantikine ELISA Kit, Human CXCL10/IP-10 Quantikine ELISA Kit, Human CD40 Ligand/TNFSF5 Quantikine ELISA Kit (svi R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK) prema uputama proizvođača.

Svi testovi izvođeni su u mikrotitarskim pločicama na dnu čijih udubina, a u koje nanosimo uzorke i standarde, su vezana specifična protutijela za pojedine analite. Koncentracije citokina i kemokina u uzorcima i standardima određuju se dodatkom konjugiranog specifičnog poliklonskog protutijela na koje je vezan enzim peroksidaze iz hrena. Dodatkom supstrata na

kraju enzimske reakcije nastaje obojeni produkt proporcionalan količini citokina/kemokina vezanog u početnom koraku. Intenzitet nastale boje, odnosno njegova apsorbancija mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 450 nm na spektrofotometru PR 3100 TSC Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, SAD). Točna koncentracija citokina/kemokina izračunata je interpolacijom standardne krivulje koja je kreirana na osnovi izmjerenih apsorbancija serijski razrijeđenih standarada poznate koncentracije. Za određivanje sCD40L uzorke seruma je bilo potrebno 5X prethodno razrijediti, a za određivanje CXCL10 20X razrijediti. Budući da su visoke koncentracije CXCL10 prisutne u slini, tijekom izvođenja testa korištene su mjere zaštite kako bi se spriječila moguća kontaminacija reagencija. U **Tablici 3** navedene su karakteristike korištenih testova.

Tablica 3. Mjerni raspon, osjetljivost testa te preciznost unutar i između testova korištenih za određivanje koncentracije IL-10, CXCL10 i sCD40L

	Mjerni raspon (pg/ml)	**Osjetljivost testa (pg/ml)**	**Preciznost unutar testa CV%**	**Preciznost između testova CV%**
IL-10	0-500	< 3,90	1,7-5,0	5,9-7,5
CXCL10	0-500	< 1,67	3,0-4,6	5,2-8,8
sCD40L	0-4000	< 4,20	4,5-5,4	6,0-6,4

Legenda: sCD40L=solubilni CD40 ligand; **CV**=koeficijent varijacije; **CXCL10**=interferonom gama stimulirani protein 10; **IL-10**=interleukin 10

3.5.7 Određivanje prisutnosti fosforiliranog NFκB (p65) proteina u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Detekcija fosforiliranog NFκB (p65) (p-NFκB p65) proteina u mononuklearnim stanicama periferne krvi rađena je Western blot analizom.

3.5.7.1 Izolacija proteina iz mononuklearnih stanica periferne krvi

Ukupni proteini izolirani su iz mononuklearnih stanica periferne krvi upotrebom otopine TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka). Izolacija je započela paralelno s izolacijom ukupne RNA iz istih uzoraka stanica. Nakon razdvajanja otopine u tri faze izolacija proteina nastavljena je iz interfaze i donje organske faze prema protokolu za izolaciju proteina. Nakon precipitacije DNA 100% etanolom, iz dobivenog supernatanta slijedila je precipitacija proteina izopropanolom. Proteinski talog tri puta je

ispran 0,3 M gvanidin-hidrokloridom u 95% etanolu i završnim ispiranjem u 100% etanolu. Osušeni proteinski talog otopljen je u 50 µl 8 M otopine ureje i pospremljen na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.5.7.2 Western blot analiza za p-NFκB p65

Proteini pripremljeni na prethodno opisan način mogli su direktno biti korišteni u Western blotu. Koncentracija proteina izmjerena je metodom po Bradfordu na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Prethodno denaturirani proteini u puferu za nanošenje na gel (5 min. na 95 °C) razdvojeni su na 10% poliakrilamidnom gelu vertikalnom SDS-PAGE elektroforezom. Po završetku elektroforeze proteini su prenešeni na polyvinylidene difluoride (PVDF) membranu (Amersham Hybond-P, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švedska), blokirani u 5% BSA puferu za blokiranje, te inkubirani s primarnim protutijelom u razrijeđenju 1:1000. Korišteno je zečje poliklonsko protutijelo specifično za NFκB podjedinice p65 fosforilirane na poziciji Ser 536 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, SAD). Nakon ispiranja dodano je sekundarno kozje anti-zečje IgG protutijelo konjugirano enzimom alkalna fosfataza (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, SAD) u razrijeđenju 1:5000. Proteini su na membrani vizualizirani dodatkom kemiluminiscentnog supstrata za alkalnu fosfatazu (ECF Substrate, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švedska) i snimanjem u transiluminatoru Kodak Digital Science Image Station 440CF (Kodak, Rochester, New York, SAD). Kao kontrola nanošenja korišten je β-aktin koji je detektiran poliklonskim zečjim protutijelom specifičnim za β-aktin u razrijeđenju 1:1000 (abcam, Cambridge, UK).

3.5.8 Analiza ekspresije gena miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi i u serumu

Za analiziranje genske ekspresije miRNA korištena je također tehnologija *real-time* PCR *array*-a koja omogućava osjetljivu i specifičnu detekciju i kvantifikaciju miRNA. Za analiziranje ekspresije gena miRNA po narudžbi je dizajniran miRNA PCR array (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD) u formatu PCR pločice s 96 tubica. *Real-time* PCR *array* sadržava 11 gena miRNA (let-7i, miR-9, miR-19a, miR-21, miR-125b, miR-126, miR-132, miR-146a, miR-147a, miR-155, miR-223) te pet kontrola, redom su to: jedna vanjska kontrola miR-39 iz *C. elegans* (normalizacija rezultata iz seruma), dva „housekeeping“ gena

SNORD61 i SNORD68 (normalizacija rezultata iz stanica), jedna kontrola reverzne transkripcije (testiranje učinkovitosti reakcije reverzne transkripcije) i jedna pozitivna kontrola PCR-a (testiranje učinkovitosti PCR reakcije).

3.5.8.1 Izolacija ukupne RNA (miRNA) iz seruma

Za izolaciju miRNA iz seruma odabran je komercijalni miRNeasy Serum/Plasma kit (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD) koji je optimiziran za izolaciju ukupne RNA izvan stanica – prvenstveno miRNA i drugih malih RNA molekula iz tjelesnih tekućina koje ne sadrže stanice. U izolaciju se krenulo s maksimalno dozvoljenim volumenom seruma od 200 μl i slijedilo se upute proizvođača. Da bi se mogla napraviti normalizacija rezultata uzoraka iz seruma korištena je sintetička kontrola koja imitira miR-39 miRNA iz *C. elegans* (miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control, QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD) koja je neposredno prije same izolacije dodana u uzorak seruma. RNA je eluirana u 14 μl RNaza-DNaza čiste vode.

3.5.8.2 Sinteza prvog lanca cDNA

Kao početni materijal za sintezu cDNA koristila se ukupna RNA koja je sadržavala unutar sebe i miRNA. Postupak se izvodio na jednak način za RNA izoliranu i iz uzoraka mononuklearnih stanica periferne krvi i iz seruma pomoću komercijalno dostupnog miScript II RT kita (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD) prema uputama proizvođača. Upotrebom specifičnog 5X miScript HiSpec pufera omogućeno je selektivno prevođenje samo zrelih miRNA molekula u cDNA. Iz uzoraka seruma dodano je 1,5 μl RNA kalupa odnosno 250 ng RNA iz uzoraka stanica u reakciju reverzne transkripcije koja se odvijala tijekom 60 min. na 37 °C i 5 min. na 95 °C u PCR uređaju Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

3.5.8.3 *Real-time* PCR *array* za zrele miRNA molekule

Za analiziranje ekspresije gena miRNA po narudžbi je dizajniran miRNA PCR array (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD). Kao kalup je korištena cDNA pripremljena u prethodnom koraku. Prema preporuci proizvođača smjesa cDNA razrijeđena je s RNaza-DNaza čistom vodom i u odgovarajućem omjeru pomiješana s ostalim komponentama za PCR reakciju (izuzev uzvodne početnice) objedinjenih u gotovoj PCR

mješavini miScript SYBR Green PCR kit (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, SAD), a potom je po 25 µl prenešeno u svaku tubicu PCR arraya. Svaka tubica sadržavala je po jednu specifičnu uzvodnu početnicu za određenu zrelu miRNA molekulu ili za određenu kontrolu. Reakcija je izvedena pod slijedećim uvjetima: inicijalni aktivacijski korak 15 min. na 95 °C, zatim 40 ciklusa 15 sek. na 94 °C, 30 sek. na 55 °C, 30 sek. na 70°C u real-time PCR uređaju ABI 7500 Standard (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD). Za određivanje disocijacijske krivulje korišten je program određen uređajem (95 °C, 15 sek.; 60 °C, 1 min.; 95 °C, 15 sek.; 60 °C, 1 min.). Analiza i izračun C_t vrijednosti po završetku reakcije, kao i analiza disocijacijske krivulje napravljeni su korištenjem pripadajućeg programa uređaja 7500 System SDS Software, ver. 1.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD).

3.5.9 Prikupljanje podataka o kliničkim i laboratorijskim parametrima

Podaci o kliničkim i laboratorijskim parametrima retrospektivno su prikupljani iz medicinske dokumentacije bolesnika pridržavajući se standardnih mjera za zaštitu osobnih podataka ispitanika. Svi podaci pohranjeni su u bazu podataka koristeći program Microsoft Office Excel 2007.

3.5.10 Statistička analiza podataka

Statistička obrada podataka rađena je u statističkom programu STATISTICA, ver. 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, SAD). Od statističkih metoda korištena je deskriptivna statistika za osnovni opis kliničkih i laboratorijski parametara. Za testiranje razlika između dvaju nezavisnih uzoraka, tj. među skupinama (npr. HVBS bolesnici-kontrolna skupina) primijenjeni su testovi neparametrijske statistike kao Mann-Whitney U-test, a Kruskal-Wallis ANOVA & Median test korišten je za utvrđivanje razlika između više od dviju skupina numeričkih varijabli. Za komparativnu analizu nominalnih varijabli korišten je Fisher exact p test, $\chi 2$. Korelacije između pojedinačnih varijabli procjenjivane su testom Spearmanove korelacije ranga.

Rezultati dobiveni u analizi geneske ekspresije tehnologijom real time PCR arraya sistema analizirani su pomoću mrežno integriranih software-skih paketa RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 (http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php) i miScript miRNA PCR Array Data Analysis

(http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php) osiguranog od strane proizvođača (QIAGEN-SABiosciences, Frederick, Maryland, SAD). Relativne razine ekspresije (razlike ili promjene ekspresije) računate su $\Delta\Delta C_t$ metodom relativne kvantifikacije. Studentovim t-testom uspoređivane su razlike između grupa bioloških replikata ili su uspoređivane sve grupe usporedo.

U svim statističkim analizama razina od $p<0,05$ smatrana je staistički značajnom.

3.5.11 Bioinformatička analiza podataka

Za funkcionalnu analizu podataka dobivenih tehnologijom *real time* PCR *array* sistema korištena je IPA analiza (IPA, od engl. *Ingenuity Pathways Analysis*) (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, California, SAD). Da bi se vidjelo koji regulatorni odnosi postoje između testiranih gena imunološkog odgovora i miRNA određivane su mreže interakcija. Također je analizirano koje bi biološke funkcije i stanični signalni putevi bili najrelevantniji u našem eksperimentalnom modelu.

Neparametrijska regresijska metoda modeliranja MARS (od engl. *Multivariate Adaptive Regression Splines*) (Salford Systems Inc., San Diego, California, SAD) korištena je za kreiranje optimalnog modela za predikciju ishoda bolesti na temelju pojedinačnih varijabli. Unutar metode korištene su tehnike unakrsne validacije (10-struki CV) da bi se testirala preciznost modela. U modeliranje su uključene slijedeće varijable: normalizirani podaci relativne ekspresije testiranih gena i miRNA (samo onih koji su bili statistički značajno promjenjeni ($p<0,05$)), rezultati ELISA testa i odabrani klinički podaci. Imunološki parametri mjereni na genskoj i proteinskoj razini modelirani su neovisno od miRNA iz razloga što su isti testirani na dva različita seta ispitanika te nije bilo preklapanja u podacima.

4. REZULTATI

4.1 Kliničke karakteristike bolesnika s HVBS-om

Osnovne kliničke i laboratorijske značajke bolesnika s HVBS-om inficiranih virusom PUU koji su uključeni u studiju prikazani su u **Tablici 4**. Svi bolesnici u akutnoj fazi bolesti imali su vrućicu praćenu zimicama, uz pojavu tresavica u više od 80% bolesnika. Kod 20% njih temperatura je prelazila 40 °C. Više od 85% bolesnika imalo je prisutan i opći algički sindrom s glavoboljom, mijalgijama i bolovima u leđima. U polovice bolesnika zabilježene su manifestacije mutnog vida i/ili injekcije konjuktiva, a trećina je javljala retroorbitalnu bol u očnim jabučicama. Smetnje probavnog sustava zabilježene su u 40% bolesnika u vidu bolova u trbuhu, gubitka apetita (67%), mučnine (46%), povraćanja (36%) i dijareje (39%). Iako su blaži znakovi krvarenja bili rijetko prisutni kod naših bolesnika, najčešće su bili prisutni na sluznicama (21%) u obliku enantema i subkonjunktivalnog krvarenja, a u manjem postotku na koži (8%) kao petehijalan osip. Epistaksa je bila prisutna u samo 8% bolesnika. Kod više od 50% bolesnika bila je prisutna trombocitopenija, a dva su bolesnika primila transfuziju trombocita. Do razvoja oligurije ili anurije došlo je u 14% bolesnika, a u dva bolesnika je bilo potrebno liječenje dijalizom. Medijan najviših izmjerenih vrijednosti serumskog kreatinina bio je 337 µmol/L (raspon 99-1238 µmol/L) te ureje 14,6 mmol/L (raspon 4,6-60,7 mmol/L). Ultrazvučnim pregledom bubrega zamijećeni su voluminozno uvećani bubrezi kod 41% bolesnika. Hipotenzija je bila prisutna u 18% bolesnika, ali ni kod jednog nije progredirala u šok. U skupini bolesnika nije bilo smrtnih ishoda.

Populacija naših ispitanika koja je uključena u studiju (ukupno 39 HVBS bolesnika inficiranih PUUV) prema kliničkim karakteristikama i njihovoj pojavnosti usporediva je s podacima koje navode naše prijašnje studije i studije na bolesnicima s HVBS-om uzrokovanim PUUV iz drugih europskih država i država iz regije (4, 70, 71, 166-170).

Tablica 4. Značajke bolesti kod bolesnika s HVBS-om uzrokovanim infekcijom PUUV

Karakteristika	**HVBS-PUUV (N=39)**	
	N (%)	
Vrućica	39/39	(100%)
Hiperpireksija	8/39	(21%)
Zimica	38/39	(97%)
Tresavica	32/39	(82%)
Mijalgije	33/39	(85%)
Bolnost u leđima	34/39	(87%)
Glavobolja	36/39	(92%)
Retroorbitalna bolnost	12/39	(31%)
Zamućen vid	21/39	(54%)
Edem lica	16/39	(41%)
Konjuktivalna injekcija	19/39	(49%)
Bolnost u trbuhu	15/39	(39%)
Gubitak teka	26/39	(67%)
Mučnina	18/39	(46%)
Povraćanje	14/39	(36%)
Dijareja	15/39	(39%)
Hepatomegalija	23/39	(59%)
Splenomegalija	5/39	(13%)
Uvećani bubrezi	7/17	(41%)
Kašalj	13/39	(33%)
Crvenilo lica i vrata	6/39	(15%)
Petehije	3/39	(8%)
Enantem	8/39	(21%)
Hemoragije	3/39	(8%)
Šok	0	-
Hipotenzija	7/39	(18%)
Tahikardija	7/39	(18%)
Oligurija (<400 ml/dan)	5/37	(14%)
Potreba za dijalizom	2/39	(5%)
Patološki radiogram pluća	5/36	(14%)
Patološki EKG	12/39	(31%)
Trombocitopenija (<50 x10^9/L)	20/39	(51%)
Povišene transaminaze	23/39	(59%)
Proteinurija	35/39	(90%)
Ureja$_{MAKS}$ (mmol/L)*	14,6	(4,6-60,7)
Kreatinin$_{MAKS}$ (µmol/L)*	337	(99-1238)

Legenda: **HVBS**=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom; **PUUV**=virus Puumala; **EKG**=elektrokardiogram; * Rezultati su prikazani kao medijan najviših izmjerenih vrijednosti (raspon)

4.2 Analiza ranog perifernog imunološkog odgovora u bolesnika s HVBS-om tijekom infekcije PUUV

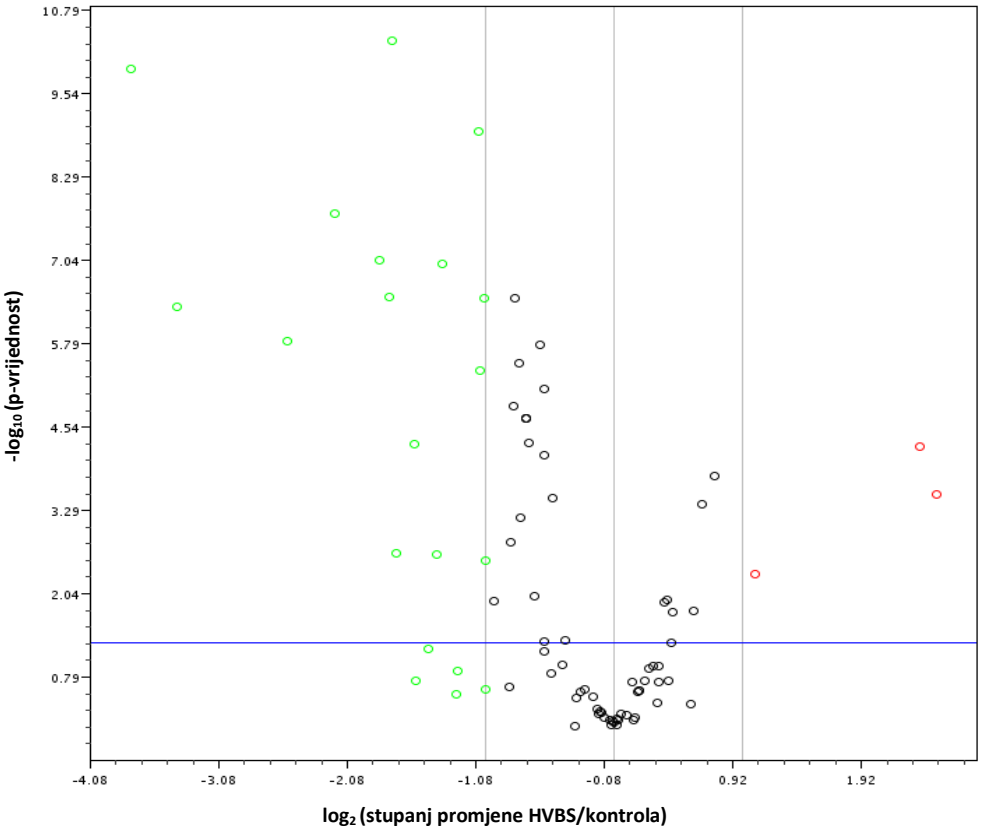
4.2.1 Analiza ekspresije gena koji sudjeluju u urođenom i stečenom imunološkom odgovoru

Da bi karakterizirala rani imunološki odgovor u bolesnika s HVBS-om uzrokovanim PUUV u mononuklearnim stanicama periferne krvi analizirala sam ekspresiju 84 različita gena povezana s urođenim i stečenim imunološkim odgovorom (**Prilog 3**). Analiza je provedena na 14 bolesnika s HVBS-om i 10 zdravih kontrola. Dalje su uspoređivani i analizirani samo geni koji su pokazali promjenu ekspresije veću ili manju od 2 puta u odnosu na kontrolu. Promjene u ekspresiji tijekom infekcije PUUV pronašla sam u ukupno 22 gena od koji su tri gena imala značajno povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolnu skupinu – IL10, CXCL10 i MX1. Kod čak 19 gena ekspresija je bila više od dva puta snižena uslijed PUUV infekcije (**Tablica 5** i **Slika 8**). Najizraženije promjene u ekspresiji u vidu njezinog sniženja pokazali su geni za IL2 i CD40L, a stupanj promjene redom je iznosio -10,58 i -13,60. Vidljivo je bio veći broj gena koji su doživjeli utišavanje svoje ekspresije u odnosu na one kod kojih je ekspresija bila dodatno potaknuta u ranoj fazi infekcije, što upućuje na to da u bolesnika s HVBS-om postoji tendencija supresije ranog imunološkog odgovora.

Tablica 5. Promjene ekspresije gena u mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s HVBS-om tijekom ranog imunološkog odgovora na infekciju PUUV

Gen	**Stupanj promjene**	***p*** [1]
Geni s povišenom ekspresijom	**HVBS (N=14)**	
IL10	**5,69**	<0.001
CXCL10	**5,19**	<0.001
MX1	**2,14**	0.005
Geni sa sniženom ekspresijom	**HVBS (N=14)**	
GATA3	**-2,01**	0,003
IL4	**-2,01**	0,252
NOD1	**-2,01**	<0,001
TBX21	**-2,07**	<0,001
MAPK8	**-2,08**	<0,001
C3	**-2,33**	0,130
CCR8	**-2,34**	0,296
TLR9	**-2,54**	<0,001
TLR1	**-2,73**	0,062
CCL2	**-2,93**	0,186
CCR4	**-2,95**	<0,001
HLA-A	**-3,24**	0,002
STAT4	**-3,33**	<0,001
RAG1	**-3,36**	<0,001
TLR3	**-3,56**	<0,001
CCR6	**-4,53**	<0,001
RORC	**-5,83**	<0,001
IL2	**-10,58**	<0,001
CD40L	**-13,60**	<0,001

Legenda: HVBS=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom
Legenda naziva gena od engl.: C3=Complement component 3; **CCL2**=Chemokine (C-C motif) ligand 2; **CCR4**=Chemokine (C-C motif) receptor 4; **CCR6**=Chemokine (C-C motif) receptor 6; **CCR8**=Chemokine (C-C motif) receptor 8; **CD40L**=CD40 ligand; **CXCL10**=Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; **GATA3**=GATA binding protein 3; **HLA-A**=Major histocompatibility complex, class I, A; **IL2**=Interleukin 2; **IL4**=Interleukin 4; **IL10**=Interleukin 10; **MAPK8**=Mitogen-activated protein kinase 8; **MX1**=Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse); **NOD1**=Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1; **RAG1**=Recombination activating gene 1; **RORC**=RAR-related orphan receptor C; **STAT4**=Signal transducer and activator of transcription 4; **TBX21**=T-box 21; **TLR1**=Toll-like receptor 1; **TLR3**=Toll-like receptor 3; **TLR9**=Toll-like receptor 9
[1]Statistički značajno pri p≤ 0,05



Slika 8. Volcano plot za 84 testirana gena u bolesnika s HVBS-om uzrokovanim PUUV. Na osi-x prikazan je stupanj promjene relativne genske ekspresije, a na osi-y $-\log_{10}$ p. U gornjem lijevom i desnom kvadrantu pri graničnim vrijednostima praga: p=0,05 (horizontalna plava linija) i dvostruko sniženje/povišenje relativne genske ekspresije (vertikalne sive linije) selektirano je 17 statistički značajno promijenjenih gena. Zeleni kružići označavaju gene sa sniženom ekspresijom, a crveni kružići gene s povišenom ekspresijom.

4.2.2 Usporedba ekspresije gena koji sudjeluju u urođenom i stečenom imunološkom odgovoru prema težini kliničke slike bolesnika s HVBS-om

Bolesnike s HVBS-om sam na osnovu kriterija opisanih u **Prilogu 2** (**A** i **B**) dodatno podijelila u dvije skupine s različitim kliničkim tijekom bolesti. Od ukupno 14 bolesnika devet ih je imalo blagi tijek bolesti, a pet srednje teški do teški tijek bolesti. Kada su bolesnici bili podjeljeni u dvije grupe, promjene na razini genske ekspresije bile su još izraženije u smjeru supresije gena i pokazale su se jasno vidljive razlike između dviju grupa bolesnika s HVBS-om.

U grupi bolesnika s težom kliničkom slikom bio je veći broj gena čija je genska ekspresija bila promijenjena (26/84) u odnosu na bolesnike s blažom bolesti (16/84), koja je prije svega bila snižena u obje grupe: 23/26 gena imala su sniženu ekspresiju u grupi težih bolesnika, a 12/16 u grupi blažih bolesnika. Geni koji su bili promijenjeni pokazivali su u svim slučajevima isti smjer regulacije ekspresije u obje grupe, odnosno, nije bilo situacije da bi u jednoj grupi ekspresija pojedinog gena bila povišena, a istovremeno u drugoj grupi snižena. Štoviše, kod svih gena koji su imali sniženu ekspresiju u obje grupe (TLR1, TLR3, TLR9, CCR4, CCR6, HLA-A, RORC, IL2, CD40L, RAG1, STAT4), dominantno je bio prisutan jači stupanj supresije u grupi bolesnika s težim kliničkim tijekom bolesti (**Tablica 6)**.

Kod nekih gena do značajne promjene u ekspresiji je došlo samo u grupi težih bolesnika (GATA3, NOD1, TBX21, MAPK8, IL4, C3, CCL2, CCR8) te je vidljivo da je njihova supresija bila još izraženija kad su bili razdvojeni od grupe s blagim HVBS-om (**Tablica 5** i **Tablica 6**). Ovi geni su u grupi blažih bolesnika također pokazivali tendenciju snižavanja ekspresije, ali ona nije prelazila donju arbitražnu granicu od ±2 koju smo odredili kao „cut-off" vrijednost za promjenu u genskoj ekspresiji.

Osim toga promjene su identificirane i u nekoliko novih gena (MPO, CCL5, CD80, FOXP3, IL1A, IL23A) koji nisu bili promijenjeni u analizi svih bolesnika zajedno.

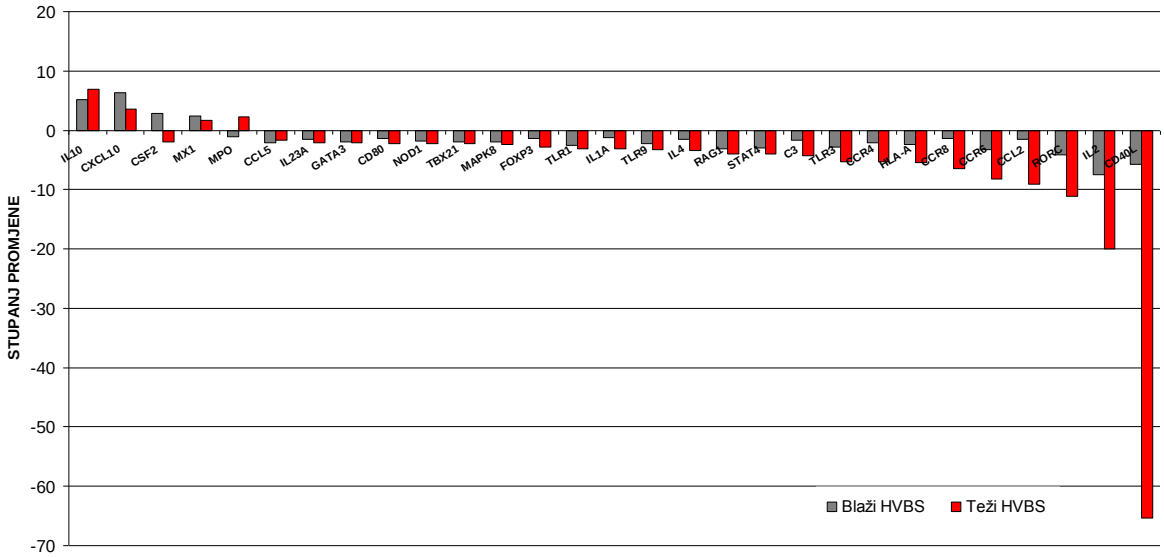
Općenito, rezultati ukazuju da su promjene na nivou genske ekspresije bile jače izražene u grupi bolesnika s težim tijekom bolesti (**Slika 9**).

Tablica 6. Promjene ekspresije gena u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom ranog imunološkog odgovora na infekciju PUUV između bolesnika s blagim i srednje teškim/teškim tijekom bolesti

Gen	**Stupanj promjene**	***p*[1]**	**Stupanj promjene**	***p*[1]**
Geni s povišenom ekspresijom	**Blaži HVBS (N=9)**		**Teži HVBS (N=5)**	
IL10	**5,11**	<0,001	**6,91**	0,001
CXCL10	**6,38**	<0,001	**3,58**	0,001
CSF2	**2,78**	0,297	-1,99	0,044
MX1	**2,42**	0,003	1,71	0,014
MPO	-1,09	0,944	**2,25**	0,149
Geni sa sniženom ekspresijom	**Blaži HVBS (N=9)**		**Teži HVBS (N=5)**	
CCL5	**-2,11**	0,014	-1,61	0,172
IL23A	-1,55	<0,001	**-2,10**	<0,001
GATA3	-1,93	0,018	**-2,17**	0,019
CD80	-1,40	0,016	**-2,27**	<0,001
NOD1	-1,88	<0,001	**-2,28**	<0,001
TBX21	-1,95	<0,001	**-2,31**	<0,001
MAPK8	-1,94	<0,001	**-2,36**	<0,001
FOXP3	-1,35	0,020	**-2,82**	<0,001
TLR1	**-2,56**	0,088	**-3,07**	0,086
IL1A	-1,28	0,667	**-3,12**	0,092
TLR9	**-2,19**	<0,001	**-3,32**	<0,001
IL4	-1,49	0,460	**-3,43**	0,211
RAG1	**-3,06**	<0,001	**-3,98**	<0,001
STAT4	**-3,00**	<0,001	**-4,02**	<0,001
C3	-1,65	0,367	**-4,35**	0,100
TLR3	**-2,88**	<0,001	**-5,23**	<0,001
CCR4	**-2,13**	0,002	**-5,34**	<0,001
HLA-A	**-2,42**	0,004	**-5,49**	0,033
CCR8	-1,33	0,874	**-6,45**	0,002
CCR6	**-3,25**	<0,001	**-8,25**	<0,001
CCL2	-1,56	0,777	**-9,10**	0,001
RORC	**-4,07**	<0,001	**-11,14**	<0,001
IL2	**-7,42**	<0,001	**-20,05**	<0,001
CD40L	**-5,68**	<0,001	**-65,37**	<0,001

Legenda: HVBS=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom
Legenda naziva gena od engl.: C3=Complement component 3; **CCL2**=Chemokine (C-C motif) ligand 2; **CCL5**=Chemokine (C-C motif) ligand 5; **CCR4**=Chemokine (C-C motif) receptor 4; **CCR6**=Chemokine (C-C motif) receptor 6; **CCR8**=Chemokine (C-C motif) receptor 8; **CD40L**=CD40 ligand; **CD80**=CD80 molecule;

CSF2=Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage); **CXCL10**=Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; **FOXP3**=Forkhead box P3; **GATA3**=GATA binding protein 3; **HLA-A**=Major histocompatibility complex, class I, A; **IL1A**=Interleukin 1, alpha; **IL2**=Interleukin 2; **IL4**=Interleukin 4; **IL10**=Interleukin 10; **IL23A**=Interleukin 23, alpha subunit p19; **MAPK8**=Mitogen-activated protein kinase 8; **MPO**=Myeloperoxidase; **MX1**=Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse); **NOD1**=Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1; **RAG1**=Recombination activating gene 1; **RORC**=RAR-related orphan receptor C; **STAT4**=Signal transducer and activator of transcription 4; **TBX21**=T-box 21; **TLR1**=Toll-like receptor 1; **TLR3**=Toll-like receptor 3; **TLR9**=Toll-like receptor 9
[1]Statistički značajno pri p≤ 0,05

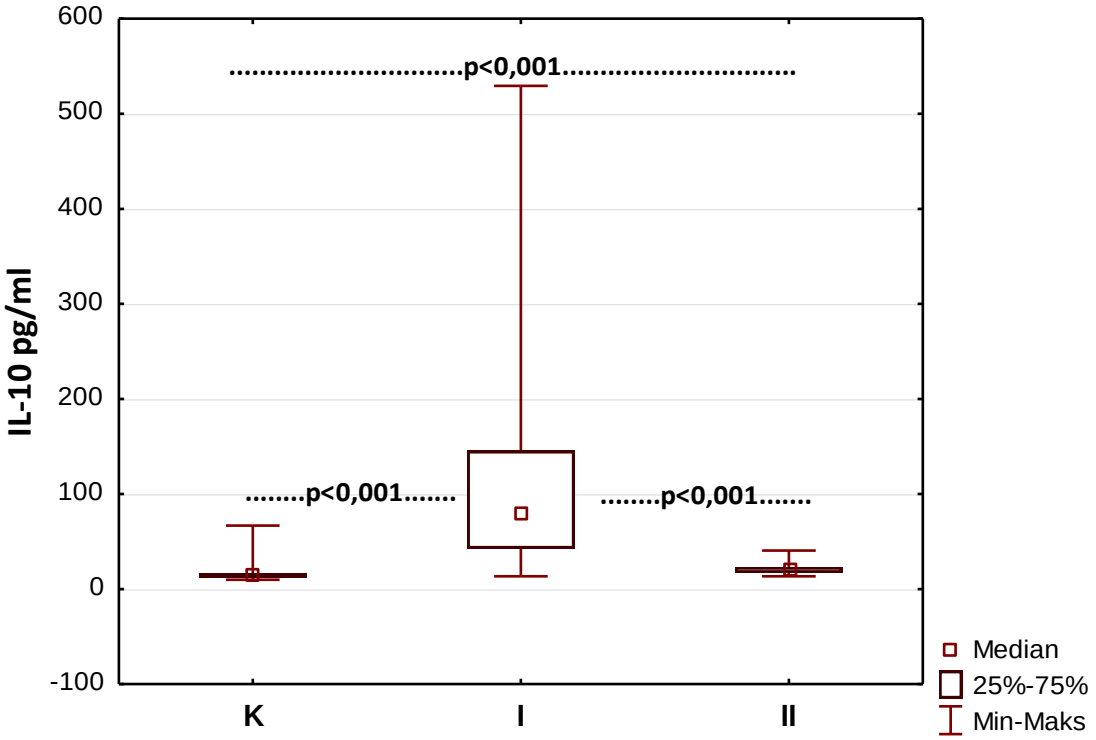


Slika 9. Diferencijalno eksprimirini geni u mononuklearnim stanicama periferne krvi u grupi bolesnika s blagim i srednje teškim/teškim tijekom HVBS-a

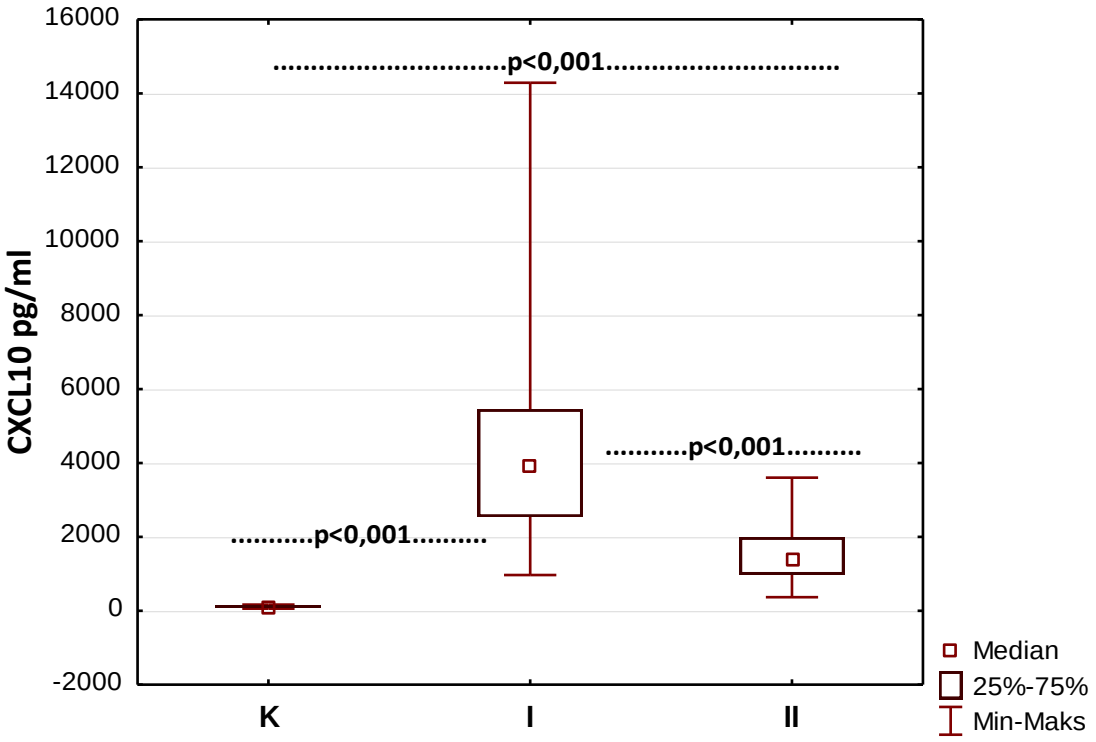
4.2.3 Određivanje koncentracije IL-10, CXCL10 i sCD40L u serumu

Na razini proteina sam mjerila tri imunološka parametra za koje sam profiliranjem ekspresije gena zaključila da bi mogli imati važnu ulogu u imunopatogenezi HVBS-a. IL-10 i CXCL10 imali su značajno povišenu ekspresiju gena u ranoj fazi infekcije PUUV dok je CD40L pokazivao najveći stupanj utišavanja genske ekspresije te sam željela vidjeti razinu ovih proteina u serumu bolesnika.

Kao što se očekivalo na osnovi predhodnih rezultata i iz literature, pokazala sam značajno više koncentracije IL-10 i CXCL10 u bolesnika s HVBS-om uzrokovanim PUUV nego u zdravih kontrola. Koncentracije IL-10 i CXCL10 su značajno povišene u ranoj akutnoj fazi bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu, nakon toga padaju, ali su još uvijek statistički značajno više od razina IL-10 i CXCL10 u zdravih ispitanika (**Slika 10** i **Slika 11**).

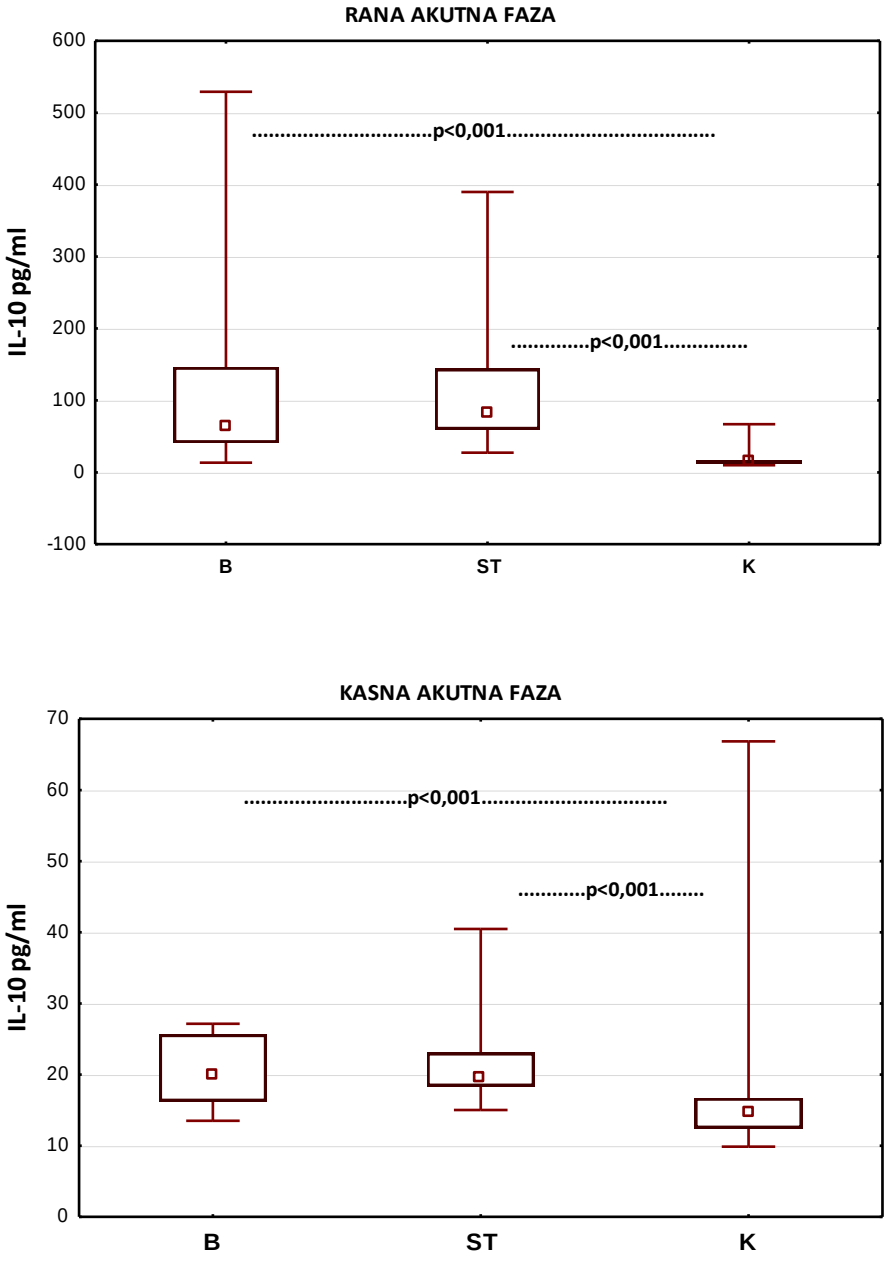


Slika 10. Razina IL-10 u serumu bolesnika s HVBS-om u ranoj (I) (medijan 6 dana od pojave simptoma) i u kasnoj (II) (medijan 15 dana od pojave simptoma) akutnoj fazi HVBS-a u odnosu na zdrave kontrole (K). Razlika je statistički značajna između testiranih skupina (Kruskal-Wallis ANOVA & Median test, $p<0,001$), kao i između svih pojedinačnih skupina (Mann-Whitney U test, $p<0,001$).

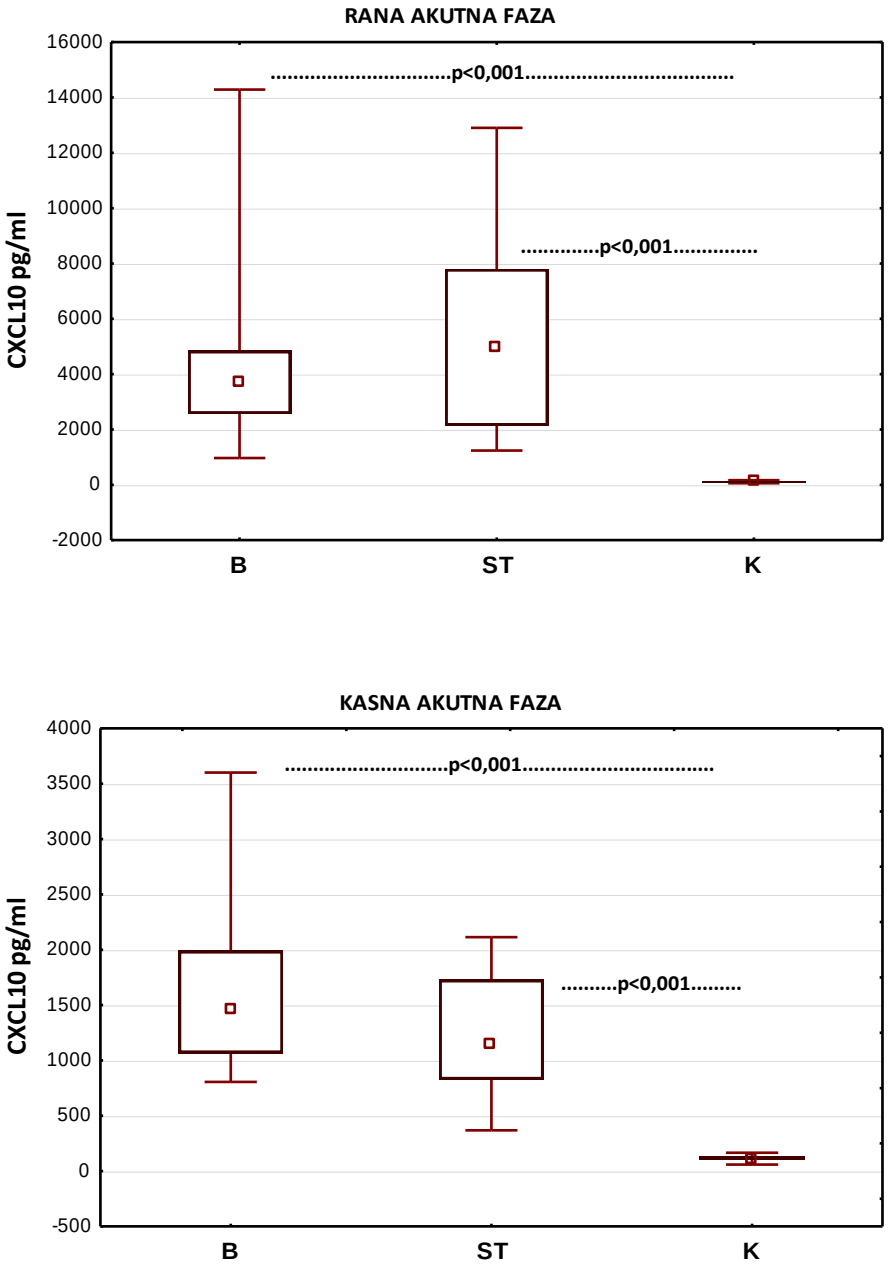


Slika 11. Razina CXCL10 u serumu bolesnika s HVBS-om u ranoj (I) (medijan 6 dana od pojave simptoma) i u kasnoj (II) (medijan 15 dana od pojave simptoma) akutnoj fazi HVBS-a u odnosu na zdrave kontrole (K). Razlika je statistički značajna između testiranih skupina (Kruskal-Wallis ANOVA & Median test, $p<0,001$), kao i između svih pojedinačnih skupina (Mann-Whitney U test, $p<0,001$).

Razine IL-10 i CXCL10 su također značajno više u bolesnika s blagim ili srednje teškim/teškim oblikom HVBS-a u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ne postoji statistički značajna razlika između te dvije skupine bolesnika mjereno i tijekom rane i tijekom kasne akutne faze HVBS-a (**Slika 12** i **Slika 13**). Ipak, u ranoj akutnoj fazi HVBS-a možemo vidjeti trend porasta razine IL-10 i CXCL10 u grupi težih bolesnika u odnosu na skupinu blažih bolesnika (medijani IL-10: 84,58 pg/ml; 62,61 pg/ml i medijani CXCL10: 4993,68 pg/ml; 3712,37 pg/ml).

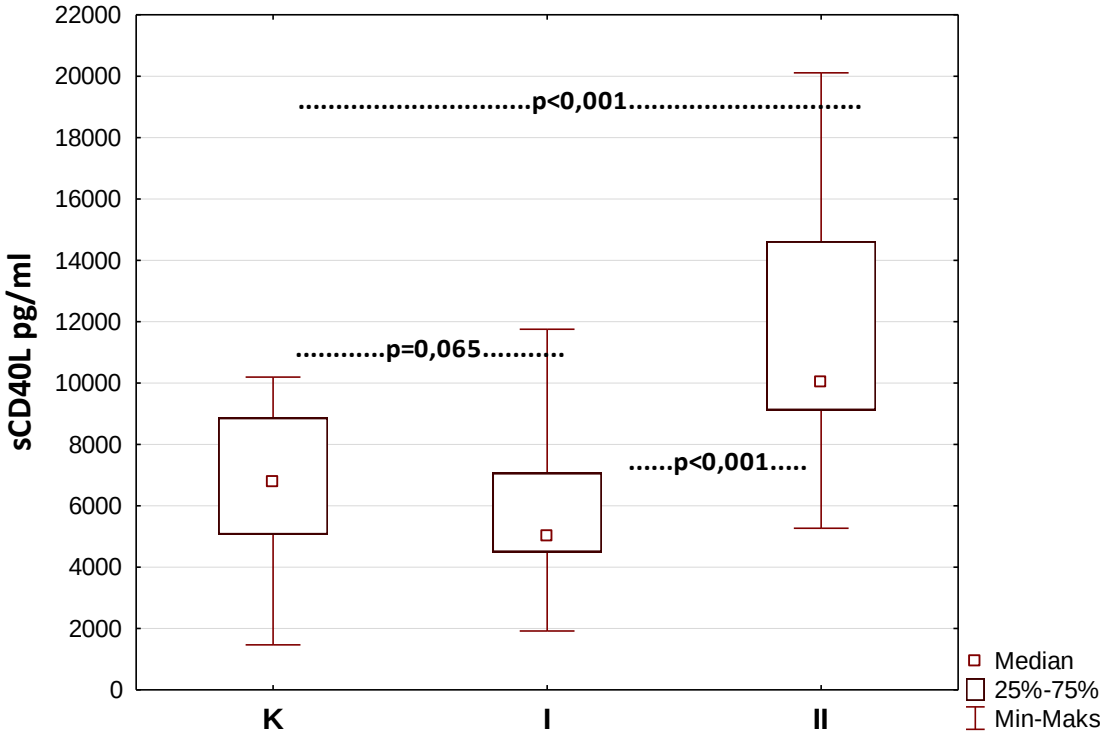


Slika 12. Razina IL-10 u serumu bolesnika s blagom (B) i srednje teškom/teškom (ST) kliničkom slikom HVBS-a u odnosu na zdrave kontrole (K) u ranoj i u kasnoj akutnoj fazi HVBS-a. Razlika je statistički značajna između testiranih skupina (Kruskal-Wallis ANOVA & Median test, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između bolesnika s blagom kliničkom slikom i zdravih ispitanika (Mann-Whitney U test, $p<0,001$) i između bolesnika sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom i zdravih ispitanika (Mann-Whitney U test, $p<0,001$) i u ranoj i u kasnoj akutnoj fazi HVBS-a.



Slika 13. Razina CXCL10 u serumu bolesnika s blagom (B) i srednje teškom/teškom (ST) kliničkom slikom HVBS-a u odnosu na zdrave kontrole (K) u ranoj i u kasnoj akutnoj fazi HVBS-a. Razlika je statistički značajna između testiranih skupina (Kruskal-Wallis ANOVA & Median test, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između bolesnika s blagom kliničkom slikom i zdravih ispitanika (Mann-Whitney U test, $p<0,001$) i između bolesnika sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom i zdravih ispitanika (Mann-Whitney U test, $p<0,001$) i u ranoj i u kasnoj akutnoj fazi HVBS-a.

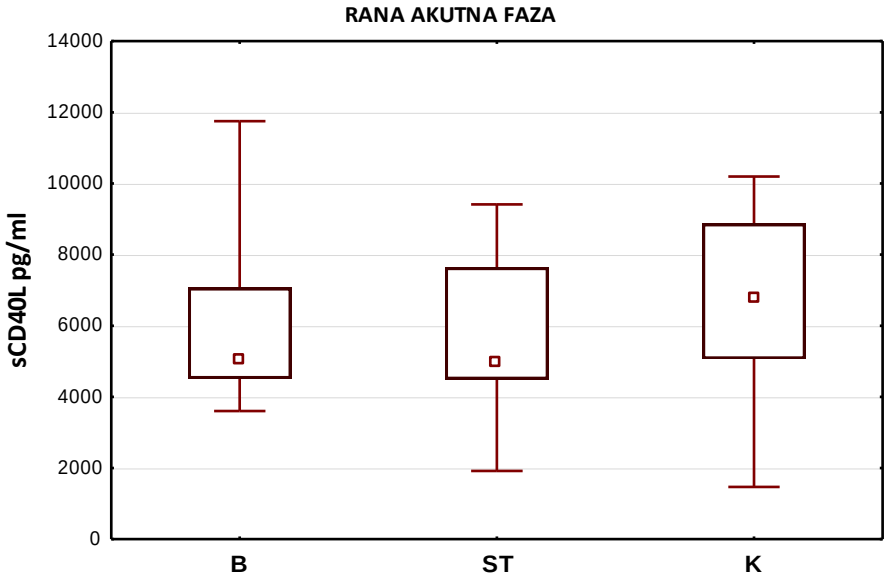
Koncentracije sCD40L su, međutim, niže u ranoj akutnoj fazi bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu, iako razlika nije statistički značajna. Tek u kasnoj akutnoj fazi bolesti razina sCD40L u serumu bolesnika s HVBS-om značajno raste u odnosu na zdrave kontrole (**Slika 14**).



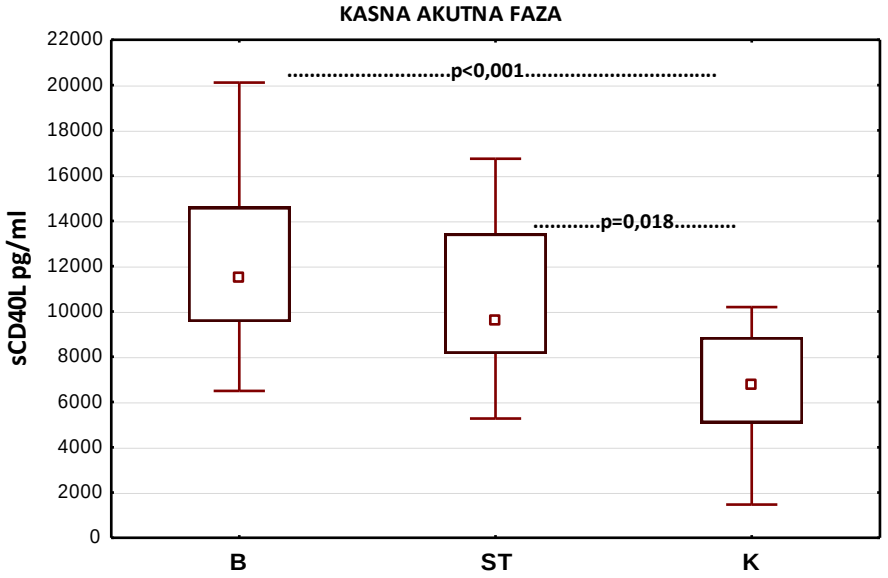
Slika 14. Razina sCD40L u serumu bolesnika s HVBS-om u ranoj (I) (medijan 6 dana od pojave simptoma) i u kasnoj (II) (medijan 15 dana od pojave simptoma) akutnoj fazi HVBS-a u odnosu na zdrave kontrole (K). Razlika je statistički značajna između testiranih skupina (Kruskal-Wallis ANOVA & Median test, $p<0,001$). Razina sCD40L u prvom serumu je niža, ali ne statistički značajna u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney U test, $p=0,065$), ali je zato značajno niža u odnosu na razinu u kasnoj akutnoj fazi HVBS-a (Mann-Whitney U test, $p<0,001$). Razina sCD40L je značajno viša u kasnoj akutnoj fazi u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney U test, $p<0,001$).

U ranoj akutnoj fazi bolesti ne postoje značajne razlike između razina sCD40L u bolesnika s blagom i srednje teškom/teškom kliničkom slikom međusobno ili u odnosu prema zdravoj kontroli (**Slika 15**). U kasnoj akutnoj fazi HVBS-a serumske razine sCD40L su značajno porasle u obje grupe u odnosu na zdrave kontrole. Porast je bio nešto sporiji u grupi bolesnika s težim u usporedbi s bolesnicima s blažim tijekom bolesti. Iako razlika nije bila statistički značajna može se vidjeti tendencija porasta razine sCD40L u serumu bolesnika s blažim

oblikom bolesti, u odnosu na skupinu s težim oblikom bolesti (medijani: 11456,67 pg/ml i 9598,33 pg/ml) (**Slika 16**).



Slika 15. Razina sCD40L u serumu bolesnika s blagom (B) i srednje teškom/teškom (ST) kliničkom slikom HVBS-a u odnosu na zdrave kontrole (K) u ranoj akutnoj fazi HVBS-a. Razlika nije statistički značajna između tri testirane skupine (Kruskal-Wallis ANOVA & Median test, p=0,072).



Slika 16. Razina sCD40L u serumu bolesnika s blagom (B) i srednje teškom/teškom (ST) kliničkom slikom HVBS-a u odnosu na zdrave kontrole u kasnoj akutnoj fazi HVBS-a. Razlika je statistički značajna između testiranih skupina (Kruskal-Wallis ANOVA & Median test, p<0,001). Razlika je statistički značajna između bolesnika s blagom kliničkom slikom i

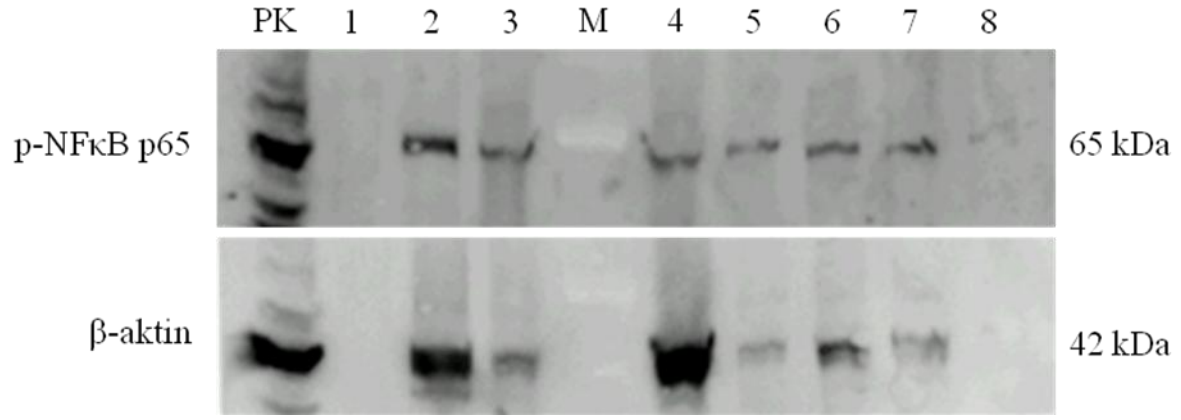
zdravih ispitanika (Mann-Whitney U test, p<0,001) i između bolesnika s srednje teškom/teškom kliničkom slikom i zdravih ispitanika (Mann-Whitney U test, p=0,018).

4.2.4 Mjerenje aktivacije NFκB proteina u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Budući da su rezultati analize ekspresije gena ukazivali na stanovitu supresiju gena odgovornih u imunološkom odgovoru domaćina mjerenjem aktivacije NFκB indirektno sam željela procijeniti status aktivacije imunološkog odgovora tijekom infekcije PUUV.

NFκB ima ključnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora na infekciju i centralna je molekula u mnogim signalnim staničnim putevima. Fosforiliranu formu p65 podjedinice NFκB kompleksa odabrala sam kao nespecifični marker aktivacije imunološkog odgovora.

U šest bolesnika i šest zdravih kontrola sam u proteinima izoliranim iz mononuklearnih stanica periferne krvi Western blotom analizirala prisutnost p-NFκB p65. Uzorci stanica prikupljeni su u ranoj fazi bolesti, a za dva bolesnika analizirala sam i uzorak iz kasnije faze bolesti. U mononuklearnim stanicama periferne krvi četvero bolesnika iz rane faze HVBS-a detektirala sam p-NFκB p65. Kod dva bolesnika za koje je bio dostupan uzorak i iz kasne faze bolesti, p-NFκB p65 bio je detektabilan i u kasnijoj fazi HVBS-a (**Slika 17**). Kod zdravih kontrola nije detektiran p-NFκB p65 (podaci nisu prikazani).



Slika 17. Western blot za p-NFκB p65 (Ser 536) s β-aktinom kao kontrolom nanošenja. PK=pozitivna kontrola, M=proteinski marker (ColorBurst Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich Inc., Saint-Louis, Missouri, SAD)), 1, 2, 3, 5, 6, 8=uzorci rane faze HVBS-a, 4, 7=uzorci kasne faze HVBS-a.

4.3 Uloga miRNA u modulaciji ranog perifernog imunološkog odgovora virusom PUU

4.3.1 Identifikacija potencijalnih miRNA regulatora imunološkog odgovora domaćina na infekciju PUUV

U ranoj fazi HVBS-a analizirala sam ekspresiju miRNA kao odgovor na infekciju PUUV. Za analizu sam odabrala 11 miRNA za koje je prethodno dokazano da imaju ulogu u fiziološkom, ali i u patološkom imunološkom odgovoru organizma. Ekspresiju miRNA analizirala sam u 17 bolesnika s HVBS-om i 10 zdravih kontrola u uzorcima mononuklearnih stanica periferne krvi i u serumu. Jedna miRNA (miR-147a) izostavljena je iz daljnje obrade budući da je analiza disocijacijske krivulje pokazivala prisutnost nespecifičnih produkata.

Od ukupno 10 analiziranih miRNA u ranoj akutnoj fazi bolesti u mononuklearnim stanicama periferne krvi, detektirala sam sedam miRNA čija je ekspresija bila promijenjena uslijed infekcije: let-7i, miR-9, miR-19a, miR-21, miR-132, miR-155 i miR-223. Svih sedam miRNA imalo je više od dva puta povišenu ekspresiju u bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu. Najveći porast ekspresije otkriven je kod miR-21, a stupanj promjene iznosio je 11,29. U ranoj akutnoj fazi infekcije relativna ekspresija miR-125b, miR-126 i miR-146a je bila nepromjenjena (**Tablica 7** i **Slika 18**).

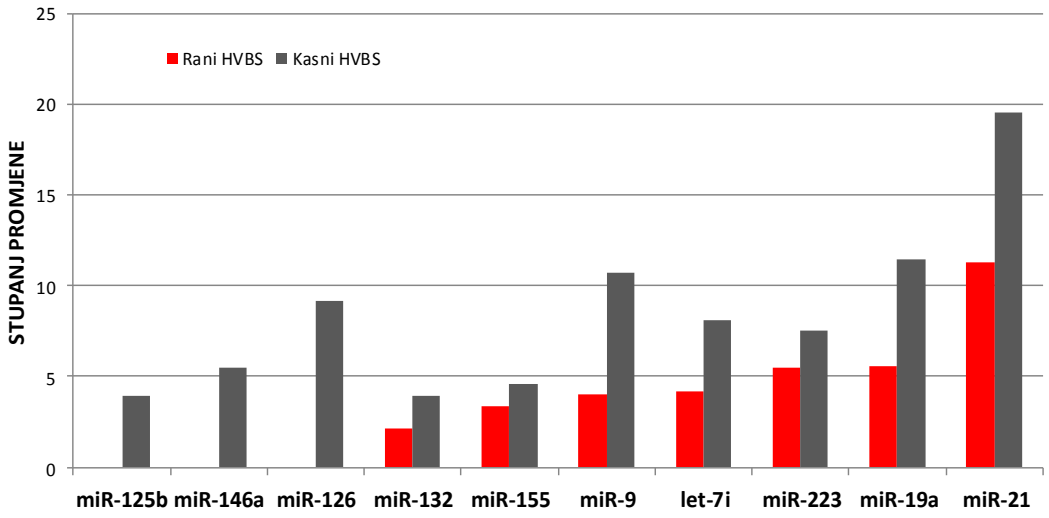
U devet bolesnika analizirala sam i mononuklearne stanice periferne krvi iz kasne akutne faze bolesti kako bih pratila dinamiku ekspresije miRNA. Tijekom trajanja bolesti došlo je do još većeg povećanja ekspresije iako ono nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolu. U kasnoj akutnoj fazi HVBS-a povećana ekspresija bilježi se u svih 10 miRNA (**Tablica 7** i **Slika 18**).

U serumu je relativna genska ekspresija mjerenih miRNA bila niska ili nedetektabilna i kod bolesnika s HVBS-om i kod zdravih kontrola (rezultati nisu prikazani).

Tablica 7. Promjene ekspresije miRNA u ranoj i kasnoj fazi HVBS-a u mononuklearnim stanicama periferne krvi

miRNA	**Stupanj promjene**	***p*[1]**	**Stupanj promjene**	***p*[1]**
miRNA s povišenom ekspresijom	**Rani HVBS (N=17)**		**Kasni HVBS (N=9)**	
let-7i	**4,15**	0,002	**8,10**	0,279
miR-9	**4,04**	<0,001	**10,75**	0,284
miR-19a	**5,57**	0,003	**11,44**	0,285
miR-21	**11,29**	<0,001	**19,56**	0,275
miR-125b			**3,90**	0,297
miR-126			**9,15**	0,249
miR-132	**2,14**	0,162	**3,94**	0,285
miR-146a			**5,47**	0,280
miR-155	**3,35**	0,004	**4,61**	0,291
miR-223	**5,50**	0,184	**7,57**	0,283

Legenda: HVBS=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom
[1]Statistički značajno pri p≤ 0,05



Slika 18. Diferencijalno eksprimirane miRNA u ranoj i kasnoj fazi HVBS-a u mononuklearnim stanicama periferne krvi

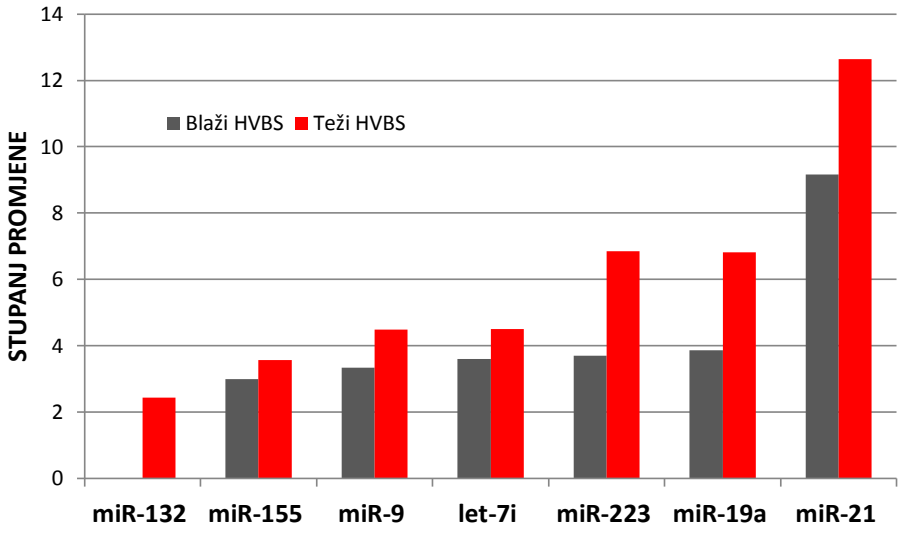
4.3.2 Promjene u ekspresiji miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom infekcije PUUV spram težini bolesti

Ekspresiju miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi analizirala sam i među skupinama bolesnika s različitom težinom bolesti. Od ukupno 17 bolesnika sedam ih je imalo blagu kliničku sliku, a 10 srednje tešku do tešku. Kada su bolesnici bili podijeljeni u dvije grupe ovisno o težini bolesti pokazale su se jasno vidljive razlike između dviju grupa bolesnika u razinama relativne genske ekspresije sedam miRNA. To su bile iste miRNA koje su bile promjenjene u HVBS-u u odnosu na zdrave kontrole. Infekcija PUUV snažnije je potaknula ekspresiju svih miRNA u grupi bolesnika s težim oblikom bolesti u usporedbi s grupom s lakšim oblikom bolesti. Pojačana ekspresija miR-132 registrirana je samo u grupi bolesnika sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom (**Tablica 8** i **Slika 19**).

Tablica 8. Promjene ekspresije miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s blagim i srednje teškim/teškim tijekom HVBS-a

miRNA	**Stupanj promjene**	***p*[1]**	**Stupanj promjene**	***p*[1]**
miRNA s povišenom ekspresijom	**Blaži HVBS (N=7)**		**Teži HVBS (N=10)**	
let-7i	**3,59**	<0,001	**4,50**	0,004
miR-9	**3,34**	<0,001	**4,48**	<0,001
miR-19a	**3,86**	0,003	**6,81**	0,001
miR-21	**9,16**	<0,001	**12,65**	<0,001
miR-132			**2,43**	0,128
miR-155	**2,99**	<0,001	**3,57**	0,005
miR-223	**3,69**	0,022	**6,84**	0,136

Legenda: HVBS=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom
[1]Statistički značajno pri p≤ 0,05

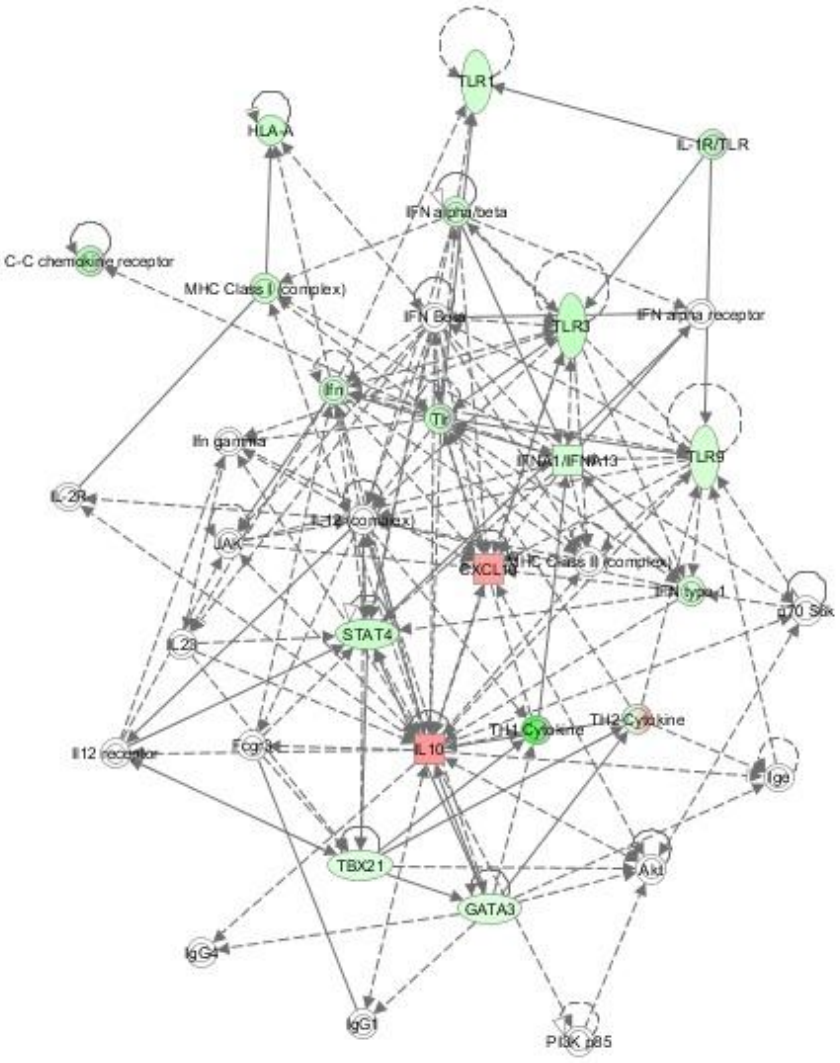


Slika 19. Diferencijalno eksprimirane miRNA u grupi bolesnika s blagim i srednje teškim/teškim tijekom HVBS-a u ranoj akutnoj fazi bolesti u odnosu na zdravu kontrolu

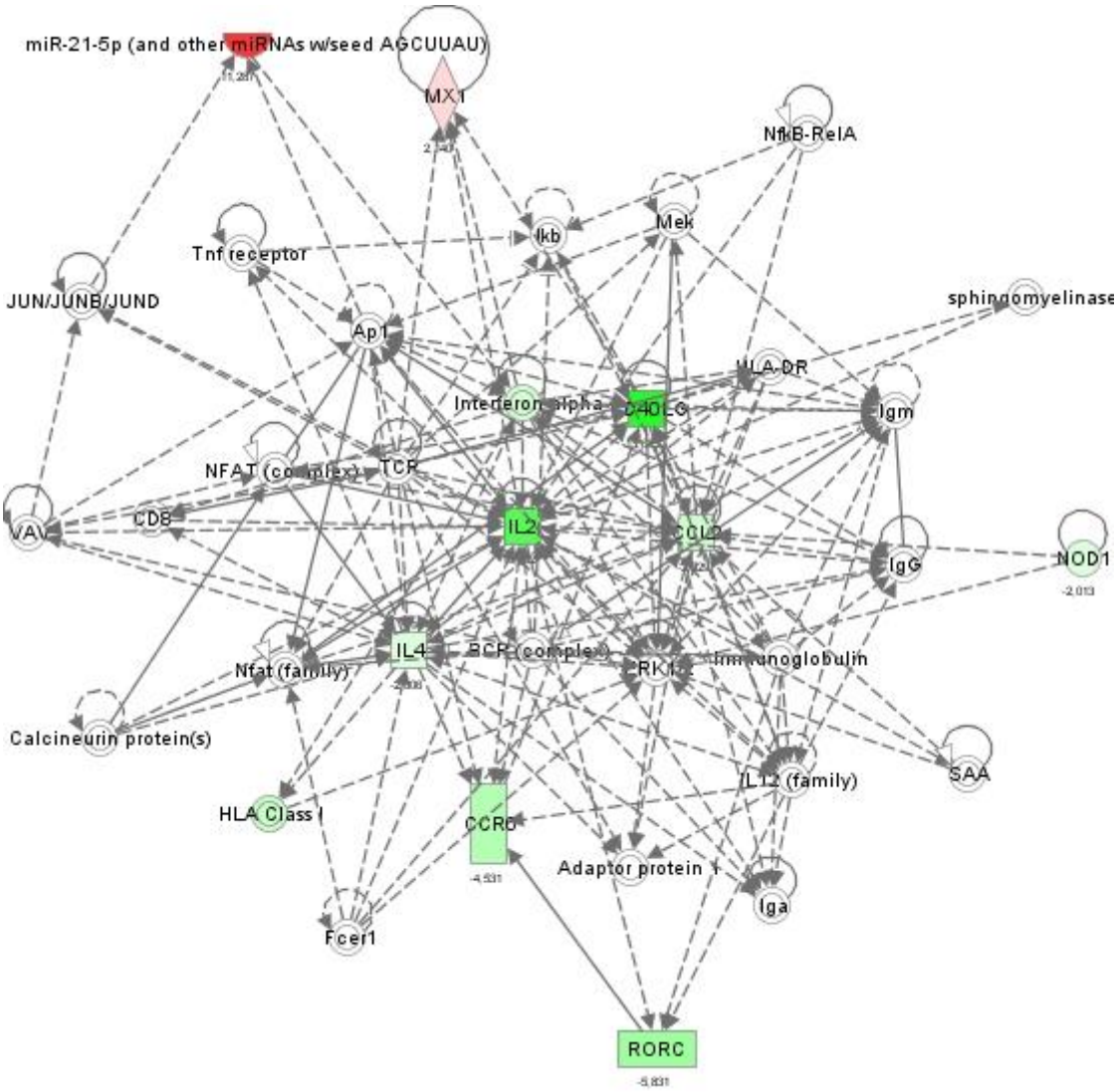
4.4 Analiza bioloških putova promijenjenih uslijed infekcije PUUV

Kako bi u potpunosti razmotrila i karakterizirala funkciju diferencijalno eksprimiranih gena i miRNA, odabrala sam gene i miRNA koji su pokazali promijenjenu ekspresiju tijekom rane akutne faze HVBS-a uzrokovanog PUUV i analizirala njihove biološke funkcije, molekularne i stanične funkcije, kanonske puteve pomoću IPA analize.

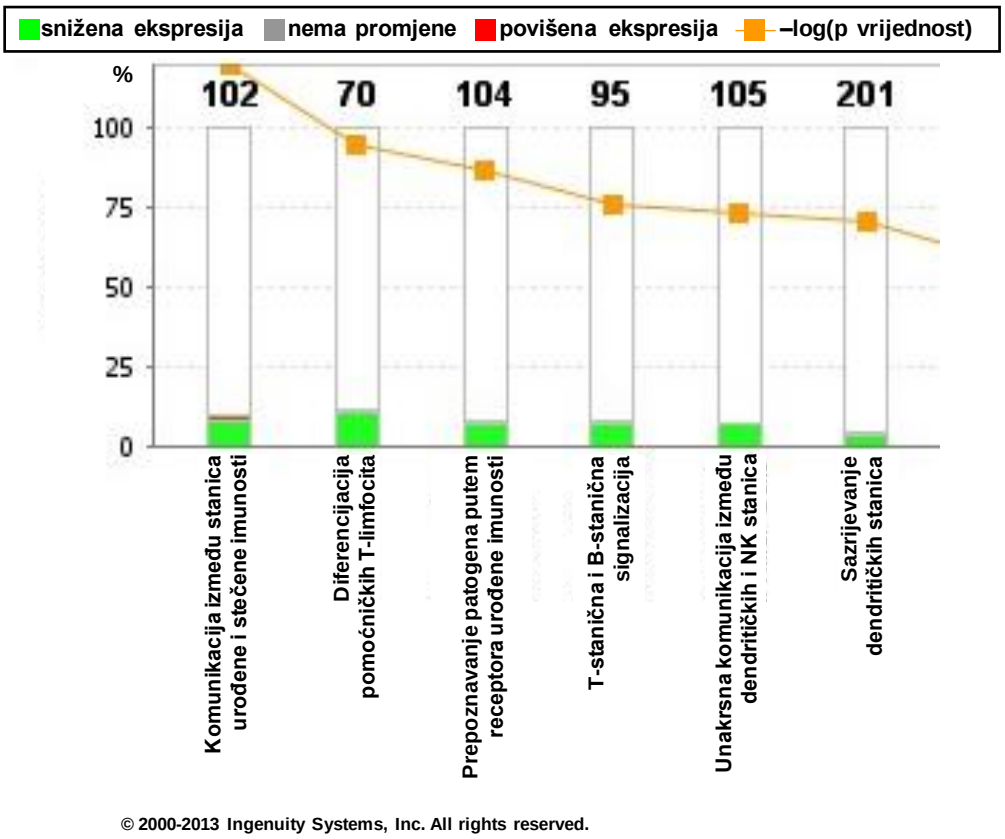
Rezultati analize bioloških funkcija su pokazali da je među selektiranim genima, čija je ekspresija bila ±2 i više puta promijenjena tijekom infekcije uzrokovane PUUV, značajan broj gena bio uključen u upalni odgovor, međustanično djelovanje i signalizaciju, stanični rast i proliferaciju (**Slike 20** i **21**). Također je utvrđeno da je većina gena bila uključena u regulaciju signalnih putova komunikacije stanica urođene i stečene imunosti, diferencijacije Th stanica i signalnih putova receptora urođene imunosti (**Slika 22**).



Slika 20. IPA analiza mreže interakcija gena i miRNA koji su regulirani u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom rane akutne faze HVBS-a uzrokovanog PUUV



Slika 21. IPA analiza mreže interakcija gena i miRNA koji su regulirani u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom rane akutne faze HVBS-a uzrokovanog PUUV



Slika 22. IPA analiza kanonskih signalnih putova koji su regulirani genima i miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom rane akutne faze HVBS-a uzrokovanog PUUV

4.5 Identifikacija imunoloških markera težine i ishoda bolesti

4.5.1 Kliničke karakteristike bolesnika s blagom i sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom HVBS-a uzrokovanog PUUV

U **Tablici 9** analizirane su kliničke značajke HVBS-a uzrokovanog PUUV tako da je uspoređena razlika u pojavnosti određenih simptoma, znakova ili promjena tijekom aparaturne obrade između bolesnika s blagom i bolesnika sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom. Jedini parametri koji su se značajno češće javljali u bolesnika s težim oblikom HVBS-a su mučnina (p=0,045) i povraćanje (p=0,035). Retroorbitalna bolnost je bila dva puta češća u bolesnika s težim HVBS-om, a enantem se u iste skupine javljao tri puta češće u odnosu na bolesnike s blažim HVBS-om iako ne postoji statistički značajna razlika vjerojatno zbog malog broja bolesnika.

Tablica 9. Razlike u kliničkim parametrima između bolesnika s blagom i srednje teškom/teškom kliničkom slikom (Fisher exact p test, $\chi 2$)

Karakteristika	Blaži HVBS (N=24)	Teži HVBS (N=15)	p^1
	N (%)	N (%)	
Vrućica	24/24 (100%)	15/15 (100%)	0,592
Hiperpireksija	4/24 (17%)	4/15 (27%)	0,411
Zimica	24/24 (100%)	14/15 (93%)	0,535
Tresavica	18/24 (75%)	14/15 (93%)	0,417
Mijalgija	20/24 (83%)	13/15 (87%)	0,564
Bolnost u leđima	20/24 (83%)	14/15 (93%)	0,501
Glavobolja	21/24 (88%)	15/15 (100%)	0,481
Retroorbitalna bolnost	4/24 (17%)	8/15 (53%)	0,083
Zamućen vid	9/24 (38%)	12/15 (80%)	0,132
Edem lica	8/24 (33%)	8/15 (53%)	0,312
Konjuktivalna injekcija	10/24 (42%)	9/15 (60%)	0,357
Bolnost u trbuhu	7/24 (29%)	8/15 (53%)	0,247
Gubitak teka	13/24 (54%)	13/15 (87%)	0,253
Mučnina	6/24 (25%)	12/15 (80%)	0,045
Povraćanje	4/24 (17%)	10/15 (67%)	0,035
Dijareja	8/24 (33%)	7/15 (47%)	0,402
Hepatomegalija	13/24 (54%)	10/15 (67%)	0,450
Splenomegalija	1/24 (4%)	4/15 (27%)	0,099
Uvećani bubrezi	3/11 (27%)	4/6 (67%)	0,296
Kašalj	7/24 (29%)	6/15 (40%)	0,431
Crvenilo lica i vrata	3/24 (13%)	3/15 (20%)	0,456
Petehije	2/24 (8%)	1/15 (7%)	0,679
Enantem	2/24 (8%)	6/15 (40%)	0,066
Hemoragije	1/24 (4%)	2/15 (13%)	0,355
Šok	0	0	-
Hipotenzija	3/24 (13%)	4/15 (27%)	0,303
Tahikardija	2/24 (8%)	5/15 (33%)	0,114
Potreba za dijalizom	0	2/15 (13%)	0,166
Patološki radiogram pluća	1/22 (5%)	4/14 (29%)	0,105
Patološki EKG	7/24 (29%)	5/15 (33%)	0,550

Legenda: HVBS=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom; **EKG**=elektrokardiogram
[1]Statistički značajno pri p≤ 0,05

U **Tablici 10** su pokazane vrijednosti odabranih laboratorijskih parametara izmjerenih u bolesnika s blagom ili srednje teškom/teškom kliničkom slikom u ranoj akutnoj fazi HVBS-a. Za nekoliko parametara, kao što su ukupni broj lekocita, neutrofili, serumski proteini, ureja, kreatinin, natrij i LDH dokazane su statistički značajne razlike između bolesnika u ovisnosti o težini kliničke slike. Vrijednosti ukupnih proteina u serumu, albumina i natrija su u bolesnika s težom kliničkom slikom bile značajno niže, dok su vrijednosti leukocita, neutrofila, alfa1-globulina, gama-globulina, ureje, kreatinina i LDH bile značajno više u istih bolesnika u odnosu na bolesnike s blagim HVBS-om.

Između bolesnika s blažom i težom kliničkom slikom HVBS-a nije bilo značajne razlike u danima bolesti kada su mjereni laboratorijski i imunološki parametri (p=0,943, Mann-Whitney U test) (**Tablica 10**).

Tablica 10. Deskriptivna statistika laboratorijskih parametara i razlike među njima između bolesnika s blagom i srednje teškom/teškom kliničkom slikom HVBS-a izmjerenih u ranoj akutnoj fazi bolesti (Mann-Whitney U test)

	Blaži HVBS				Teži HVBS				
	N	**Medijan**	**Raspon**	**25% - 75%**	**N**	**Medijan**	**Raspon**	**25% - 75%**	***p*[1]**
Dan bolesti	24	6,5	4-10	5-7,5	15	6	4-10	5-8	0,943
Sedimentacija	21	30	10-64	14-35	14	25	8-80	12-48	0,960
Eritrociti (x10^{12}/L)	23	4,87	3,91-5,40	4,36-5,18	15	4,49	3,66-6,00	4,32-5,50	0,746
Hemoglobin (g/L)	23	144	117-165	134-155	15	134	115-180	130-172	0,575
Hematokrit (L/L)	23	0,440	0,353-0,500	0,399-0,470	15	0,402	0,346-1	0,388-0,510	0,535
MCV (fL)	23	90,4	83,3-101,5	88,5-93,4	15	90,8	84,9-99,0	89,4-94,0	0,575
MCH (pg)	23	30,0	28,4-34,9	29,3-31,0	15	30,6	28,8-33,0	30,1-31,3	0,425
MCHC (g/L)	23	334	323-349	331-338	15	336	328-346	331-338	0,408
Trombociti (x10^{9}/L)	23	68	44-138	49-105	15	73	9-186	27-89	0,314
Leukociti (x10^{9}/L)	23	8,0	3,3-16,2	6,3-11,7	15	11,8	6,3-22,0	8,8-16,0	0,017
Neutrofili (%)	23	64,4	35,3-76,5	58,6-69,0	15	70,4	61,0-78,0	63,0-73,8	0,030
Limfociti (%)	23	16,6	7,1-35,1	13,0-21,2	15	14,4	6,7-28,0	11,6-17,8	0,213
Monociti (%)	23	14,1	8,4-28,9	11,7-17,8	15	12,1	6,5-19,0	8,7-14,8	0,078
Eozinofili (%)	23	3,2	1,0-11,1	1,8-4,1	15	1,7	0,1-11,0	0,4-4,1	0,064
Bazofili (%)	23	0,6	0,1-1,6	0,3-0,9	15	0,8	0,1-2,0	0,4-1,0	0,595
Ukupni proteini (g/L)	21	68	55-78	61-71	11	58	49-77	53-67	0,018
Albumini (g/L)	18	36,95	28,44-43,70	32,45-38,90	13	30,86	22,94-40,00	29,60-36,73	0,028
Globulini (g/L)	17	29,10	23,80-33,90	27,26-30,64	9	29,92	19,40-40,00	25,76-32,06	0,958
Albumini (rel. %)	17	54,7	51,7-61,6	52,9-57,2	11	52,8	41,7-57,0	49,0-54,0	0,017
Alfa1-globuilini (rel. %)	17	5,0	3,5-7,0	4,3-5,3	11	5,8	4,3-7,0	5,5-6,1	0,022
Alfa2-globulin (rel. %)	17	13,6	11,1-17,6	12,8-14,9	11	14,0	9,8-17,0	13,5-16,0	0,487
Beta-globulin (rel. %)	17	12,0	9,2-13,9	11,4-13,2	11	11,7	10,2-15,0	10,9-13,7	0,781
Gama-globulin (rel. %)	17	13,5	10,0-19,2	11,8-15,6	11	15,9	12,5-24,0	13,6-19,3	0,033

	Blaži HVBS				Teži HVBS				
	N	**Medijan**	**Raspon**	**25% - 75%**	**N**	**Medijan**	**Raspon**	**25% - 75%**	***p*[1]**
Glukoza-krv (mmol/L)	21	6,5	4,1-16,3	5,5-7,2	14	6,5	5,0-9,0	5,7-7,7	0,778
Ureja (mmol/L)	23	6,0	2,9-24,5	5,5-8,9	15	13,8	4,8-33,0	8,7-19,0	0,002
Kreatinin (µmol/L)	23	116	68-387	102-157	15	337	107-631	147-420	<0,001
Na (mmol/L)	23	136	130-141	133-138	15	135	130-139	132-135	0,044
K (mmol/L)	23	4,0	3,5-4,7	3,8-4,3	15	4,0	3,6-5,0	3,8-4,3	0,637
Cl (mmol/L)	20	98,5	95-107	96-101	15	99	91-106	97-100	0,705
CRP (mg/L)	22	60,8	19,5-162,5	47,9-104,6	14	81,2	42,4-240,0	54,5-118,9	0,281
Ukupni bilirubin (µmol/L)	20	12,8	7,2-33,2	10,6-20,5	14	11,2	6,1-20,0	10,3-18,6	0,259
AST (U/L)	21	36	16-81	25-47	14	29,5	19-80	25-52	0,702
ALT (U/L)	21	35	14-122	22-67	14	29	10-92	20-51	0,678
GGT (U/L)	21	37	14-238	23-51	14	23,5	14-121	16-50	0,135
ALP (U/L)	21	66	44-200	51-81	14	52,5	39-99	50-69	0,186
CK (U/L)	10	87,5	29-293	35-217	6	49	14-265	25-63	0,264
LDH (U/L)	22	230	163-456	222-275	13	309	190-475	299-376	0,006
PV (omjer)	16	0,98	0,88-1,10	0,92-1,02	11	0,95	0,83-1,00	0,93-1,01	0,904
APTV (omjer)	14	0,96	0,91-1,40	0,93-1,02	11	1,15	0,87-2,00	0,95-1,23	0,085
TV (s)	12	18,05	16,5-19,8	17,6-18,7	8	19,45	15,9-94,0	17,7-22,0	0,238
Fibrinogen (g/L)	16	4,15	3,4-6,6	3,7-5,2	10	3,9	2,5-6,0	3,8-5,1	0,551
Količina virusa (x10^3 kop/mL)	24	1,71	0-371	0-12,31	15	4,44	0-3130	0,11-18	0,296

Legenda: **ALP**=alkalna fosfataza; **ALT**=alanin aminotransferaza; **APTV**=aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; **AST**=aspartat aminotransferaza; **CK**=kreatin kinaza; **Cl**=klor; **CRP**=C reaktivni protein; **GGT**=gama-glutamil transferaza; **HVBS**=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom; **K**=kalij; **LDH**=laktat-dehidrogenaza; **MCV**=prosječni volumen eritrocita; **MCH**=prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu; **MCHC**=prosječna koncentracija hemoglobina u 1 L eritrocita; **Na**=natrij; **PV**=protrombinsko vrijeme; **TV**=trombinsko vrijeme

[1]Statistički značajno pri p≤ 0,05

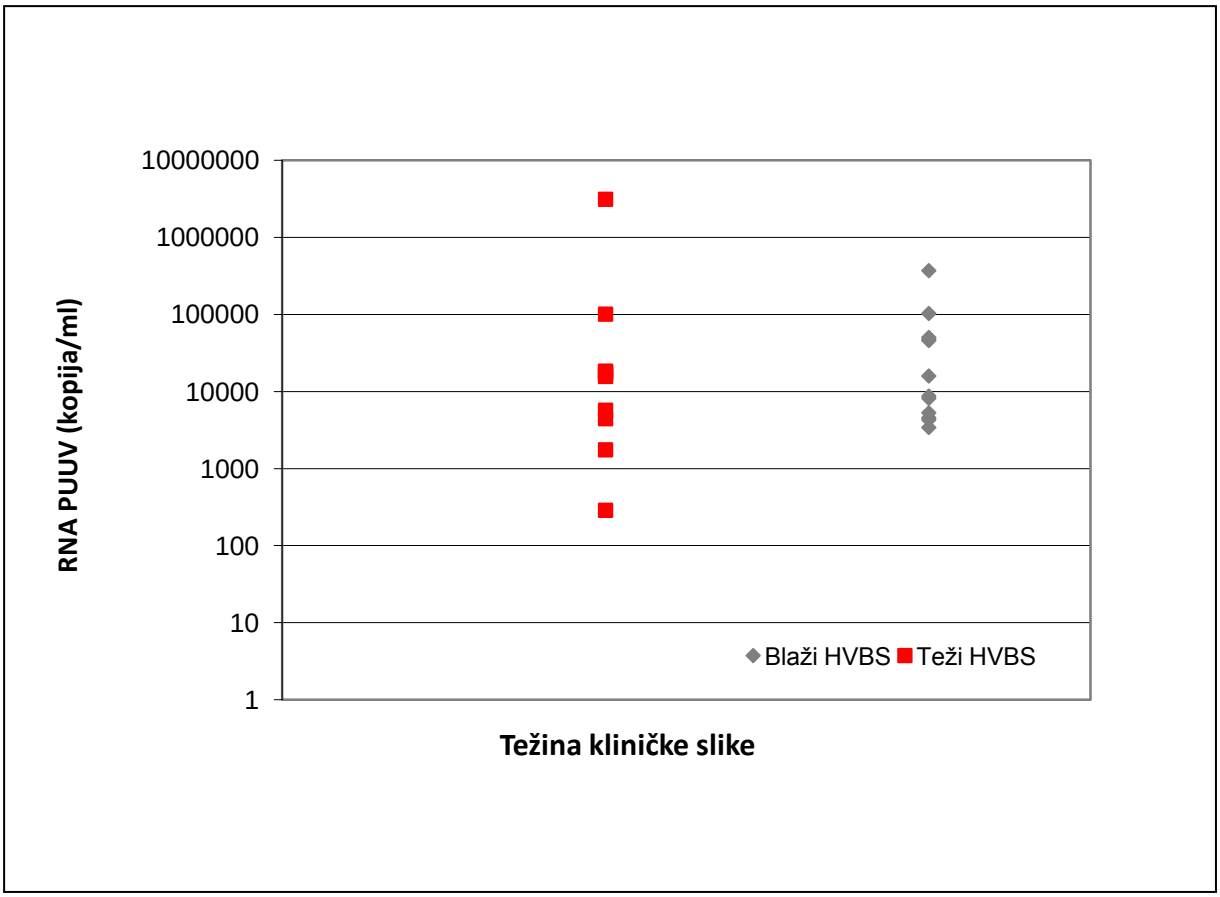
4.5.2 Viremija u bolesnika s blagom i sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom HVBS-a uzrokovanog PUUV

Viremija je mjerena u bolesnika inficiranih PUUV u uzorcima seruma iz rane akutne faze bolesti (**Tablica 11** i **Slika 23**). Genomska RNA PUUV detektirana je u ukupno 24/39 (62%) bolesnika (srednja vrijednost $1,02x10^5$ kopija/ml), odnosno 50% bolesnika s blagim tijekom bolesti imalo je detektabilnu RNA naspram 80% bolesnika sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom. Viša razina viremije nije bila značajno povezana s težom kliničkom slikom (p=0,296) iako se vidi tendencija više koncentracije virusa u bolesnika s težim HVBS-om (medijan $4,44x10^3$ kopija/ml) u odnosu na bolesnike s blažim HVBS-om (medijan $1,71x10^3$ kopija/ml) (**Tablica 10**).

Tablica 11. Viremija u serumu bolesnika s blagom i sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom HVBS-a uzrokovanog PUUV

Blaži HVBS (N=24)			**Teži HVBS (N=15)**		
	Dan bolesti	**RNA PUUV (kopija/ml)**		**Dan bolesti**	**RNA PUUV (kopija/ml)**
B1	7	**0**	B25	6	**1,01E+05**
B2	10	**0**	B26	4	**2,87E+02**
B3	9	**0**	B27	8	**1,75E+03**
B4	6	**0**	B28	8	**2,90E-01**
B5	5	**4,56E+03**	B29	6	**0**
B6	7	**1,03E+05**	B30	8	**1,10E-01**
B7	6	**3,41E+03**	B31	8	**0**
B8	6	**4,59E+04**	B32	8	**4,44E+03**
B9	7	**4,80E+04**	B33	6	**1,69E+04**
B10	6	**0**	B34	5	**1,84E+04**
B11	7	**4,29E+03**	B35	5	**1,80E+04**
B12	5	**0**	B36	6	**3,13E+06**
B13	4	**0**	B37	5	**0**
B14	6	**0**	B38	10	**5,72E+03**
B15	8	**0**	B39	6	**1,57E+04**
B16	4	**3,71E+05**			
B17	5	**1,59E+04**			
B18	8	**0**			
B19	8	**0**			
B20	8	**0**			
B21	5	**5,29E+03**			
B22	5	**8,16E+03**			
B23	7	**8,72E+03**			
B24	7	**5,04E+04**			

Legenda: B=bolesnik; **HVBS**=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom; **PUUV**=virus Puumala; **RNA**=ribonukleinska kiselina



Slika 23. Viremija u serumu bolesnika s blagom i sa srednje teškom/teškom kliničkom slikom HVBS-a uzrokovanog PUUV

4.5.3 Međuodnosi imunoloških parametara prema laboratorijskim parametrima i razini viremije

Kako bismo vidjeli ima li povezanosti između testiranih imunoloških parametara i laboratorijskih nalaza u **Tablici 12** analizirane su korelacije između imunoloških parametara koji su se pokazali značajno promjenjeni između bolesnika s blagim i srednje teškim/teškim oblikom HVBS-a i kliničkih laboratorijskih parametara. Fokus je bio na onim laboratorijskim parametrima koji su tijekom bolesti u bolesnika s HVBS-om najčešće patološki promijenjeni (npr. broj trombocita i leukocita, ureja, kreatinin, jetreni enzimi itd.) i onim među kojima je bilo statistički značajne razlike između bolesnika s blažim i težim tijekom bolesti. Ureja i kreatinin imaju značajnu negativnu korelaciju s genskom ekspresijom niza gena važnih u imunološkom odgovoru za koje je pokazana značajna promjena ekspresije, ali i razlike između bolesnika s različitom težinom kliničke slike. Broj trombocita u ranoj akutnoj fazi bolesti negativno je korelirao s koncentracijom IL-10 i CXCL10 u serumu, a pozitivno je

korelirao s sCD40L. Ovi rezultati upućuju na moguću praktičnu vrijednost ovih kliničkih i imunoloških parametara kao ranih prediktora težine kliničke slike.

U bolesnika s HVBS-om dokazana je pozitivna korelacija između viremije i koncentracije IL-10 u serumu ($R=0,421$; $p<0,05$; $N=35$) (podaci nisu prikazani u tablici).

Tablica 12. Korelacije laboratorijskih i imunoloških parametara za koje postoji značajna razlika ($p<0,05$) u njihovim razinama između bolesnika s blagom i srednje teškom/teškom kliničkom slikom

	R[1]						
	Trombociti	**Leukociti**	**Ureja**	**Kreatinin**	**Ukupni proteini**	**α1-globulin**	**Na**
PROTEINI	N=35				N=30		N=35
IL-10	**-0,362**	-	-	-	-	-	-
CXCL10	**-0,368**	-	-	-	**-0,392**	-	**-0,405**
sCD40L	**0,439**	-	-	-	-	-	-
GENI	N=12	N=12	N=12	N=12	N=9	N=10	N=12
IL10	**-0,598**	-	-	-	-	-	-
CXCL10	-	**-0,641**	**-0,642**	**-0,774**	**0,778**	-	-
CSF2	-	-	-	-	**0,758**	-	**0,590**
MX1	-	-	-	-	-	-	-
MPO	-	-	-	-	-	-	-
CCL5	-	-	-	-	-	-	-
IL23A	-	-	**-0,588**	**-0,834**	-	-	-
GATA3	-	-	-	-	-	-	-
CD80	-	-	-	-	-	-	-
NOD1	-	-	-	-	-	-	**0,644**
TBX21	-	-	-	-	-	-	-
MAPK8	-	-	-	-	-	-	-
FOXP3	-	-	**-0,706**	**-0,706**	-	-	-
TLR1	-	-	-	-	-	-	-
IL1A	-	-	-	-	-	-	-
TLR9	**0,660**	-	-	**-0,742**	-	-	**0,666**
IL4	-	**-0,633**	-	**-0,778**	-	-	**0,596**
RAG1	-	-	-	-	-	-	-
STAT4	**0,586**	-	-	-	-	-	-
C3	-	**-0,590**	-	-	-	-	**0,795**
TLR3	-	**-0,644**	**-0,650**	**-0,732**	-	-	**0,720**
CCR4	-	-	-	**-0,651**	-	-	-
HLA-A	-	-	-	-	-	-	-
CCR8	-	-	**-0,703**	**-0,671**	-	-	-
CCR6	-	-	**-0,589**	**-0,791**	-	-	**0,698**
CCL2	-	-	**-0,719**	**-0,651**	-	**-0,691**	-
RORC	-	-	-	**-0,689**	-	-	**0,669**
IL2	-	-	-	-	-	-	-
CD40L	-	-	-	-	-	-	**0,603**
miRNA		N=17					N=17
let-7i	-	-	-	-	-	-	-
miR-19a	-	-	-	-	-	-	**-0,488**
miR-21	-	-	-	-	-	-	-
miR-125b	-	-	-	-	-	-	-
miR-126	-	-	-	-	-	-	-
miR-132	-	-	-	-	-	-	**-0,502**
miR-146a	-	-	-	-	-	-	-
miR-155	-	**0,611**	-	-	-	-	-
miR-223	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Na=natrij; **R**=Spearmanov koeficijent korelacije
Legenda naziva gena od engl.: C3=Complement component 3; **CCL2**=Chemokine (C-C motif) ligand 2; **CCL5**=Chemokine (C-C motif) ligand 5; **CCR4**=Chemokine (C-C motif) receptor 4; **CCR6**=Chemokine (C-C

motif) receptor 6; **CCR8**=Chemokine (C-C motif) receptor 8; (s)**CD40L**=(solubile)CD40 ligand; **CD80**=CD80 molecule; **CSF2**=Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage); **CXCL10**=Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; **FOXP3**=Forkhead box P3; **GATA3**=GATA binding protein 3; **HLA-A**=Major histocompatibility complex, class I, A; **IL1A**=Interleukin 1, alpha; **IL2**=Interleukin 2; **IL4**=Interleukin 4; **IL10**=Interleukin 10; **IL23A**=Interleukin 23, alpha subunit p19; **MAPK8**=Mitogen-activated protein kinase 8; **MPO**=Myeloperoxidase; **MX1**=Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse); **NOD1**=Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1; **RAG1**=Recombination activating gene 1; **RORC**=RAR-related orphan receptor C; **STAT4**=Signal transducer and activator of transcription 4; **TBX21**=T-box 21; **TLR1**=Toll-like receptor 1; **TLR3**=Toll-like receptor 3; **TLR9**=Toll-like receptor 9
[1]Statistički značajno pri $p \leq 0,05$

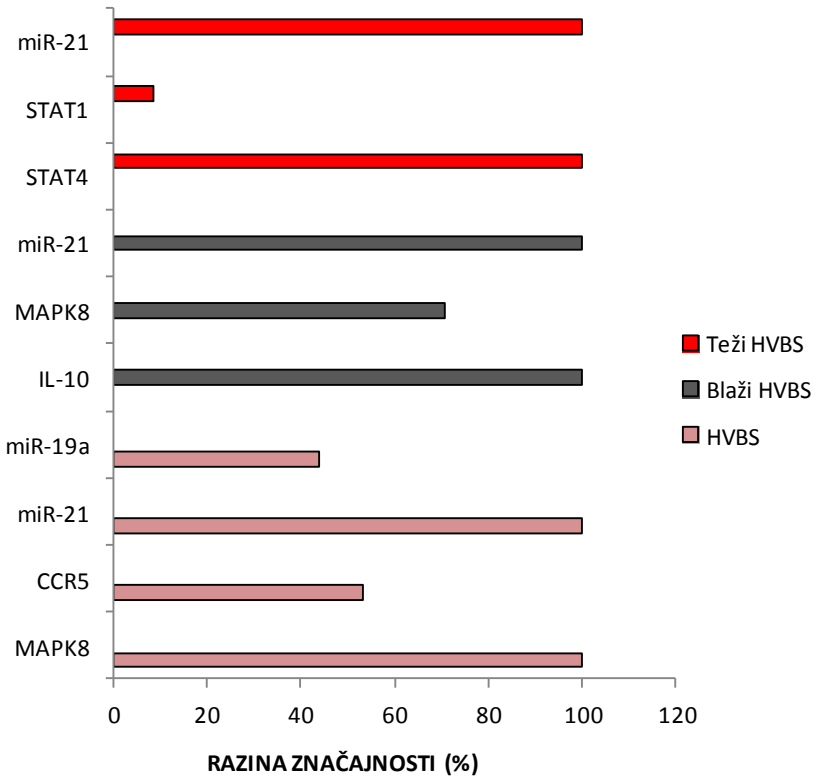
4.5.4 Identifikacija imunoloških prediktora patogeneze HVBS-a neparametrijskim modeliranjem

Kako bi identificirali molekularne značajke ranog imunološkog odgovora tijekom HVBS-a, ali i potencijalne imunološke prediktore patogeneze ovisne o težini kliničkog tijeka bolesti, modelirala sam vrijednosti relativne ekspresije testiranih gena, koncentraciju IL-10, CXCL10 i sCD40L u serumu kao i vrijednosti relativne ekspresije testiranih miRNA, dob i spol ispitanika koristeći 10-struki CV model. Optimalni MARS modeli za HVBS te blagi ili srednje teški/teški HVBS predstavljeni su svojim tzv. osnovnim funkcijama čije vrijednosti su prikazane u **Tablici 13**. Model predstavlja jedna ili kombinacija više osnovnih funkcija gdje je svaka osnovna funkcija raspon kojim razina relativne genske ekspresije pojedinačnog gena ili miRNA doprinosi klasifikaciji. MARS model 1 dobiven je modeliranjem gena imunološkog odgovora, a model 2 modeliranjem rezultata miRNA. Kako bih odredila koja značajka najviše doprinosi ukupnoj učinkovitosti modela izračunala sam njihove razine značajnosti (**Slika 24**). Razina značajnosti prema zdravoj kontroli od 100% izračunata je za MAPK8 i miR-21 u svih bolesnika s HVBS-om, IL-10 i miR-21 u bolesnika s blagim oblikom HVBS-a te STAT4 i miR-21 u bolesnika s srednje teškim/teškim oblikom HVBS-a. Pokušala sam napraviti model usporedbe bolesnika s blažim i težim HVBS-om, no zbog male veličine uzorka nije se uspio postići zadovoljavajući model koji bi se mogao dobro primijeniti na druge studije (rezultati nisu prikazani).

Tablica 13. Osnovne funkcije za različite MARS modele hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom

MARS model	B_m	Definicija*	a_m	Opis varijable
HVBS				
1	BF1	(MAPK8 - 4.41)	- 0.574817	MAPK8
	BF2	(CCR5 - 2.22)	0.395004	CCR5
2	BF1	(miR-21 + 1.87)	0.574797	miR-21
	BF3	(miR-19a - 1.66)	- 0.479764	miR-19a
Blaži HVBS				
1	BF1	(IL10 - 8.45)	- 0.214177	IL10
	BF2	(MAPK8 - 4.41)	0.431546	MAPK8
2	BF1	(miR-21 + 2.78)	- 0.258675	miR-21
Teži HVBS				
1	BF1	(STAT4 - 3.46)	0.396817	STAT4
	BF2	(STAT1 - 1.03)	- 0.279515	STAT1
2	BF1	(miR-21 + 3.72)	- 0.223249	miR-21

Legenda: a_m=koeficijent osnovne funkcije; B_m=pojedinačna osnovna funkcija; **HVBS**=hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom; *(y)=max(0,y)
Legenda naziva gena od engl.: CCR5=Chemokine (C-C motif) receptor 5; **CCR8**=Chemokine (C-C motif) receptor 8; **IL-10**=Interleukin 10; **MAPK8**=Mitogen-activated protein kinase 8; **STAT1**=Signal transducer and activator of transcription 1; **STAT4**=Signal transducer and activator of transcription 4



Slika 24. Varijable koje su korištene za kreiranje pojedinog modela i njihova razina značajnosti

5. RASPRAVA

Većina hantavirusa do danas otkrivenih su nepatogeni i samo nekolicina njih koje prenose glodavci izazivaju bolest u ljudi. Bolest se prezentira s dva različita sindroma HVBS ili HPS ovisno o tome radi li se o hantavirusima američkog ili euroazijskog područja. Razlikuju se svojom virulencijom za što kao posljedicu viđamo širok spektar različitih kliničkih stanja, od često inaparentne ili blage bolesti do fulminantne hemoragijske bolesti s teškim bubrežnim ili kardio-pulmonalnim zatajenjem i mogućim smrtnim ishodom. Do danas još uvijek imamo slabe spoznaje o faktorima koji određuju njihovu virulenciju, ali vjerojatno je da potječu i od strane samog virusa i od strane domaćina. No, za razliku od onoga što bi se moglo očekivati nisu pronađene nikakve značajne (upečatljive) razlike u strukturi ovih virusa ili njihovoj genomskoj organizaciji koje bi mogle pružiti jedinstveno i izravno objašnjenje razlika njihove patogeničnosti i/ili virulentnosti. Posebno tome u prilog govore novije spoznaje da različiti genotipovi DOBV, unatoč međusobno velikoj genetskoj sličnosti, pokazuju fascinantne razlike u virulenciji i izazivaju različiti stupanj težine HVBS-a, od životno ugrožavajuće do sasvim blage, a možda i inaparentne infekcije.

I dok se traga za molekularnim deterninantama, istovremeno je važno razumjeti i mehanizme koji leže u podlozi interakcija virusa i domaćina i vode razvoju bolesti. Virus u čovjeku prvenstveno radi štetu na nivou vaskularno-endotelnog sustava te je glavna patološka karakteristika bolesti povećana kapilarna permeabilnost praćena istjecanjem intravaskularne tekućine uz trombocitopeniju. Zanimljivo je da unatoč tome što virus primarno inficira endotelne stanice, ne dolazi do morfološkog oštećenja endotela, ali usprkos tome dolazi do dramatičnih promjena u njegovoj funkciji kao barijere u cjelosti kao i u funkciji inficiranih endotelnih stanica. Mehanizmi odgovorni za ovakav slijed događaja još uvijek su vrlo slabo rasvjetljeni i ne prestaju intrigirati znanstvenu zajednicu koja proučava hantaviruse. Dosadašnje spoznaje ukazuju da su mehanizmi posljedica direktnog i indirektnog djelovanja virusa, možda čak dominantnije indirektnog, preko virusom induciranih imunopatogenetskih učinaka. To su učinci različitih komponenti imunološkog sustava štetni po organizam, nastali bilo kao rezultat virusom inducirane deregulacije imunološkog odgovora ili kao rezultat prirodnog odgovora na hantavirusnu infekciju. Imunološki odgovor domaćina duboko je involviran u razvoj i rasplet događaja tijekom hantavirusne infekcije i svakako je moduliran od strane hantavirusa. Hipoteza ovog rada bila je da uloga imunološkog sustava započinje vrlo rano i da ona uvelike određuje kasnije događaje tijekom infekcije. Zbivanja na

imunološkoj razini možemo gledati kroz odgovor endotelnih stanica (ciljnih stanica infekcije) i kroz odgovor "klasičnih" stanica imunološkog sustava.

Spoznaje što se događa u ranoj fazi akutne hantavirusne infekcije zasada se temelje uglavnom na rezultatima *in vitro* istraživanja u različitim staničnim modelima, ponajprije na endotelnim stanicama kao glavnim hantavirusnim ciljnim stanicama i u manjoj mjeri monocitima/makrofazima te dendritičkim stanicama kao vrlo vjerojatnoj meti hantavirusa (18, 116, 120-122, 171, 172). Pored toga je, svega nekoliko ograničenih kliničkih *ex vivo* studija u kojima je mjeren citokinski odgovor u serumu bolesnika ili su analizirane karakteristike staničnog imunološkog odgovora (20, 22, 23, 80, 98, 99, 101, 102, 104, 173-175). Za sada prema literaturnim podacima ne postoji ni jedna studija koja bi dala detaljniji uvid u imunološke procese koji se odvijaju tijekom rane akutne faze bolesti u stanicama imunološkog sustava u bolesnika s HVBS-om. Ovim istraživanjem prvi puta smo, prema našem saznanju, pokazali promjene u ranom perifernom imunološkom odgovoru na molekularnoj razini uslijed hantavirusne infekcije u ljudi. Također smo pokušali dati uvid u moguće mehanizme regulacije odnosno modulacije ranog imunološkog odgovora posredovanog PUUV.

Analizom ranog transkripcijskog odgovora mononuklearnih stanica periferne krvi na infekciju PUUV otkrila sam mnoge gene domaćina koji su bili regulirani virusnom infekcijom, a čija je uloga u imunoreakcijama urođene i stečene imunosti. Iako se radi o infekciji niskopatogenim hantavirusom veći dio gena koji je doživio regulacijske promjene imao je značajno sniženu ekspresiju, što je ukazivalo na supresiju ranog imunološkog odgovora PUUV.

U populaciji mononuklearnih stanica periferne krvi dominiraju limfociti (T-limfociti, B-limfociti i NK-stanice) 70-90%, monociti čine 10-30%, a dendritičke stanice su rijetke, zastupljene u svega 1-2%. Pokazano je da hantavirusi inficiraju limfocite periferne krvi tijekom ranih stadija HVBS-a, ali se u njima ne umnažaju (119, 176). S druge strane monociti/makrofazi i dendritičke stanice podložne su infekciji PUUV kao i drugim hantavirusima te podržavaju virusnu replikaciju (15, 18, 116, 119-122, 171, 172), iako pokazuju relativno slabu do umjerenu učinkovitost infekcije. Na osnovi toga je predloženo da bi monociti i dendritičke stanice mogle također biti ciljne stanice hantavirusa i mogle bi pridonositi širenju virusne infekcije *in vivo* (119). Ako je tako, utišavanje imunološkog odgovora može biti virusu od koristi da nesmetano „plovi" u inficiranim stanicama kroz tijelo, na taj način osiguravajući sebi sigurnu sredinu i mogućnost nesmetanog prijenosa do ciljnih

organa, umirujući stanicu i njezinu aktivnost. Onemogućavanje stanica imunološkog sustava da obavljaju svoju zadaću, interferencijom s normalnim staničnim funkcijama, išlo bi u korist i slobodnom virusu u cirkulaciji što bi potencijalno moglo utjecati na opseg i trajanje viremije. Virusna regulacija ekspresije gena imunološkog odgovora mogla bi biti način na koji PUUV izbjegava imunološki nadzor posredovan mononuklearnim stanicama periferne krvi u ranoj fazi bolesti.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su geni čija je ekspresija bila suprimirana kodirali receptore za prepoznavanje obrazaca (PRR, od engl. *pattern recognition receptor*), kemokine i kemokinske receptore, citokine, transkripcijske faktore, neke signalne molekule i dr.. Različiti patogeni prepoznati su od strane urođenog imunološkog sustava preko interakcija s PRR-om. To su nespecifični receptori eksprimirani na ili u različitim stanicama koji prepoznaju evolucijski sačuvane molekularne obrasce vezane za mikroorganizme (PAMP, od engl. *pathogen-associated molecular pattern*). Aktivacijom PRR-a vezanjem za virusne PAMP-molekule dolazi do aktivacije niza signalnih kaskada i transkripcijskih faktora te pokretanja urođenog antivirusnog (sekrecije IFN tipa I) i upalnog odgovora (sekrecije proupalnih citokina). Najbolje karakterizirani PRR su članovi porodice TLR receptora te slobodni citoplazmatski RIG-I i MDA5 receptori čija je aktivnost potrebna za rano prepoznavanje nekoliko patogenih RNA virusa (177). Handke i sur. su pokazali da bi TLR3 mogao posredovati u jednom od mogućih puteva indukcije urođenog imunološkog odgovora hantavirusima, barem kod HTNV, (112) iako u obzir dolaze i drugi modaliteti aktivacije za sada još nepoznatih PRR drugim hantavirusima (178). Nadalje, indukcija IFN tipa I (IFN-α/β) može biti pobuđena angažiranjem nekoliko različitih PRR (TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I, MDA5) (179). Naši su rezultati pokazali da je PUUV u mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s HVBS-om smanjio ekspresiju nekoliko različitih PRR među kojima TLR1, TLR3 i TLR9. Štoviše, u ovom istraživanju razina genskih transkripata za IFN-α je bila nedetektabilna u bolesnika s HVBS-om kao i u zdravih kontrola, a ekspresija IFN-β nije bila promjenjena u odnosu na zdrave ispitanike uz to što je bila relativno niska u obje grupe. Izostanak ekspresije gena za IFN tip I mogao bi se barem djelomično objasniti utišavanjem TLR3 i TLR9 gena. Ovi nalazi su međusobno sukladni i zajedno navode na pretpostavku da utišavanjem pojedinih TLR receptora, PUUV izbjegava da ga prepoznaju stanice imunološkog sustava točnije monociti/makrofazi, dendritičke stanice i B-limfociti, onemogućava uspostavu antivirusnog stanja, a time i posljedičnu aktivaciju stečenog imunološkog odgovora.

Kao rezultat aktivacije interferonskog puta u stanici se događa ekspresija čitavog niza unutarstaničnih proteina induciranih IFN-α/β koji imaju antivirusnu, antiproliferativnu i imunomodulatornu funkciju. Jedan od glavnih proteina za limitiranje širenja virusa je MxA protein koji interferira s replikacijom raznih RNA virusa (180-183). Često je mjeren kao marker indukcije IFN tipa I kod različitih hantavirusa u različitim staničnim modelima (17, 26, 27, 115, 116, 122, 184, 185). Rezultati ovog istraživanja govore da u mononuklearnim stanicama periferne krvi nije zabilježena genska aktivnost IFN kod bolesnika s HVBS-om u ranoj akutnoj fazi bolesti (medijan trajanja bolesti od pojave prvih simptoma bio je šest dana), ali je istovremeno relativna ekspresija MxA (ili Mx1) gena u bolesnika s HVBS-om bila pojačana u usporedbi s kontrolom. Ovi rezultati nisu iznenađujući budući da je od ranije poznato iz literature da je PUUV slabi induktor IFN u humanim primarnim monocitima/makrofazima. U istraživanju Temonena i sur. inficirani primarni monociti/makrofazi lučili su niske koncentracije IFN-α koje su bile detektabilne tek kasnije tijekom infekcije (5-7 dana nakon infekcije). No, i prije nego što je IFN-α bio detektabilan došlo je do ekspresije MxA proteina u monocitima/makrofagima tijekom infekcije PUUV (tri dana nakon infekcije) (116). Iako vrlo niske koncentracije IFN-α (<1 IU/ml) mogu potaknuti produkciju MxA proteina (186), moguće je da je pojačana genska aktivnost MxA koju smo detektirali zapravo posljedica aktivacije IFN-om koji ne potječe nužno od tih istih mononuklearnih stanica perferne krvi već od npr. okolnih aktiviranih endotelnih stanica. Shin i sur. nedavno su pokazali da se u THP-1 stanicama (monocitna stanična linija) inficiranim patogenim hantavirusima ekspresija mRNA MxA gena značajno povećala do 3. dana nakon infekcije, dok kod nepatogenih hantavirusa uopće nije bila potaknuta (172).

Kod mnogih akutnih infektivnih bolesti indukcija sinteze određenih citokina i kemokina uobičajeni je čimbenik koji doprinosi patologiji bolesti. Kemokini su signalni proteini koji upravljaju kemotaksijom ciljnih stanica, a stvaraju se kao odgovor na upalni podražaj. Tijekom infekcije dolazi do produkcije velike koncentracije proupalnih kemokina kako bi došlo do regrutacije stanica imunološkog sustava na mjesto infekcije. Naši rezultati su pokazali da je tijekom rane akutne infekcije PUUV došlo do promjena u regulaciji nekih kemokina i njihovih receptora. Izmjerili smo značajno sniženu ekspresiju proupalnog CCL2 kemokina kao i kemokinskih receptora CCR4, CCR6 i CCR8. Njihova je uloga primarno u regulaciji migracije monocita, dendritičkih stanica i T-limfocita na mjesto upale, mogu biti važni u sazrijevanju i diferencijaciji B-limfocita i doprinositi pravilnom pozicioniranju aktiviranih T-limfocita na mjestima antigenskog prepoznavanja. Naša prijašnja istraživanja

pokazala su neke razlike u produkciji kemokina između patogenih i nepatogenih hantavirusa (18, 120). Visokopatogeni HTNV je u primarnim monocitima u ranoj fazi infekcije (do 2. dana nakon infekcije) potaknuo produkciju nekih β-kemokina i gensku ekspresiju njihovih receptora (CCL3, CCL4, CCL5, CCR1, CCR5), ali ne i CCL2 i CXCL8. No vrlo brzo nakon visokog početnog otpuštanja kemokina njihova je koncentracija počela naglo padati, osobito između 2. i 4. dana nakon infekcije, a relativna genska ekspresija njihovih receptora se dodatno povećala (18). S druge strane, nepatogeni TULV dva dana po infekciji također je u monocitima/makrofazima potaknuo produkciju β-kemokina (CCL2, CCL4 i CXCL8) čija je razina bila povišena i devet dana nakon infekcije, ali nije potaknuo lučenje CCL3, CCL5 (120).

CXCL10 je važan kemokin kojeg luče različiti tipovi stanica (monociti, endotelne stanice, fibroblasti) kao odgovor na stimulaciju IFN-γ. Njegovo kemotaksijsko djelovanje pretežito je usmjereno na mononuklearne leukocite (187). Istovremeno naši su rezultati pokazali značajno povišenu ekspresiju CXCL10 gena u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom rane akutne faze HVBS-a. Štoviše, tijekom rane akutne faze infekcije PUUV razina CXCL10 kemokina u serumu bolesnika značajno je porasla u odnosu prema zdravoj kontrolnoj skupini. U kasnoj akutnoj fazi razina CXCL10 u serumu pada, ali je još uvijek značajno viša nego u zdravih ispitanika. Dobiveni rezultati u skladu su s ranijim studijama koje su pokazale povišene vrijednosti ovog kemokina u serumu bolesnika s HVBS-om dosežući maksimalne vrijednosti tijekom hipotenzivne i oligurijske faze bolesti (23, 173). Pokazano je da sama hantavirusna infekcija potiče ekspresiju CXCL10 i na genskoj i na proteinskoj razini kako u endotelnim stanicama tako i u makrofazima *in vitro* (16, 160, 172). Uočena je vremenska razlika u regulaciji ekspresije CXCL10 patogenim i nepatogenim hantavirusima u endotelnim stanicama, gdje je u usporedbi s ranom indukcijom nepatogenim hantavirusima, ekspresija CXCL10 bila tek kasnije potaknuta pri infekciji patogenim hantavirusima (17). Čini se da bi važnu ulogu u regulaciji ekspresije CXCL10 u endotelnim stanicama mogla imati aktivacija TLR3, RIG-I i MDA5 puta inducirana virusnom replikacijom (188). Budući da smo pokazali da je ekspresija TLR3 bila značajno snižena u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom rane akutne faze infekcije PUUV moguće je da regulacija CXCL10 u ovim stanicama ide preko aktivacije drugih puteva urođene imunosti (189).

Pri infekciji uzrokovanoj visokopatogenim HTNV povišene razine CXCL10 u serumu korelirale su s težim oblikom bolesti (23). Nasuprot tomu, naše istraživanje nije pokazalo povezanost razine CXCL10 s težinom kliničke slike tijekom infekcije PUUV ni na razini

ekspresije gena ni na proteinskoj razini u serumu, moguće zbog relativno malog broja bolesnika po skupinama. No može se uočiti tendencija porasta serumske koncentracije CXCL10 kod težih bolesnika što govori u smjeru rezultata Wangove studije te viša relativna genska ekspresija kod blažih bolesnika. Nekonzistencija CXCL10 na genskoj i proteinskoj razini mogla bi se objasniti time da osim mononuklearnih stanica periferne krvi i druge stanice pridonose ukupnoj koncentraciji CXCL10 u serumu (vrlo vjerojatno je to najvećim djelom doprinos endotelnih stanica), a da ovisno o tipu stanica virus u njima različito inducira njegovu ekspresiju. U svakom slučaju bi virus regulacijom kemokinske signalizacije mogao utjecati na procese privlačenja upalnih stanica u područje oštećenja. Na taj način virus bi istovremeno mogao usporiti rješavanje ili obuzdavanja njegovog prodora na mjestu ulaska u organizam, a stanice koje ostaju u cirkulaciji mogu lako biti korištene za transfer do ciljnih organa i na taj način pridonositi patogenezi HVBS-a.

Prijašnje kliničke studije su pokazale disreguliranu produkciju citokina tijekom akutne faze hantavirusne infekcije gdje su nađene povišene koncentracije proupalnih i drugih citokina i kemokina u serumu bolesnika (TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-α, CCL5, CXCL10) (20, 22, 23, 80, 98, 99, 101, 102, 104, 174, 190). Upalne citokine produciraju makrofazi i dendritičke stanice nakon aktivacije (191). No pokazalo se da *in vitro* hantavirusna infekcija u primarnim monocitima/makrofazima nije dovela do produkcije proinflamatornih kao ni antiinflamatornih citokina osim, u nekim slučajevima, skromnih količina TNF-α i IFN-α (18, 116, 120, 121). Našim istraživanjem ovome dajemo dodatnu potporu gdje smo pokazali da je u mononuklearnim stanicama periferne krvi ekspresija većeg broja testiranih citokina bila nepromjenjena ili čak snižena u odnosu na zdravu kontrolu uključujući proinflamatorne citokine kao što su TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, ali i brojne druge. Iz toga proizlazi da bi mononuklearne stanice periferne krvi bile od manjeg značaja za ukupni doprinos povećanju razine citokina i kemokina u perifernoj cirkulaciji u ranoj fazi infekcije te da bi vrlo vjerojatno za to mogle biti odgovorne virusom aktivirane endotelne stanice (192).

Postavlja se pitanje dolazi li uopće i u kojoj mjeri do aktivacije monocita/makrofaga tijekom infekcije hantavirusima ili virus pokušava utišati upalni odgovor unatoč tome što su u serumskom okruženju mononuklearnih stanica periferne krvi prisutni faktori aktivacije monocita/makrofaga kao npr. IFN-γ. Također rezultati su pokazali pojačanu gensku ekspresiju IL-10, kao i značajno povišene vrijednosti IL-10 u serumu bolesnika u ranoj akutnoj fazi infekcije PUUV. Povećane razine IL-10 u akutnom serumu i ranije su pokazane pri infekciji drugim hantavirusima kao i kod bolesnika s dengue hemoragijskom vrućicom

(20, 22, 80, 102, 104, 174, 193), a potvrđene su našom analizom. Osim toga pokazali smo i značajno sniženu ekspresiju IL-2 i IL-4 što bi odgovaralo rezultatima većine autora koji su pokazali da su IL-2 i IL-4 nedetektabilni ili su detektirani u minimalnim količinama u serumu akutne faze (20, 23, 102).

IL-10 je pleiotropni citokin sa širokom paletom vrlo važnih imunomodulatornih funkcija kojima utječe na aktivnost različitih tipova efektorskih stanica imunološkog sustava, stoga se smatra glavnim regulatorom urođene imunosti tijekom infekcije. Smatra se zapravo da njegova indukcija kao odgovor na infekciju ima centralnu ulogu u oblikovanju patogeneze. Pokazuje snažno anti-inflamatorno djelovanje potiskujući u aktiviranim makrofazima ekspresiju inflamatornih citokina (TNF-α, IL-1, IL-6). Također može blokirati aktivnost NFkB važnu za TLR posredovan interferonski odgovor, produkciju IL-2, IL-12, IFN-γ, ekspresiju MHC klase II molekula (194). Visoke razine IL-10 izmjerene u serumu i visoka transkripcijska aktivnost u stanicama mogle bi rezultirati imunosupresivnim učinkom na mononuklearne stanice periferne krvi i biti odgovorne za obuzdavanje upalnog odgovora koji smo u njima registrirali što bi se dalje odrazilo na čišćenje od virusa odnosno njegovu perzistenciju u organizmu domaćina.

Relativna ekspresija CD40L gena pokazala je najviši stupanj supresije kod bolesnika s HVBS-om u ranoj akutnoj fazi. To se moglo vidjeti i na razini proteina gdje u ranoj akutnoj fazi bolesti nije bilo promjene u koncentraciji solubilnog CD40L u odnosu prema zdravim kontrolama. Ovo je prva studija koja govori o njegovoj mogućoj ulozi u hantavirusnoj infekciji. CD40L u najvećoj je mjeri eksprimiran na površini CD4+ T-limfocita i zajedno sa svojim receptorom CD40 čini kostimulatorni par molekula kojim je omogućena dvosmjerna komunikacija između T-limfocita i antigen prezentirajućih stanica. Vezanjem za CD40 na različitim stanicama utječe na njihovu aktivnost, pa tako aktivira endotelne stanice i potiče ekspresiju adhezijskih molekula; aktivira makrofage i inducira produkciju upalnih citokina, kemokina, dušikovog oksida; aktivacijom B-limfocita vodi njihovoj diferencijaciji, proliferaciji i produkciji protutijela. Poznato je da specifični citokini kao, IL-2, IL-12 i IL-15 potiču ekspresiju CD40L, dok drugi kao IL-4 i IL-10 ju snižavaju (195). Zanimljivo je da je upravo ekspresija IL-2 utišana u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom infekcije PUUV, a ekspresija IL-10 značajno potaknuta, a ista situacija se odražava i na razini proteina u serumskom miljeu. Moguće je da bi neravnoteža između ova dva citokina mogao biti jedan vid regulacije ekspresije CD40L i time moguće objašnjenje za njegovu sniženu ekspresiju.

Trombociti također eksprimiraju CD40L i preko njega se mogu vezati za makrofage, endotelne stanice i T-limfocite. Trombocitopenija je jedna od glavnih patoloških karakteristika HVBS-a. Za sada nema nikakvih podataka koji bi govorili o povezanosti CD40L i trombocitopenije u HVBS-u.

Infekcija kako endotelnih stanica tako i makrofaga virusom PUU pokreće u stanicama produktivnu virusnu replikaciju. Naši rezultati sugeriraju da PUUV modulira rani imunološki odgovor u mononuklearnim stanicama periferne krvi na način da suprimira rani stanični transkripcijski odgovor. Ekspresiju gena koji kodiraju različite medijatore imunološkog odgovora, reguliraju i na nju utječu brojni endogeni i egzogeni čimbenici. Nedavno su miRNA identificirane kao ključne komponente regulacije imunološkog odgovora (141). Naša hipoteza je bila da bi utišavanje transkripcijskog odgovora u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom infekcije PUUV moglo biti posljedica djelovanja miRNA. S druge strane virusna infekcija značajno utječe na ekspresiju staničnih miRNA potičući ili snižavajući njihovu ekspresiju, što može biti posljedica bilo antivirusne obrane domaćina, bilo djelovanja samih virusnih faktora.

Ranije je izloženo da su miRNA usko povezane s patogenezom flavivirusa, prije svega infekcijom virusom dengue (DENV). DENV izaziva virusnu hemoragijsku vrućicu čiji su patogenetski mehanizmi, barem dijelom vrlo slični onima kod HVBS-a i također se pretpostavlja da je u osnovi imunološki posredovana bolest. Pokazano je da stanične miR-122 i miR-142 sudjeluju u ograničavanju replikacije DENV (196, 197). Predloženo je da bi miR-147 mogla biti negativni regulator različitih proinflamatornih citokina koji se luče mononuklearnim stanicama periferne krvi inficiranim DENV uključujući CCL2, CCL3, CCL8, IP-10 (198). Relativno nedavna studija je pokazala da je infekcija DENV u mononuklearnim stanicama periferne krvi vodila do promjene u ekspresiji različitih miRNA osobito onih kojima bi citokini mogli biti ciljni geni. To bi za posljedicu imalo derepresiju ekspresije citokina čime bi se mogao objasniti nastanak citokinske oluje, glavnog patofiziološkog događaja uslijed infekcije DENV (199).

Podaci o mogućoj ulozi miRNA u patogenezi hantavirusa vrlo su skromni. Prve dokaze da bi miRNA mogle imati ulogu u patogenezi hantavirusne infekcije dali su Pepini i sur. pokazavši da regulacija staničnih miRNA tijekom infekcije ANDV doprinosi virusom induciranoj propusnosti endotelnih stanica. Infekcija je dovela do promjena ekspresije stanovitog broja miRNA čija je uloga u regulaciji vaskularnog integriteta, sekrecije i vaskularne

permeabilnosti što pak sugerira da bi one mogle biti potencijalne regulatorne molekule patoloških događaja tijekom hantavirusne infekcije (159). Nedugo nakon njih grupa Shin i sur. dala je uvid u moguće mehanizme modulacije imunološkog odgovora domaćina tijekom hantavirusne infekcije. Inficirane endotelne stanice, makrofazi i epitelne stanice pokazale su različitu miRNA ekspresiju ovisno o vrsti stanica kao i o tipu hantavirusa kojim su bile inficirane. Također su bioinformatički predvidjeli da su ciljne mRNA molekule onih miRNA promjenjenih pod utjecajem hantavirusne infekcije, povezane s upalnim odgovorom i signalnim putevima posredovanim receptorima urođene imunosti, što implicira da bi imunološki odgovor tijekom hantavirusne infekcije barem djelomično mogao biti reguliran ovim miRNA kroz disregulaciju gena nužnih u procesu upale (160). U ovoj studiji po prvi puta smo pokazali da dolazi do regulacije/modulacije ekspresije staničnih miRNA u bolesnika s HVBS-om. Infekcija PUUV u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom rane akutne faze HVBS-a dovela je do pojačane ekspresije sedam miRNA, uključujući let-7i, miR-9, miR-19a, miR-21, miR-132, miR-155, miR-223 sa stupnjem promjene u rasponu od 2.14 do 11.29. Naša pretpostavka je bila da bi ove povišene miRNA mogle regulirati gene imunološkog odgovora koji su bili diferencijalno eksprimirani u stanicama bolesnika s HVBS-om inficiranih PUUV. Opaženo smanjenje ili povećanje relativne ekspresije pojedinih gena imunološkog odgovora moglo bi biti rezultat direktnog (ciljanjem specifičnog gena imunološkog odgovora) ili indirektnog (ciljanjem jednog od transkripcijskog regulatora specifičnog gena imunološkog odgovora) učinka regulacije određenom miRNA. Također, miRNA bi mogle regulirati ekspresiju ne samo direktnim vezanjem ciljne mRNA i njenom destabilizacijom već i putem epigenetskih mehanizama. Poznato je da miRNA ciljaju i specifične epigenetske regulatorne proteine (135, 200).

Poznato je da makrofazi posjeduju svu potrebnu mašineriju za procesiranje miRNA, a nedavno je identificirano i 119 različitih miRNA koje se normalno eksprimiraju u humanim primarnim makrofazima (201). Većina miRNA koje su bile pojačano eksprimirane u mononuklearnim stanicama periferne krvi u HVBS bolesnika (let-7i, miR-21, miR-132, miR-155, miR-223 i miR-146a), mogu se detektirati u primarnim makrofazima. Štoviše, miR-155 i miR-223 spadaju u visokospecifične miRNA koje se selektivno eksprimiraju u stanicama hematopoetskog sustava (146, 202). PUUV je u mononuklearnim stanicama periferne krvi potaknuo i ekspresiju miR-9, miR-19a, miR-125b i miR-126 koje se ne eksprimiraju normalno u primarnim makrofazima te je moguće da potječu i od drugih stanica npr. limfocita ili dendritičkih stanica. Ovo ukazuje da bi miRNA iz monocita/makrofaga mogle imati važnu

ulogu u posttranskripcijskoj regulaciji staničnog imunološkog odgovora na infekciju PUUV te značajno doprinositi kako normalnoj funkciji makrofaga u obrani tako i patogenezi HVBS-a. Specifična uloga svake od tih miRNA tijekom infekcije PUUV tek treba biti istražena.
U ovom istraživanju po prvi puta smo pokazali i dinamiku promjena ekspresije miRNA tijekom hantavirusne infekcije odnosno analizirali smo promjene u ranoj (medijan od početka pojave simptoma - šest dana) i kasnoj (medijan od početka pojave simptoma - 15 dana) akutnoj fazi HVBS-a. Kako se akutna faza bolesti bližila kraju ekspresija svih sedam miRNA bila je još jače potaknuta iako se promjena nije pokazala statistički značajnom u odnosu na kontrolnu skupinu. Dok su neke miRNA pokazale produženo regulacijsko djelovanje tijekom cijele akutne faze HVBS-a, čini se da funkcija nekih miRNA u regulaciji imunološkog odgovora tijekom hantavirusne infekcije dolazi do izražaja tek u kasnijoj fazi bolesti kao npr. za miR-125b, miR-126 i miR-146a od kojih nijedna nije bila aktivirana u ranoj akutnoj fazi. Ovi rezultati upućuju da postoji i vremenski specifična regulacija na nivou miRNA što nije iznenađujuće jer se i virusna replikacija i patogeničnost koja proizlazi iz nje mijenjaju tijekom progresije bolesti.

Kako bi dobili širu sliku odnosno biološki kontekst promjena nastalih na razini ranog imunološkog odgovora posredovanih infekcijom PUUV pokušali smo funkcionalno analizirati diferencijalno eksprimirane gene i miRNA u ranoj akutnoj fazi HVBS-a te vidjeti koji regulatorni odnosi među njima postoje. Željeli smo također vidjeti kako se nastale promjene odražavaju na molekularne i stanične funkcije mononuklearnih stanica periferne krvi, kao i koje su biološke funkcije pogođene ovim promjenama odnosno koja patološka stanja ili procesi inducirani.
Rezultati su pokazali da su infekcijom PUUV bili pogođene funkcije hematološkog sustava što nije bilo iznenađujuće budući se radilo o mononuklearnim stanicama periferne krvi. Upalni odgovor se pokazao kao najrelevantniji patološki proces u koji je najveći broj promjenjenih gena bio involviran tijekom infekcije PUUV, a budući da je većina gena imala smanjenu ekspresiju možemo špekulirati da virus na periferiji interferira na razini regulacije upalnog odgovora. Na staničnoj razini rezultati ukazuju da je virus najviše interferirao s funkcijama međustanične signalizacije i interakcije te na stanični rast, razvoj i proliferaciju. To se očitovalo i na razini staničnih signalnih puteva. Tako smo pokazali da su infekcijom PUUV pogođeni putevi komunikacije stanica urođene i stečene imunosti, diferencijacije Th stanica i prepoznavanja virusa putem receptora urođene imunosti (PRR). Naša mreža

interakcija različito eksprimiranih gena u mononuklearnim stanicama periferne krvi posredstvom infekcije PUUV i funkcionalna analiza tih interakcija podupiru već ranije karakterizirane i potencijalno važne receptore i signalne puteva u različitim stanicama regulirane patogenim hantavirusima (19, 94, 112, 160, 189). Istovremeno daje i nove spoznaje u putove koje hantavirusi moduliraju u monocitima/makrofazima, limfocitima i dendritičkim stanicama, stanicama koje su s jedne strane važne u imunološkom odgovoru i obrani organizma od infekcije dok istovremeno predstavljaju vrlo vjerojatne ciljne stanice za njihovu replikaciju, a upravo o tim interakcijama još uvijek jako malo znamo. Štoviše, mnogi geni domaćina koji su regulirani virusnom infekcijom grupiraju se u biološke putove koji mogu baciti novo svijetlo na patogenezu hantavirusne infekcije.

PUUV se smatra niskopatogenim hantavirusom i generalno možemo reći da je klinički tijek infekcije PUUV obično blag i povoljan. No, u manjem postotku slučajeva bolest može poprimiti i teže forme s pojavom teških komplikacija koje vode liječenju u jedinicama intenzivne skrbi pa čak i smrtnom ishodu u do 0.4% slučajeva (5, 90, 203). Nekoliko je komparativnih studija infekcija s PUUV i DOBV već ranije pokazalo da su učestalost i intenzitet kliničkih obilježja i laboratorijskih parametara uobičajeno izraženiji kod HVBS-a uzrokovanog DOBV (3, 70, 71). Klinički tijek bolesti naših bolesnika inficiranih PUUV je bodovan i na osnovi toga su bili raspodjeljeni u grupu s blažim ili težim oblikom HVBS-a. Analizirajući glavne kliničke manifestacije nismo našli veći broj parametara koji su se statistički značajno razlikovali u bolesnika s blagom i bolesnika s težom kliničkom slikom, iako se može vidjeti da je pojavnost gotovo svih kliničkih parametara bila veća u grupi bolesnika s težim oblikom bolesti. Moguće da je na to utjecao relativno mali broj ispitanika unutar svake pojedinačne grupe. Rezultati su u sukladnosti s podacima iz drugih studija koje su uspoređivale težinu kliničke slike među bolesnicima s HVBS-om uzrokovanim PUUV (81, 104). Već tijekom rane akutne faze infekcije bolesnici s blažom i bolesnici s težom kliničkom slikom imali su jasno diferencirane određene laboratorijske parametre. S težim kliničkim ishodom značajno su bile povezane niže vrijednosti ukupnih proteina u serumu, albumina i natrija te više vrijednosti leukocita, neutrofila, kreatinina, ureje, alfa1-globulina, gama-globulina i LDH. Pettersson i sur. su u svojoj recentrnoj studiji također pokazali da su leukociti, neutrofili, kreatinin, LDH, odnosno njihove maksimalne vrijednosti, bile značajno povezane s težinom bolesti, kao i trombociti te titar IgG protutijela u infekciji PUUV (81).

Iako je trombocitopenija jedno od glavnih patoloških obilježja HVBS-a u ovom istraživanju nisam dokazala statistički značajnu razliku u broju trombocita između grupa.

Zanimljivo je da, kao ni u studijama Petterssona i sur. i Sakside i sur., nismo našli povezanost koncentracije RNA PUUV s težim kliničkim tijekom bolesti koja je inače pokazana u nekoliko studija na HVBS i HPS bolesnicima inficiranim drugim hantavirusima te se čini da količina PUUV u cirkulaciji nema utjecaj na težinu bolesti (75, 76, 78- 81, 204). Niža razina viremije PUUV (srednja vrijednost 10^5 kop/ml) u naših bolesnika također je odgovarala podacima iz literature (80, 81, 204).

Obzirom na to da kod PUUV (kao i kod drugih hantavirusa s većim patogenim potencijalom) postoje različiti stupnjevi težine bolesti, pokušala sam utvrditi postoje li razlike u ranom imunološkom odgovoru ovisne o težini bolesti, odnosno utječe li imunološki odgovor na kliničku prezentaciju bolesti. Pokazano je da su određeni aspekti imunosti kao npr. humoralni imunološki odgovor povezani s težinom kliničke slike HVBS-a. Tako je niski odgovor specifičnih IgG protutijela značajno povezan s težim oblikom bolesti (81, 128, 205). U težim oblicima hantavirusne infekcije u serumu bolesnika pronađene su i značajno više koncentracije različitih citokina i kemokina kao važnih medijatora imunološkog odgovora (23, 102-104, 174). Ovo je prva studija koja je proučavala imunološki odgovor na infekciju hantavirusima u ljudi na razini gena i istraživala moguću povezanost između relativne ekspresije gena uključenih u odgovor organizma na infekciju i indikatora težine HVBS-a. Istraživanjem smo pokazali da su u bolesnika s težim tijekom bolesti promjene na razini staničnog transkripcijskog odgovora bile izraženije. Kod težih bolesnika opazili smo ukupno veći broj promjenjenih gena (dominantno sa sniženom ekspresijom) i kod svih gena s jačim stupnjem supresije u odnosu na bolesnike s blažim oblikom bolesti. Kod bolesnika u serumu nismo pronašli značajne razlike u mjerenim citokinima i kemokinima gledajući prema težini bolesti, ali ipak su u skupini bolesnika s težim tijekom bolesti bile prisutne više vrijednosti medijana za IL-10 i CXCL10, dok je medijan izmjerene koncentracije citokina sCD40L bio viši u bolesnika s blažim tijekom bolesti što se očitovalo tek u kasnoj akutnoj fazi. Nekoliko studija do sada, na virulentnijim hantavirusima kao HTNV, DOBV ili hantavirusi koji uzrokuju HPS, evidentno je pokazalo da bi neuravnotežena produkcija citokina i kemokina u cirkulaciji mogla pridonositi težem kliničkom tijeku bolesti (23, 102, 104, 174). Moguće da su različitosti koje vidimo u promjenama imunološkog odgovora među bolesnicima različite težine bolesti inficirane PUUV slabije i ne toliko izražene jer i sam virus pokazuje slabiju patogeničnost u odnosu na ostale patogene hantaviruse. Slična opažanja vezana za PUUV

imali su u svojoj studiji Saksida i sur. (104). Svakako bi bilo potrebno rasvjetliti je li neuravnoteženost u produkciji citokina tijekom hantavirusne infekcije uzrok ili rezultat imunopatogenetskih mehanizama i posljedično kliničke simptomatologije koju vidimo.

Osim što smo pokazali da postoje različitosti u ranom imunološkom odgovoru na PUUV koje sugeriraju povezanost s težinom bolesti, naši rezultati pokazali su i jasno vidljive razlike u između dviju grupa bolesnika u potencijalnim regulatorima tog imunološkog odgovora gdje su jači stupanj ekspresije doživjele sve miRNA u grupi težih u odnosu na blaže bolesnike. Postavlja se pitanje je li to rezultat snažnijeg odgovora domaćina koji je trebao staviti pod kontrolu intenzivniju disregulaciju imunološkog odgovora ili je to rezultat disregulacije u ekspresiji miRNA koja zajedno s ostalim čimbenicima pridonosi patogenezi i vodi u teži oblik bolesti.

Pojedini imunološki parametri pokazali su značajnu korelaciju s određenim laboratorijskim parametrima i to upravo s onim koji bivaju patološki promijenjeni tijekom HVBS-a ukazujući na težinu i stupanj patofiziološke promjene. Ureja i kreatinin koji su indikatori akutnog bubrežnog oštećenja tijekom hantavirusne infekcije, te ukupni broj trombocita kao indikator akutne trombocitopenije imali su značajne korelacije s određenim imunološkim varijablama što dodatno učvršćuje indikacije o njihovoj povezanosti s težinom kliničke slike.

Željeli smo istražiti i potencijalne prediktore kliničke progresije bolesti i/ili težine kliničke slike u bolesnika s HVBS-om uzrokovanim PUUV. Pokušali smo napraviti nekoliko različitih vrsta modela za predikciju različitih statusa bolesti uključujući model za predikciju HVBS-a, model za predikciju blažeg oblika bolesti, model za predikciju težeg oblika bolesti. Identificirali smo nekoliko potencijalnih molekularnih imunoloških markera kao što su MAPK8, CCR5, IL-10, STAT1, STAT4, miR21 i miR19a koji su selektirani na osnovu neparametrijskog modeliranja. Budući da se već od ranije zna da različiti aspekti imunološkog sustava mogu imati reperkusije na tijek i težinu hantavirusne infekcije možemo reći da bi bilo bitno identificirati molekularne determinante imunološkog odgovora domaćina koje su povezane s lošijim ishodom. Identifikacija prediktivnih modela bila bi značajna u ranoj detekciji teških oblika hantavirusne infekcije i translaciji znanstvenih rezultata iz područja biologije u medicinu. Svakako su potrebna dodatna istraživanja na većem broju bolesnika da bi se rasvjetlila njihova stvarna uloga i utjecaj na tijek bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. U ovoj studiji sam po prvi put sveobuhvatno na razini ekspresije gena detektirala važne elemente nespecifične i specifične imunosti u mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s hemoragijskom vrućicom s bubrežnim sindromom uzrokovanom virusom Puumala. Analiza je bila usmjerena na imunoreakcije u ranoj akutnoj fazi bolesti.

2. Veliki broj gena kod kojih su dokazane regulacijske promjene imao je značajno sniženu ekspresiju, što ukazuje na supresiju ranog imunološkog odgovora na PUUV na razini mononuklearnih stanica periferne krvi. Geni koji su bili suprimirani kodirali su: receptore za prepoznavanje obrazaca, kemokine i kemokinske receptore, citokine, transkripcijske faktore, neke signalne molekule i dr.:

    a. TLR1, TLR3 i TLR9 su bili sniženi u mononuklearnim stanicama periferne krvi u ranoj akutnoj fazi bolesti što bi PUUV mogao koristiti kao potencijalni mehanizam izbjegavanja prepoznavanja od strane stanica imunološkog sustava.

    b. U mononuklearnim stanicama periferne krvi nije zabilježena genska aktivnost IFN tipa I u ranoj akutnoj fazi HVBS-a, ali je istovremeno relativna genska ekspresija MxA (ili Mx1) bila pojačana u usporedbi s kontrolom.

    c. Ekspresija većeg broja testiranih citokina je bila nepromjenjena ili snižena (IL-2, IL-4) u odnosu na zdravu kontrolu uključujući proinflamatorne citokine kao što su: TNF-α, IL-1α, IL-1β i IL-6. Nasuprot tomu, pokazali smo pojačanu gensku ekspresiju IL-10, kao i značajno povišene vrijednosti IL-10 u serumu bolesnika u ranoj akutnoj fazi infekcije PUUV, što je u skladu s nalazima prethodnih studija.

    d. Snižena ekspresija proupalnog CCL2 kemokina kao i kemokinskih receptora (CCR4, CCR6 i CCR8) koju sam dokazala na razini mononuklearnih stanica periferne krvi, može utjecati na regulaciju migracije, diferencijacije i sazrijevanja stanica upalnog odgovora. Pokazala sam pojačanu gensku ekspresiju CXCL10 kemokina kao i značajan porast razine CXCL10 kemokina

u serumu bolesnika u ranoj akutnoj fazi HVBS-a u odnosu na zdravu kontrolu. U kasnoj akutnoj fazi razina CXCL10 u serumu pada, ali je još uvijek značajno viša nego u zdravih ispitanika.

e. Ovo je prva studija koja je pokazala moguću značajnu ulogu CD40L u imunopatogenezi HVBS-a. U ranoj akutnoj fazi HVBS-a zabilježena je izrazita supresija genske aktivnosti CD40L na razini mononuklearnih stanica periferne krvi te istovremeno nije bilo promjene u koncentraciji solubilnog CD40L u serumu bolesnika s HVBS-om u odnosu prema zdravim kontrolama. U kasnoj akutnoj fazi razina solubilnog CD40L u serumu je značajno porasla te je moguće da CD40L u hantavirusnoj infekciji ima odgođeno djelovanje.

f. Iako naša istraživanja zorno pokazuju brojne elemente koji mogu imati ulogu u supresiji upalnog odgovora u ranoj fazi HVBS-a, detektirala sam fosforiliranu formu p65 podjedinice NFκB kompleksa koja predstavlja nespecifični marker aktivacije imunološkog odgovora, što nije neočekivano obzirom na razvoj upalnog odgovora u kasnijim fazama HVBS-a.

3. Rezultati ovoga rada jedan su od prvih eksperimentalnih *ex vivo* dokaza o mogućoj važnosti miRNA u regulaciji imunološkog odgovora u HVBS-u. Infekcija PUUV u mononuklearnim stanicama periferne krvi tijekom rane akutne faze HVBS-a dovela je do pojačane ekspresije sedam miRNA: let-7i, miR-9, miR-19a, miR-21, miR-132, miR-155, miR-223.
4. Bioinformatičkom analizom koja daje predikciju funkcije pokazali smo da PUUV modulira biološke funkcije i stanične signalne puteve u mononuklearnim stanicama periferne krvi:
    a. Infekcijom PUUV bile su pogođene funkcije hematološkog sustava.
    b. Upalni odgovor se pokazao kao najrelevantniji patološki proces u koji je najveći broj promjenjenih gena bio involviran tijekom rane akutne faze HVBS-a. Budući da je većina gena imala smanjenu ekspresiju možemo pretpostaviti da virus na periferiji interferira na razini regulacije upalnog odgovora.
    c. PUUV vjerojatno interferira s funkcijama međustanične signalizacije i interakcije, staničnog rasta, razvoja i proliferacije, a mogao bi imati i važan utjecaj na puteve komunikacije stanica urođene i stečene imunosti,

diferencijacije Th stanica te prepoznavanja virusa putem receptora urođene imunosti (PRR).

5. Kliničke i kliničko-laboratorijske značajke HVBS-a u naših bolesnika nisu se razlikovale od nalaza u našim prethodnim studijama, međutim, našli smo razlike u spomenutim parametrima između bolesnika s blagom i srednje teškom/teškom kliničkom slikom. S težim kliničkim ishodom značajno su bile povezane niže vrijednosti ukupnih proteina u serumu, albumina i natrija te više vrijednosti leukocita, neutrofila, kreatinina, ureje, alfa1-globulina, gama-globulina i LDH.

6. Ekspresija gena povezanih s reakcijama urođene i stečene imunosti kao i ekspresija miRNA pokazala je povezanost s težinom bolesti PUUV infekcije iako nije bila statistički značajna najvjerojatnije jer je PUUV niskopatogeni hantavirus koji ne radi tako dramatične razlike u samoj težini bolesti.

7. Statističkom analizom i neparametrijskim modeliranjem identificirali smo potencijalne imunološke prediktore patogeneze HVBS-a uzrokovanog PUUV.

    a. Ureja i kreatinin su bili u negativnoj korelaciji sa značajnim brojem molekula koje predstavljaju važne elemente nespecifične i specifične imunosti.

    b. Neparametrijskim modeliranjem identificirano je nekoliko potencijalnih molekularnih imunoloških prediktora kliničke progresije bolesti i/ili težine kliničke slike kao što su MAPK8, CCR5, IL-10, STAT1, STAT4, miR21 i miR19a, a potrebna su daljnja istraživanja na većem broju bolesnika da bi se rasvjetlila njihova uloga i utjecaj na tijek bolesti.

8. U bolesnika s HVBS-om dokazana je značajna pozitivna korelacija između količine PUUV u cirkulaciji („viral load“) i razine IL-10 u serumu, što je pokazano i u nekoliko prethodnih studija. Nije pokazana pozitivna ili negativna korelacija količine virusa u cirkulaciji s ostalim kliničko-laboratorijskim ili imunološkim parametrima.

7. LITERATURA

1. Schmaljohn C, Hjelle B (1997) Hantaviruses: a global disease problem. Emerg Infect Dis 3: 95-104.

2. Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O (2010) A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. Clin Microbiol Rev 23: 412-441.

3. Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, Sironen T, Henttonen H, Mäkelä S, Mustonen J (2013) Uncovering the mysteries of hantavirus infections. Nat Rev Microbiol 11: 539-550.

4. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A (2003) Hantavirus infections in Europe. Lancet Infect Dis 3: 653-661.

5. Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, Vapalahti O (2013) Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. Rev Med Virol 23: 35-49.

6. Markotić A, Schmaljohn C (2008) Immunoreactions to hantaviruses. U: Georgiev V St (ed.) National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH Volume 1: Frontiers in Research. New York, Humana Press, 435-444

7. Lähdevirta J (1982) Clinical features of HFRS in Scandinavia as compared with East Asia. Scand J Infect Dis Suppl 36: 93-95.

8. Cosgriff TM (1991) Mechanisms of disease in Hantavirus infection: pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. Rev Infect Dis 13: 97-107.

9. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS, Nolte KB, Foucar K, Feddersen RM, Zumwalt RE, Miller GL, Khan AS, et al (1995) Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. Am J Pathol 146: 552-579.

10. Groen J, Bruijn JA, Gerding MN, Jordans JG, Moll van Charante AW, Osterhaus AD (1996) Hantavirus antigen detection in kidney biopsies from patients with nephropathia epidemica. Clin Nephrol 46: 379-383.

11. Green W, Feddersen R, Yousef O, Behr M, Smith K, Nestler J, Jenison S, Yamada T, Hjelle B (1998) Tissue distribution of hantavirus antigen in naturally infected humans and deer mice. J Infect Dis 177: 1696-1700.

12. Kanerva M, Mustonen J, Vaheri A (1998) Pathogenesis of puumala and other hantavirus infections. Rev Med Virol 8: 67-86.

13. Yanagihara R, Silverman DJ (1990) Experimental infection of human vascular endothelial cells by pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. Arch Virol 111: 281-286.

14. Pensiero MN, Sharefkin JB, Dieffenbach CW, Hay J (1992) Hantaan virus infection of human endothelial cells. J Virol 66: 5929-5936.

15. Temonen M, Vapalahti O, Holthöfer H, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Lankinen H (1993) Susceptibility of human cells to Puumala virus infection. J Gen Virol 74: 515-518.

16. Sundstrom JB, McMullan LK, Spiropoulou CF, Hooper WC, Ansari AA, Peters CJ, Rollin PE (2001) Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells. J Virol 75: 6070-6085.

17. Geimonen E, Neff S, Raymond T, Kocer SS, Gavrilovskaya IN, Mackow ER (2002) Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses. Proc Natl Acad Sci USA 99: 13837-13842.

18. Markotić A, Hensley L, Daddario K, Spik K, Anderson K, Schmaljohn C (2007) Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells. Coll Antropol 31: 1159-1167.

19. Gavrilovskaya IN, Gorbunova EE, Mackow NA, Mackow ER (2008) Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. J Virol 82: 5797-5806.

20. Linderholm M, Ahlm C, Settergren B, Waage A, Tärnvik A (1996) Elevated plasma levels
of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. J Infect Dis 173: 38-43.

21. Temonen M, Mustonen J, Helin H, Pasternack A, Vaheri A, Holthöfer H (1996) Cytokines, adhesion molecules, and cellular infiltration in nephropathia epidemica kidneys: an immunohistochemical study. Clin Immunol Immunopathol 78: 47-55.

22. Sadeghi M, Eckerle I, Daniel V, Burkhardt U, Opelz G, Schnitzler P (2011) Cytokine expression during early and late phase of acute Puumala hantavirus infection. BMC Immunol 12: 65.

23. Wang PZ, Li ZD, Yu HT, Zhang Y, Wang W, Jiang W, Bai XF (2012) Elevated serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome. J Int Med Res 40: 648-56.

24. Mackow ER, Gavrilovskaya IN (2009) Hantavirus regulation of endothelial cell functions. Thromb Haemost 102: 1030-1041.

25. Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Otteson E, Miyazato A, Maciejewski J, St Jeor S (2004) Regulation of cellular gene expression in endothelial cells by sin nombre and prospect hill viruses. Viral Immunol 17: 234-251.

26. Kraus AA, Raftery MJ, Giese T, Ulrich R, Zawatzky R, Hippenstiel S, Suttorp N, Krüger DH, Schönrich G (2004) Differential antiviral response of endothelial cells after infection with pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. J Virol 78: 6143-6150.

27. Alff PJ, Gavrilovskaya IN, Gorbunova E, Endriss K, Chong Y, Geimonen E, Sen N, Reich NC, Mackow ER (2006) The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK-1-directed interferon responses. J Virol 80: 9676-9686.

28. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012 Release, http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp

29. Witkowski PT, Klempa B, Ithete NL, Auste B, Mfune JK, Hoveka J, Matthee S, Preiser W, Kruger DH (2014) Hantaviruses in Africa. Virus Res Jan 7. pii: S0168-1702(13)00485-1.

30. Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, LeDuc JW, Lee HW, von Bonsdorff CH, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Tsai TF, Regnery HL, et al (1985) Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. Science 227: 1041-1044.

31. Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A (1996) Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. J Gen Virol 77 (Pt 11): 2677-2687.

32. Jonsson CB, Schmaljohn CS (2001) Replication of hantaviruses. Curr Top Microbiol Immunol 256: 15-32.

33. Hussein IT, Haseeb A, Haque A, Mir MA (2011) Recent advances in hantavirus molecular biology and disease. Adv Appl Microbiol 74: 35-75.

34. Plyusnin A (2002) Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. Arch Virol 147: 665-682.

35. Jonsson CB, Milligan BG, Arterburn JB (2005) Potential importance of error catastrophe to the development of antiviral strategies for hantaviruses. Virus Res 107: 195-205.

36. Jääskeläinen KM, Kaukinen P, Minskaya ES, Plyusnina A, Vapalahti O, Elliott RM, Weber F, Vaheri A, Plyusnin A (2007) Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional

and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. J Med Virol 79: 1527-1536.

37. Rönnberg T, Jääskeläinen K, Blot G, Parviainen V, Vaheri A, Renkonen R, Bouloy M, Plyusnin A (2012) Searching for cellular partners of hantaviral nonstructural protein NSs: Y2H screening of mouse cDNA library and analysis of cellular interactome. PLoS One 7 (4): e34307.

38. Battisti AJ, Chu YK, Chipman PR, Kaufmann B, Jonsson CB, Rossmann MG (2011) Structural studies of Hantaan virus. J Virol 85: 835-841.

39. Hepojoki J, Strandin T, Lankinen H, Vaheri A (2012) Hantavirus structure-molecular interactions behind the scene. J Gen Virol 93 (Pt 8): 1631-1644.

40. Plyusnin A, Morzunov SP (2001) Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. Curr Top Microbiol Immunol 256: 47-75.

41. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Barrière P, Koivogui L, ter Meulen J, Krüger DH (2007) Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. Emerg Infect Dis 13: 520-522.

42. Arai S, Song JW, Sumibcay L, Bennett SN, Nerurkar VR, Parmenter C, Cook JA, Yates TL, Yanagihara R (2007) Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. Emerg Infect Dis 13: 1420-1423.

43. Song JW, Kang HJ, Song KJ, Truong TT, Bennett SN, Arai S, Truong NU, Yanagihara R (2007) Newfound hantavirus in Chinese mole shrew, Vietnam. Emerg Infect Dis 13: 1784-1787.

44. Song JW, Gu SH, Bennett SN, Arai S, Puorger M, Hilbe M, Yanagihara R (2007) Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (Sorex araneus). Virol J 4: 114.

45. Arai S, Ohdachi SD, Asakawa M, Kang HJ, Mocz G, Arikawa J, Okabe N, Yanagihara R (2008) Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (Urotrichus talpoides). Proc Natl Acad Sci USA 105: 16296-16301.

46. Kang HJ, Bennett SN, Sumibcay L, Arai S, Hope AG, Mocz G, Song JW, Cook JA, Yanagihara R (2009) Evolutionary insights from a genetically divergent hantavirus harbored by the European common mole (Talpa europaea). PLoS One 4 (7): e6149.

47. Kang HJ, Bennett SN, Dizney L, Sumibcay L, Arai S, Ruedas LA, Song JW, Yanagihara R (2009) Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the American shrew mole (Neurotrichus gibbsii). Virology 388: 8-14. Erratum in: Virology (2009) 391: 148.

48. Guo WP, Lin XD, Wang W, Tian JH, Cong ML, Zhang HL, Wang MR, Zhou RH, Wang JB, Li MH, Xu J, Holmes EC, Zhang YZ (2013) Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. PLoS Pathog 9 (2): e1003159.

49. Weiss S, Witkowski PT, Auste B, Nowak K, Weber N, Fahr J, Mombouli JV, Wolfe ND, Drexler JF, Drosten C, Klempa B, Leendertz FH, Kruger DH (2012) Hantavirus in bat, Sierra Leone. Emerg Infect Dis 18: 159-161.

50. Sumibcay L, Kadjo B, Gu SH, Kang HJ, Lim BK, Cook JA, Song JW, Yanagihara R (2012) Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (Neoromicia nanus) in Côte d'Ivoire. Virol J 9: 34.

51. de Araujo J, Thomazelli LM, Henriques DA, Lautenschalager D, Ometto T, Dutra LM, Aires CC, Favorito S, Durigon EL (2012) Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. BMC Res Notes 5: 690.

52. Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K (2013) Novel bat-borne hantavirus, Vietnam. Emerg Infect Dis 19: 1159-1161.

53. Lin XD, Wang W, Guo WP, Zhang XH, Xing JG, Chen SZ, Li MH, Chen Y, Xu J, Plyusnin A, Zhang YZ (2012) Cross-species transmission in the speciation of the currently known murinae-associated hantaviruses. J Virol 86: 11171-11182.

54. Ramsden C, Holmes EC, Charleston MA (2009) Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. Mol Biol Evol 26: 143-153.

55. Klempa B, Radosa L, Kruger DH (2013) The broad spectrum of hantaviruses and their hosts in Central Europe. Acta Virol 57: 130-137.

56. Reusken C, Heyman P (2013) Factors driving hantavirus emergence in Europe. Curr Opin Virol 3: 92-99.

57. Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD (1998) Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. Virology 241: 323-330.

58. Clement J, McKenna P, Avsic-Zupanc T, Skinner CR (1994) Rat-transmitted hantavirus disease in Sarajevo. Lancet 344: 131.

59. Markotić A, Sarcević A, Hlaca D, Barac V, LeDuc JW (1995) Rats and hantavirus disease. Nat Med 1: 977.

60. Jameson LJ, Logue CH, Atkinson B, Baker N, Galbraith SE, Carroll MW, Brooks T, Hewson R (2013) The continued emergence of hantaviruses: isolation of a Seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012. Euro Surveill 18: 4-7.

61. Jameson LJ, Taori SK, Atkinson B, Levick P, Featherstone CA, van der Burgt G, McCarthy N, Hart J, Osborne JC, Walsh AL, Brooks TJ, Hewson R (2013) Pet rats as a source of hantavirus in England and Wales, 2013. Euro Surveill 18 (9). pii: 20415.

62. Macé G, Feyeux C, Mollard N, Chantegret C, Audia S, Rebibou JM, Spagnolo G, Bour JB, Denoyel GA, Sagot P, Reynes JM (2013) Severe Seoul hantavirus infection in a pregnant woman, France, October 2012. Euro Surveill 18: 20464.

63. Klempa B, Avsic-Zupanc T, Clement J, Dzagurova TK, Henttonen H, Heyman P, Jakab F, Kruger DH, Maes P, Papa A, Tkachenko EA, Ulrich RG, Vapalahti O, Vaheri A (2013) Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: definition of genotypes and their characteristics. Arch Virol 158: 521-529.

64. Kallio ER, Begon M, Henttonen H, Koskela E, Mappes T, Vaheri A, Vapalahti O (2009) Cyclic hantavirus epidemics in humans--predicted by rodent host dynamics. Epidemics 1: 101-107.

65. Tersago K, Verhagen R, Servais A, Heyman P, Ducoffre G, Leirs H (2009) Hantavirus disease (nephropathia epidemica) in Belgium: effects of tree seed production and climate. Epidemiol Infect 137: 250-256.

66. Clement J, Vercauteren J, Verstraeten WW, Ducoffre G, Barrios JM, Vandamme AM, Maes P, Van Ranst M (2009) Relating increasing hantavirus incidences to the changing climate: the mast connection. Int J Health Geogr 8: 1.

67. Heyman P, Thoma BR, Marié JL, Cochez C, Essbauer SS (2012) In Search for Factors that Drive Hantavirus Epidemics. Front Physiol 3: 237.

68. Meyer BJ, Schmaljohn CS (2000) Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. Trends Microbiol 8: 61-67.

69. Krüger DH, Schönrich G, Klempa B (2011) Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection. Hum Vaccin 7: 685-693.

70. Avsic-Zupanc T, Petrovec M, Furlan P, Kaps R, Elgh F, Lundkvist A (1999). Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia-a 10-year survey. Clin Infect Dis 2: 860-865.

71. Markotić A, Nichol ST, Kuzman I, Sanchez AJ, Ksiazek TG, Gagro A, Rabatić S, Zgorelec R, Avsic-Zupanc T, Beus I, Dekaris D (2002) Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. J Med Virol 66: 542-551.

72. Klempa B, Tkachenko EA, Dzagurova TK, Yunicheva YV, Morozov VG, Okulova NM, Slyusareva GP, Smirnov A, Kruger DH (2008) Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. Emerg Infect Dis 14: 617-625.

73. Schütt M, Gerke P, Meisel H, Ulrich R, Krüger DH (2001) Clinical characterization of Dobrava hantavirus infections in Germany. Clin Nephrol 55: 371-374.

74. Golovljova I, Vasilenko V, Mittzenkov V, Prükk T, Seppet E, Vene S, Settergren B, Plyusnin A, Lundkvist A (2007) Characterization of hemorrhagic fever with renal syndrome caused by hantaviruses, Estonia. Emerg Infect Dis 13: 1773-1776.

75. Terajima M, Hendershot JD 3rd, Kariwa H, Koster FT, Hjelle B, Goade D, DeFronzo MC, Ennis FA (1999) High levels of viremia in patients with the Hantavirus pulmonary syndrome. J Infect Dis 180: 2030-2034.

76. Xiao R, Yang S, Koster F, Ye C, Stidley C, Hjelle B (2006) Sin Nombre viral RNA load in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. J Infect Dis 194: 1403-1409.

77. Evander M, Eriksson I, Pettersson L, Juto P, Ahlm C, Olsson GE, Bucht G, Allard A (2007) Puumala hantavirus viremia diagnosed by real-time reverse transcriptase PCR using samples from patients with hemorrhagic fever and renal syndrome. J Clin Microbiol 45: 2491-2497.

78. Saksida A, Duh D, Korva M, Avsic-Zupanc T (2008) Dobrava virus RNA load in patients who have hemorrhagic fever with renal syndrome. J Infect Dis 197: 681-685.

79. Yi J, Xu Z, Zhuang R, Wang J, Zhang Y, Ma Y, Liu B, Zhang Y, Zhang C, Yan G, Zhang F, Xu Z, Yang A, Jin B (2013) Hantaan virus RNA load in patients having hemorrhagic fever with renal syndrome: correlation with disease severity. J Infect Dis 207: 1457-1461.

80. Korva M, Saksida A, Kejžar N, Schmaljohn C, Avšič-Županc T (2013) Viral load and immune response dynamics in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome. Clin Microbiol Infect 19: E358-366.

81. Pettersson L, Thunberg T, Rocklöv J, Klingström J, Evander M, Ahlm C (2014) Viral load and humoral immune response in association with disease severity in Puumala hantavirus-infected patients-implications for treatment. Clin Microbiol Infect 20: 235-241.

82. Mustonen J, Partanen J, Kanerva M, Pietilä K, Vapalahti O, Pasternack A, Vaheri A (1996) Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. Kidney Int 49: 217-221.

83. Wang ML, Lai JH, Zhu Y, Zhang HB, Li C, Wang JP, Li YM, Yang AG, Jin BQ (2009) Genetic susceptibility to haemorrhagic fever with renal syndrome caused by Hantaan virus in Chinese Han population. Int J Immunogenet 36: 227-229.

84. Korva M, Saksida A, Kunilo S, Vidan Jeras B, Avsic-Zupanc T (2011) HLA-associated hemorrhagic fever with renal syndrome disease progression in slovenian patients. Clin Vaccine Immunol 18: 1435-1440.

85. Mäkelä S, Hurme M, Ala-Houhala I, Mustonen J, Koivisto AM, Partanen J, Vapalahti O, Vaheri A, Pasternack A (2001) Polymorphism of the cytokine genes in hospitalized patients with Puumala hantavirus infection. Nephrol Dial Transplant 16: 1368-1373.

86. Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY, Smith JI, Wu ZO, LeDuc JW, Zheng ZM, Meegan JM, Wang QN, et al (1991) Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. J Infect Dis 164: 1119-1127.

87. Rusnak JM, Byrne WR, Chung KN, Gibbs PH, Kim TT, Boudreau EF, Cosgriff T, Pittman P, Kim KY, Erlichman MS, Rezvani DF, Huggins JW (2009) Experience with intravenous ribavirin in the treatment of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. Antiviral Res 81: 68-76. Erratum in: Antiviral Res. 2009;83: 99-100.

88. Schmaljohn C (2009) Vaccines for hantaviruses. Vaccine 27: D61-64.

89. Schmaljohn CS, Spik KW, Hooper JW (2013) DNA vaccines for HFRS: Laboratory and clinical studies. Virus Res Dec 24. pii: S0168-1702(13)00449-8.

90. Mustonen J, Mäkelä S, Outinen T, Laine O, Jylhävä J, Arstila PT, Hurme M, Vaheri A (2013) The pathogenesis of nephropathia epidemica: new knowledge and unanswered questions. Antiviral Res 100: 589-604.

91. Valbuena G, Walker DH (2006) The endothelium as a target for infections. Annu Rev Pathol 1: 171-198.

92. Klingström J, Ahlm C (2011) Hantavirus protein interactions regulate cellular functions and signaling responses. Expert Rev Anti Infect Ther 9: 33-47.

93. Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH, Mackow ER (1998) beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. Proc Natl Acad Sci USA 95: 7074-7079.

94. Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH, Mackow ER (1999) Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. J Virol 73: 3951-3959.

95. Gavrilovskaya IN, Gorbunova EE, Mackow ER (2010) Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells. J Virol 84: 4832-4839.

96. Schönrich G, Rang A, Lütteke N, Raftery MJ, Charbonnel N, Ulrich RG (2008) Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. Immunol Rev 225: 163-189.

97. Rang A (2010) Modulation of innate immune responses by hantaviruses. Crit Rev Immunol 30: 515-527.

98. Krakauer T, Leduc JW, Morrill JC, Anderson AO, Krakauer H (1994) Serum levels of alpha and gamma interferons in hemorrhagic fever with renal syndrome. Viral Immunol 7: 97-101.

99. Krakauer T, Leduc JW, Krakauer H (1995) Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interleukin-6 in hemorrhagic fever with renal syndrome. Viral Immunol 8: 75-79.

100. Mori M, Rothman AL, Kurane I, Montoya JM, Nolte KB, Norman JE, Waite DC, Koster FT, Ennis FA (1999) High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. J Infect Dis 179: 295-302.

101. Takala A, Lähdevirta J, Jansson SE, Vapalahti O, Orpana A, Karonen SL, Repo H (2000) Systemic inflammation in hemorrhagic fever with renal syndrome correlates with hypotension and thrombocytopenia but not with renal injury. J Infect Dis 181: 1964-1970.

102. Borges AA, Campos GM, Moreli ML, Moro Souza RL, Saggioro FP, Figueiredo GG, Livonesi MC, Moraes Figueiredo LT (2008) Role of mixed Th1 and Th2 serum cytokines on pathogenesis and prognosis of hantavirus pulmonary syndrome. Microbes Infect 10: 1150-1157.

103. Outinen TK, Mäkelä SM, Ala-Houhala IO, Huhtala HS, Hurme M, Paakkala AS, Pörsti IH, Syrjänen JT, Mustonen JT (2010) The severity of Puumala hantavirus induced nephropathia epidemica can be better evaluated using plasma interleukin-6 than C-reactive protein determinations. BMC Infect Dis 10: 132.

104. Saksida A, Wraber B, Avšič-Županc T (2011) Serum levels of inflammatory and regulatory cytokines in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. BMC Infect Dis 11: 142.

105. Kilpatrick ED, Terajima M, Koster FT, Catalina MD, Cruz J, Ennis FA (2004) Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome. J Immunol 172: 3297-3304.

106. Terajima M, Hayasaka D, Maeda K, Ennis FA (2007) Immunopathogenesis of hantavirus pulmonary syndrome and hemorrhagic fever with renal syndrome: Do CD8+ T cells trigger capillary leakage in viral hemorrhagic fevers? Immunol Lett 113: 117-120.

107. Klingström J, Hardestam J, Stoltz M, Zuber B, Lundkvist A, Linder S, Ahlm C (2006) Loss of cell membrane integrity in puumala hantavirus-infected patients correlates with levels of epithelial cell apoptosis and perforin. J Virol 80: 8279-8282.

108. Terajima M, Vapalahti O, Van Epps HL, Vaheri A, Ennis FA (2004) Immune responses to Puumala virus infection and the pathogenesis of nephropathia epidemica. Microbes Infect 6: 238-245.

109. Gupta S, Braun M, Tischler ND, Stoltz M, Sundström KB, Björkström NK, Ljunggren HG, Klingström J (2013) Hantavirus-infection confers resistance to cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. PLoS Pathog 9 (3): e1003272.

110. Spiropoulou CF, Albariño CG, Ksiazek TG, Rollin PE (2007) Andes and Prospect Hill hantaviruses differ in early induction of interferon although both can downregulate interferon signaling. J Virol 81: 2769-2776.

111. Alff PJ, Sen N, Gorbunova E, Gavrilovskaya IN, Mackow ER (2008) The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. J Virol 82: 9115-9122.

112. Handke W, Oelschlegel R, Franke R, Krüger DH, Rang A (2009) Hantaan virus triggers TLR3-dependent innate immune responses. J Immunol 182: 2849-2858.

113. Stoltz M, Ahlm C, Lundkvist A, Klingström J (2007) Lambda interferon (IFN-lambda) in serum is decreased in hantavirus-infected patients, and in vitro-established infection is

insensitive to treatment with all IFNs and inhibits IFN-gamma-induced nitric oxide production. J Virol 81: 8685-8691.

114. Handke W, Oelschlegel R, Franke R, Wiedemann L, Krüger DH, Rang A (2010) Generation and characterization of genetic reassortants between Puumala and Prospect Hill hantavirus in vitro. J Gen Virol 91: 2351-2359.

115. Kim IW, Hwang JY, Kim SK, Kim JK, Park HS (2007) Interferon-stimulated genes response in endothelial cells following Hantaan virus infection. J Korean Med Sci 22: 987-992.

116. Temonen M, Lankinen H, Vapalahti O, Ronni T, Julkunen I, Vaheri A (1995) Effect of interferon-alpha and cell differentiation on Puumala virus infection in human monocyte/macrophages. Virology 206: 8-15.

117. Oelschlegel R, Krüger DH, Rang A (2007) MxA-independent inhibition of Hantaan virus replication induced by type I and type II interferon in vitro. Virus Res 127: 100-105.

118. Nolte KB, Feddersen RM, Foucar K, Zaki SR, Koster FT, Madar D, Merlin TL, McFeeley PJ, Umland ET, Zumwalt RE (1995) Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. Hum Pathol 26: 110-120.

119. Nagai T, Tanishita O, Takahashi Y, Yamanouchi T, Domae K, Kondo K, Dantas JR Jr, Takahashi M, Yamanishi K (1985) Isolation of haemorrhagic fever with renal syndrome virus from leukocytes of rats and virus replication in cultures of rat and human macrophages. J Gen Virol 66 (Pt 6): 1271-1278.

120. Cebalo L, Markotić A (2007) Chemokine production predominates in human monocytes infected with Tula virus. Viral Immunol 20: 206-213.

121. Khaiboullina SF, Netski DM, Krumpe P, St Jeor SC (2000) Effects of tumor necrosis factor alpha on Sin Nombre virus infection in vitro. J Virol 74: 11966-11971.

122. Raftery MJ, Kraus AA, Ulrich R, Krüger DH, Schönrich G (2002) Hantavirus infection of dendritic cells. J Virol 76: 10724-10733.

123. Björkström NK, Lindgren T, Stoltz M, Fauriat C, Braun M, Evander M, Michaëlsson J, Malmberg KJ, Klingström J, Ahlm C, Ljunggren HG (2011) Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. J Exp Med 208: 13-21.

124. Vapalahti O, Lundkvist A, Vaheri A (2001) Human immune response, host genetics, and severity of disease. Curr Top Microbiol Immunol 256: 153-169.

125. Settergren B, Ahlm C, Juto P, Niklasson B (1991) Specific Puumala IgG virus half a century after haemorrhagic fever with renal syndrome. Lancet 338: 66.

126. Ye C, Prescott J, Nofchissey R, Goade D, Hjelle B (2004) Neutralizing antibodies and Sin Nombre virus RNA after recovery from hantavirus cardiopulmonary syndrome. Emerg Infect Dis 10: 478-482.

127. Valdivieso F, Vial P, Ferres M, Ye C, Goade D, Cuiza A, Hjelle B (2006) Neutralizing antibodies in survivors of Sin Nombre and Andes hantavirus infection. Emerg Infect Dis 12: 166-168.

128. Bharadwaj M, Nofchissey R, Goade D, Koster F, Hjelle B (2000) Humoral immune responses in the hantavirus cardiopulmonary syndrome. J Infect Dis 182: 43-48.

129. Kaukinen P, Vaheri A, Plyusnin A (2005) Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. Arch Virol 150: 1693-1713.

130. Tuuminen T, Kekäläinen E, Mäkelä S, Ala-Houhala I, Ennis FA, Hedman K, Mustonen J, Vaheri A, Arstila TP (2007) Human CD8+ T cell memory generation in Puumala hantavirus infection occurs after the acute phase and is associated with boosting of EBV-specific CD8+ memory T cells. J Immunol 179: 1988-1995.

131. Lindgren T, Ahlm C, Mohamed N, Evander M, Ljunggren HG, Björkström NK (2011) Longitudinal analysis of the human T cell response during acute hantavirus infection. J Virol 85: 10252-10260.

132. Sironen T, Klingström J, Vaheri A, Andersson LC, Lundkvist A, Plyusnin A (2008) Pathology of Puumala hantavirus infection in macaques. PLoS One 3 (8): e3035.

133. Chen LB, Yang WS (1990) Abnormalities of T cell immunoregulation in hemorrhagic fever with renal syndrome. J Infect Dis 161: 1016-1019.

134. Van Epps HL, Terajima M, Mustonen J, Arstila TP, Corey EA, Vaheri A, Ennis FA (2002) Long-lived memory T lymphocyte responses after hantavirus infection. J Exp Med 196: 579-588.

135. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. Nature 466: 835-840.

136. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. Nat Cell Biol 7: 719-723.

137. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N (2005) Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet 37: 495-500.

138. Rajewsky N (2006) microRNA target predictions in animals. Nat Genet 38: 8-13.

139. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol 12: 735–739.

140. Ardekani AM, Naeini MM (2010) The Role of MicroRNAs in Human Diseases. Avicenna J Med Biotechnol 2: 161-179.

141. Lindsay MA (2008) microRNAs and the immune response. Trends Immunol 29: 343-351.

142. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. Science 309: 1577-1581.

143. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, Voinnet O (2005) A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. Science 308: 557-560.

144. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M (2007) Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. Nature 449: 919-922.

145. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science 303: 83-86.

146. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell 129: 1401-1414.

147. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE (2011) MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 11: 163-175.

148. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci USA 103: 12481-12486.

149. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA (2008) Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. J Immunol 180: 5689-5698.

150. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, Das PP, Miska EA, Rodriguez A, Bradley A, Smith KG, Rada C, Enright AJ, Toellner KM, Maclennan IC, Turner M (2007) microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. Immunity 27: 847-859.

151. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A, Frendewey D, Valenzuela D, Kutok JL, Schmidt-Supprian M, Rajewsky N, Yancopoulos G, Rao A, Rajewsky K (2007) Regulation of the germinal center response by microRNA-155. Science 316: 604-608.

152. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. Science 316: 608-611.

153. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. Proc Natl Acad Sci USA 104: 1604-1609.

154. Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I (2005) A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. Cell 123: 819-831.

155. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD (2008) Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. Nature 451: 1125-1129.

156. Gottwein E, Cullen BR (2008) Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. Cell Host Microbe 3: 375-387.

157. Skalsky RL, Cullen BR (2010) Viruses, microRNAs, and host interactions. Annu Rev Microbiol 64: 123-141.

158. Cullen BR (2013) MicroRNAs as mediators of viral evasion of the immune system. Nat Immunol 14: 205-210.

159. Pepini T, Gorbunova EE, Gavrilovskaya IN, Mackow JE, Mackow ER (2010) Andes virus regulation of cellular microRNAs contributes to hantavirus-induced endothelial cell permeability. J Virol 84: 11929-11936.

160. Shin OS, Kumar M, Yanagihara R, Song JW (2013) Hantaviruses induce cell type- and viral species-specific host microRNA expression signatures. Virology 446: 217-224.

161. Kuzman I, Markotić A (2002) Velika epidemija hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom (HVBS) u Hrvatskoj (prvo priopćenje). Infektol Glasn 22: 77-79.

162. Bowen MD, Gelbmann W, Ksiazek TG, Nichol ST, Nowotny N (1997) Puumala virus and two genetic variants of Tula virus are present in Austrian rodents. J Med Virol 53: 174-181.

163. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ (1993) Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science 262: 914-917.

164. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159.

165. Korva M, Duh D, Saksida A, Trilar T, Avsic-Zupanc T (2009) The hantaviral load in tissues of naturally infected rodents. Microbes Infect 11: 344-351.

166. Kuzman I, Puljiz I, Turcinov D, Markotić A, Turković B, Aleraj B, Andrić Z, Petković D, Tutek V, Herendić B, Iskra M, Pandak N, Misetić Z, Perić L, Jelaska D, Majetić-Sekovanić M, Ledina D, Misić-Majerus L, Radonić R (2003) The biggest epidemic of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. Acta Med Croatica 57: 337-346.

167. Settergren B, Juto P, Trollfors B, Wadell G, Norrby SR (1988) Hemorrhagic complications and other clinical findings in nephropathia epidemica in Sweden: a study of 355 serologically verified cases. J Infect Dis 157: 380-382.

168. Mustonen J, Brummer-Korvenkontio M, Hedman K, Pasternack A, Pietilä K, Vaheri A (1994) Nephropathia epidemica in Finland: a retrospective study of 126 cases. Scand J Infect Dis 26: 7-13.

169. Le Guenno B, Camprasse MA, Guilbaut JC, Lanoux P, Hoen B (1994) Hantavirus epidemic in Europe, 1993. Lancet 343: 114-115.

170. Hukić M, Valjevac A, Tulumovic D, Numanovic F, Heyman P (2011) Pathogenicity and virulence of the present hantaviruses in Bosnia and Herzegovina: the impact on renal function. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30: 381-385.

171. Marsac D, García S, Fournet A, Aguirre A, Pino K, Ferres M, Kalergis AM, Lopez-Lastra M, Veas F (2011) Infection of human monocyte-derived dendritic cells by ANDES Hantavirus enhances pro-inflammatory state, the secretion of active MMP-9 and indirectly enhances endothelial permeability. Virol J 8: 223.

172. Shin OS, Yanagihara R, Song JW (2012) Distinct innate immune responses in human macrophages and endothelial cells infected with shrew-borne hantaviruses. Virology 434: 43-49.

173. Klingström J, Lindgren T, Ahlm C. Sex-dependent differences in plasma cytokine responses to hantavirus infection (2008) Clin Vaccine Immunol 15: 885-887.

174. Kyriakidis I, Papa A (2013) Serum TNF-α, sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in hemorrhagic fever with renal syndrome. Virus Res 175: 91-94.

175. Markotić A, Dasić G, Gagro A, Sabioncello A, Rabatić S, Kuzman I, Zgorelec R, Smoljan I, Beus I, Zupanc TA, Dekaris D (1999) Role of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) phenotype changes in the pathogenesis of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). Clin Exp Immunol 115: 329-334.

176. Gu XS, You ZQ, Meng GR, Luo FJ, Yang SH, Yang SQ, Ma WH, He JR, Song ZB, Su QA, et al (1990) Hemorrhagic fever with renal syndrome. Separation of human peripheral blood T and B cells and detection of viral antigen. Chin Med J (Engl) 103: 25-28.

177. Katze MG, Fornek JL, Palermo RE, Walters KA, Korth MJ (2008) Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics. Nat Rev Immunol 8: 644-654.

178. Prescott JB, Hall PR, Bondu-Hawkins VS, Ye C, Hjelle B (2007) Early innate immune responses to Sin Nombre hantavirus occur independently of IFN regulatory factor 3, characterized pattern recognition receptors, and viral entry. J Immunol 179: 1796-1802.

179. Takeuchi O, Akira S (2009) Innate immunity to virus infection. Immunol Rev 227: 75-86.

180. Pavlovic J, Zürcher T, Haller O, Staeheli P (1990) Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. J Virol 64: 3370-3375.

181. Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Simon-Jödicke A, Pavlovic J, Horisberger MA, ter Meulen V (1993) MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. J Virol 67: 4760-4768.

182. Frese M, Kochs G, Feldmann H, Hertkorn C, Haller O (1996) Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. J Virol 70: 915-923.

183. Kochs G, Janzen C, Hohenberg H, Haller O (2002) Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. Proc Natl Acad Sci USA 99: 3153-3158.

184. Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Deyde VM, St Jeor SC (2005) Andes virus stimulates interferon-inducible MxA protein expression in endothelial cells. J Med Virol 75: 267-275.

185. Prescott J, Ye C, Sen G, Hjelle B (2005) Induction of innate immune response genes by Sin Nombre hantavirus does not require viral replication. J Virol 79: 15007-15015.

186. Ronni T, Melén K, Malygin A, Julkunen I (1993) Control of IFN-inducible MxA gene expression in human cells. J Immunol 150: 1715-1726.

187. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD (2002) IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. J Immunol 168: 3195–3204.

188. Zhang Y, Liu B, Ma Y, Zhang C, Yi J, Xu Z, Zhang Y, Zhuang R, Jin B (2013) HTNV-induced high expression of CXCL10 is mediated through the activation of TLR3, RIG-I and MDA5 pathways. U: International Society for Hantavirus (ed.) IX International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses Scientific Program and Abstracts, Beijing, China, 29-30.

189. Lee MH, Lalwani P, Raftery MJ, Matthaei M, Lütteke N, Kirsanovs S, Binder M, Ulrich RG, Giese T, Wolff T, Krüger DH, Schönrich G (2011) RNA helicase retinoic acid-inducible gene I as a sensor of Hantaan virus replication. J Gen Virol 92 (Pt 9): 2191-2200.

190. Liu JM, Zhu Y, Wang JP, Ouyang WM, Li Q, Zhuang R, Jin BQ (2004) [Changes and significance of TNF, sIL-2R, IL-6, IL-4 and IFN-gamma levels in plasma from the patients with hemorrhagic fever with renal syndrome]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 20: 744-746.

191. Laskin DL, Pendino KJ (1995) Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. Annu Rev Pharmacol Toxicol 35: 655-677.

192. Jiang H, Wang PZ, Zhang Y, Xu Z, Sun L, Wang LM, Huang CX, Lian JQ, Jia ZS, Li ZD, Bai XF (2008) Hantaan virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Virology 380: 52-59.

193. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Rothman AL, Ennis FA (1999) Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. J Med Virol 59: 329-334.

194. Duell BL, Tan CK, Carey AJ, Wu F, Cripps AW, Ulett GC (2012) Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 64: 295-313.

195. Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis SN (2004) Targeting CD40L: a promising therapeutic approach. Clin Diagn Lab Immunol 11: 635-641.

196. Lee TC, Lin YL, Liao JT, Su CM, Lin CC, Lin WP, Liao CL (2010) Utilizing liver-specific microRNA-122 to modulate replication of dengue virus replicon. Biochem Biophys Res Commun 396: 596-601.

197. Pham AM, Langlois RA, TenOever BR (2012) Replication in cells of hematopoietic origin is necessary for Dengue virus dissemination. PLoS Pathog 8 (1): e1002465.

198. Tolfvenstam T, Lindblom A, Schreiber MJ, Ling L, Chow A, Ooi EE, Hibberd ML (2011) Characterization of early host responses in adults with dengue disease. BMC Infect Dis 11: 209.

199. Qi Y, Li Y, Zhang L, Huang J (2013) microRNA expression profiling and bioinformatic analysis of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cells. Mol Med Rep 7: 791-798.

200. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K (2011) MicroRNAs and epigenetics. FEBS J 278: 1598-1609.

201. Luers AJ, Loudig OD, Berman JW (2010) MicroRNAs are expressed and processed by human primary macrophages. Cell Immunol 263: 1-8.

202. Merkerova M, Belickova M, Bruchova H (2008) Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. Eur J Haematol 81: 304-310.

203. Brummer-Korvenkontio M, Vapalahti O, Henttonen H, Koskela P, Kuusisto P, Vaheri A (1999) Epidemiological study of nephropathia epidemica in Finland 1989-96. Scand J Infect Dis 31: 427-435.

204. Saksida A (2008) The role of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of Bunyavirus hemorrhagic fevers. Doctoral thesis, Medical school, Univesity of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

205. MacNeil A, Comer JA, Ksiazek TG, Rollin PE (2010) Sin Nombre virus-specific immunoglobulin M and G kinetics in hantavirus pulmonary syndrome and the role played by serologic responses in predicting disease outcome. J Infect Dis 202: 242-246.

8. PRILOZI

Prilog 1. Popis kratica

AMRV/SOOV	virus Amur/Soochong
ANDV	virus Andes
BCCV	virus Black Creek Chanal
cDNA	od engl. complementary DNA, komplementarna DNA
CTL/CD8+	od engl. cytotoxic T lymphocytes, citotoksični T-limfociti
CV	od engl. coefficient of variation, koeficijent varijacije
CXCL10	od engl. C-X-C motif chemokine 10, kemokinski ligand 10
DENV	virus dengue
DNA	od engl. deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleinska kiselina
DOBV	virus Dobrava
ELISA	od engl. enzyme-linked immunosorbent assay, enzimski imunotest na čvrstoj fazi
HLA	od engl. human leukocyte antigen, humani leukocitni antigeni
HPS	hantavirusni plućni sindrom
HTNV	virus Hantaan
HVBS	hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom
ICTV	od engl. International Committee on Taxonomy of Viruses, Međunarodni odbor za taksonomiju virusa
IgG	imunoglobulini klase G
IgM	imunoglobulini klase M
IL-10	od engl. interleukin 10, interleukin 10
IP-10	od engl. interferon gamma-induced protein 10, interferonom gama stimulirani protein 10
IPA	od engl. Ingenuity Pathways Analysis
ISG	od engl. interferon-stimulated genes, geni stimulirani interferonom
K3EDTA	antikoagulans
KHAV	virus Khabarovsk
LDH	laktat dehidrogenaza
MARS	od engl. Multivariate Adaptive Regression Splines
MHC	od engl. major histocompatibility complex, glavni sustav histokompatibilnosti
miRNA	od engl. micro RNA, mikro RNA
mRNA	od engl. messenger RNA, glasnička RNA
NE	nephropathia epidemica
NFκB	od engl. nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells, nuklearni faktor kapa B
NK	od engl. natural killer cell, prirodnoubilačke stanice
NS	od engl. non-structural protein, nestrukturni protein
NYV	visus New York
ORF	od engl. open reading frame, otvoreni okvir čitanja

PAMP	od engl. pathogen-associated molecular pattern, molekularni obrasci vezani za mikroorganizme
PBS	od engl. phosphate buffered saline, fosfatni pufer
PCR	od engl. polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom
PHV	virus Prospect Hill
PRR	od engl. pattern recognition receptor, receptori za prepoznavanje obrazaca
PUUV	virus Puumala
qPCR	od engl. quantitative real-time PCR, kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
RdRp	od engl. RNA-dependent RNA polymerase, RNA-ovisna RNA polimeraza
RISC	od engl. RNA-induced silencing complex
RNA	od engl. ribonucleic acid, ribonukleinska kiselina
RT-PCR	od engl. reverse transcription polymerase chain reaction, reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom
SAAV	virus Saaremaa
SANGV	virus Sangassou
sCD40L	od engl. solubile CD40 ligand, solubilni CD40 ligand
SDS-PAGE	od engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, natrij-dodecilsulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
SEOV	virus Seoul
SNV	virus Sin Nombre
Th/CD4+	od engl. helper T lymphocytes, pomoćnički T-limfociti
TOPV	virus Topografov
TPMV	virusa Thottapalayam
TULV	virus Tula
VEGF	od engl. vascular endothelial growth factor, vaskularni endotelni faktor rasta

Prilog 2A. Tablica za procjenu težine bolesti u bolesnika s hemoragijskom vrućicom s bubrežnim sindromom (ref. 161)

1. ŠOK, HIPOTENZIJA*		**BODOVI**
Šok (nemjerljiv tlak)		10
Hipotenzija, sistolički tlak <90 mm Hg		5
Tahikardija, puls >120/min		2
2. KRVARENJE*		
Obilno, potrebna transfuzija		5
Unutarnje (melena, hematemeza, hemoptoa, intrakranijsko)		3
Epistaksa		2
Na koži (petehije) i sluznicama (subkonjunktivalno, enantem)		1
3. OPĆI SIMPTOMI		
Temperatura >40 ^{o}C		2
Epileptički napad		2
Smetnje (zamućenje) vida		1
Izrazito jaki bolovi lumbalno		1
Povraćanje ili proljev		1
4. LABORATORIJSKI NALAZI		
BUN i/ili kreatinin	>5 puta veći od normale	5
	>4 puta veći od normale	4
	>3 puta veći od normale	3
	>2 puta veći od normale	2
Trombociti	<20x10^{9}/L	2
	<50 x10^{9}/L	1
AST/ALT	>5 puta veći od normale	2
	3 - 4 puta veći od normale	1
RTG pluća	pneumonitis	2
	pleuralni izljev	1
EKG	mioperikarditis	1

*****Iz skupine 1. i 2. boduje se samo jedna značajka (ona s najviše bodova)

Prilog 2B. Stupnjevi težine bolesti u bolesnika s hemoragijskom vrućicom s bubrežnim sindromom (ref. 161)

Oblik (težina) bolesti		**Broj bodova**
I.	*Lak (blag)*	*≤ 7*
II.	*Srednje težak*	*8-14*
III.	*Težak*	*15-21*
IV.	*Vrlo težak*	*≥ 22*

Prilog 3. Popis gena testiranih na *real-time* PCR *array*-u

Pozicija	Simbol	Opis	Opis (od engl.)
A01	APCS	serumska amiloidna P komponenta	Amyloid P component, serum
A02	C3	komponenta komplementa 3	Complement component 3
A03	CASP1	kaspaza 1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
A04	CCL2	kemokinski ligand 2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A05	CCL5	kemokinski ligand 5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
A06	CCR4	kemokinski receptor 4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
A07	CCR5	kemokinski receptor 5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
A08	CCR6	kemokinski receptor 6	Chemokine (C-C motif) receptor 6
A09	CCR8	kemokinski receptor 8	Chemokine (C-C motif) receptor 8
A10	CD14	CD14 molekula	CD14 molecule
A11	CD4	CD4 molekula	CD4 molecule
A12	CD40	CD40 molekula	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
B01	CD40LG	CD40 ligand	CD40 ligand
B02	CD80	CD80 molekula	CD80 molecule
B03	CD86	CD86 molekula	CD86 molecule
B04	CD8A	CD8a molekula	CD8a molecule
B05	CRP	C-reaktivni protein	C-reactive protein, pentraxin-related
B06	CSF2	faktor stimulacije kolonija 2 (granulocita-makrofaga)	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
B07	CXCL10	kemokinski ligand 10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
B08	CXCR3	kemokinski receptor 3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
B09	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) "*box*" polipeptid 58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
B10	FASLG	Fas ligand	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
B11	FOXP3	transkripcijski faktor "*forkhead box*" P3	Forkhead box P3
B12	GATA3	GATA vezujući protein 3	GATA binding protein 3
C01	HLA-A	glavni sustav histokompatibilnosti, razred I, A	Major histocompatibility complex, class I, A
C02	HLA-E	glavni sustav histokompatibilnosti, razred I, E	Major histocompatibility complex, class I, E
C03	ICAM1	međustanična adhezijska molekula 1	Intercellular adhesion molecule 1
C04	IFNA1	interferon, alfa 1	Interferon, alpha 1
C05	IFNAR1	interferon (alfa, beta i omega) receptor 1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1
C06	IFNB1	interferon, beta 1	Interferon, beta 1, fibroblast

C07	IFNG	interferon, gama	Interferon, gamma
C08	IFNGR1	interferon gama receptor 1	Interferon gamma receptor 1
C09	IL10	interleukin 10	Interleukin 10
C10	IL13	interleukin 13	Interleukin 13
C11	IL17A	interleukin 17A	Interleukin 17A
C12	IL18	interleukin 18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
D01	IL1A	interleukin 1, alfa	Interleukin 1, alpha
D02	IL1B	interleukin 1, beta	Interleukin 1, beta
D03	IL1R1	interleukin 1 receptor, tip I	Interleukin 1 receptor, type I
D04	IL2	interleukin 2	Interleukin 2
D05	IL23A	interleukin 23, alfa podjedinica p19	Interleukin 23, alpha subunit p19
D06	IL4	interleukin 4	Interleukin 4
D07	IL5	interleukin 5	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
D08	IL6	interleukin 6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D09	IL8	interleukin 8	Interleukin 8
D10	IRAK1	IL-1-receptor pridružena kinaza 1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
D11	IRF3	regulatorni faktor interferona 3	Interferon regulatory factor 3
D12	IRF7	regulatorni faktor interferona 7	Interferon regulatory factor 7
E01	ITGAM	integrin, alfa M	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
E02	JAK2	Janus kinaza 2	Janus kinase 2
E03	LY96	limfocitni antigen 96	Lymphocyte antigen 96
E04	LYZ	lizozim	Lysozyme
E05	MAPK1	mitogenom aktivirana protein kinaza 1	Mitogen-activated protein kinase 1
E06	MAPK8	mitogenom aktivirana protein kinaza 8	Mitogen-activated protein kinase 8
E07	MBL2	lektin koji veže manozu 2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble
E08	MPO	mijeloperoksidaza	Myeloperoxidase
E09	MX1	interferonom inducirani Mx1 protein	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
E10	MYD88	gen primarnog odgovora mijeloidne diferencijacije (88)	Myeloid differentiation primary response gene (88)
E11	NFKB1	nuklearni faktor kapa B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
E12	NFKBIA	inhibitor nuklearnog faktora kapa B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

F01	NLRP3	gen koji kodira proteine porodice NLR	NLR family, pyrin domain containing 3
F02	NOD1	unutarstanični receptor koji sadrži oligomerizacijsku domenu 1 za vezanje nukleotida	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
F03	NOD2	unutarstanični receptor koji sadrži oligomerizacijsku domenu 2 za vezanje nukleotida	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
F04	RAG1	gen aktivacije rekombinacije 1	Recombination activating gene 1
F05	RORC	RAR-vezan receptor C	RAR-related orphan receptor C
F06	SLC11A1	membranski transportni protein iz obitelji *"solute carrier"* 11	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1
F07	STAT1	prijenosnik signala i aktivator transkripcije 1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
F08	STAT3	prijenosnik signala i aktivator transkripcije 3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
F09	STAT4	prijenosnik signala i aktivator transkripcije 4	Signal transducer and activator of transcription 4
F10	STAT6	prijenosnik signala i aktivator transkripcije 6	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced
F11	TBX21	protein "*T-box*" 21	T-box 21
F12	TICAM1	adaptorska molekula Toll-u sličnog receptora 1	Toll-like receptor adaptor molecule 1
G01	TLR1	Toll-u sličan receptor 1	Toll-like receptor 1
G02	TLR2	Toll-u sličan receptor 2	Toll-like receptor 2
G03	TLR3	Toll-u sličan receptor 3	Toll-like receptor 3
G04	TLR4	Toll-u sličan receptor 4	Toll-like receptor 4
G05	TLR5	Toll-u sličan receptor 5	Toll-like receptor 5
G06	TLR6	Toll-u sličan receptor 6	Toll-like receptor 6
G07	TLR7	Toll-u sličan receptor 7	Toll-like receptor 7
G08	TLR8	Toll-u sličan receptor 8	Toll-like receptor 8
G09	TLR9	Toll-u sličan receptor 9	Toll-like receptor 9
G10	TNF	faktor nekroze tumora	Tumor necrosis factor
G11	TRAF6	TNF-receptor pridružen čimbenik 6	TNF receptor-associated factor 6
G12	TYK2	tirozin kinaza 2	Tyrosine kinase 2
H01	ACTB	aktin, beta	Actin, beta
H02	B2M	beta-2-mikroglobulin	Beta-2-microglobulin
H03	GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	HPRT1	hipoksantin fosforiboziltransferaza 1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	RPLP0	ribosomski protein, veliki, P0	Ribosomal protein, large, P0

H06	HGDC	kontaminacija ljudskom genomskom DNA	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	kontrola reverzne transkripcije	Reverse Transcription Control
H08	RTC	kontrola reverzne transkripcije	Reverse Transcription Control
H09	RTC	kontrola reverzne transkripcije	Reverse Transcription Control
H10	PPC	pozitivna kontrola PCR-a	Positive PCR Control
H11	PPC	pozitivna kontrola PCR-a	Positive PCR Control
H12	PPC	pozitivna kontrola PCR-a	Positive PCR Control

9. ŽIVOTOPIS

Lidija Cvetko Krajinović je rođena 1976. godine u Zagrebu. Nakon završene prirodoslovno-matematičke gimnazije u Zagrebu, upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2001. godine na studiju biologije, smjer molekularna biologija, te stekla akademski stupanj - dipl. ing. biologije. Poslijediplomski znanstveni studij je upisala 2003. godine također na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu iz znanstvenog polja biologija, smjer molekularna i stanična biologija.

Znanstveni je novak u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu na znanstveno-istraživačkom projektu „Imunoreakcije na hantaviruse i leptospire“, voditeljice projekta: prof.dr.sc. Alemke Markotić, dr.med. U okviru projekta bavila se istraživanjima molekularne epidemiologije i evolucije hantavirusa u Hrvatskoj, a u posljednje vrijeme njezin rad je usmjeren na istraživanja imunopatogenetskih mehanizama induciranih infekcijom hantavirusima.

Tijekom 2003. godine bila je na stručnom usavršavanju na Haartman institutu Sveučilišta u Helsinkiju u Finskoj, a 2012. godine na Istituto Clinico Humanitas u Milanu u Italiji.

Objavila je 17 znanstvenih i stručnih radova, od kojih je devet citirano u CC/SCI bazi i koautor je dva poglavlja u knjizi. Tijekom svog rada aktivno je sudjelovala na brojnim međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima te je prezentirala svoj istraživački rad u obliku postera ili usmenih izlaganja. Održala je sedam pozvanih predavanja.

Za prisustvovanja na kongresima te za stručno usavršavanje u Finskoj dobila je nekoliko putnih nagrada (od Local Committee of the 6th International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses, Seoul, Južna Koreja, Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa R Hrvatske, Hrvatskog mikrobiološkog društva).

Sudjeluje u nastavi na Poslijediplomskim specijalističkim studijima infektologije i epidemiologije Sveučilišta u Zagrebu te na Diplomskom studiju forenzike Sveučilišta u Splitu.

Član je Hrvatskog društva za infektivne bolesti, Hrvatskog imunološkog društva, Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (ESCMID).

BIBLIOGRAFIJA

Znanstveni radovi u CC časopisima:

1. **Lidija Cvetko**, Alemka Markotić, Angelina Plyusnina, Josip Margaletić, Marica Miletić-Medved, Nenad Turk, Zoran Milas, Tatjana Avšič-Županc, Alexander Plyusnin. Puumala virus in Croatia in the 2002 HFRS outbreak. *Journal of Medical Virology. 2005;77(2):290-294.*

2. **Lidija Cvetko**, Nenad Turk, Alemka Markotić, Zoran Milas, Josip Margaletić, Marica Miletić-Medved, Alexander Plyusnin, Guy Baranton, Daniele Postic, Tatjana Avšič-Županc. Dual infections with *Puumala virus* and *Leptospira interrogans* serovar lora in a bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2006;74(4):612-614.*

3. Alemka Markotić, Višnja Škerk, **Lidija Cvetko Krajinović**, Antun Beus. Is the clinical picture of Schnitzler syndrome always Schnitzler syndrome? *Clinical and Experimental Rheumatology. 2009;27(3):507-509.*

4. Angelina Plyusnina, **Lidija Cvetko Krajinovic**, Josip Margaletic, Jukka Niemimaa, Kirill Nemirov, Åke Lundkvist, Alemka Markotic, Marica Miletic Medved, Tatjana Avšic Županc, Heikki Henttonen, Alexander Plyusnin. Genetic evidence for the presence of two distinct hantaviruses associated with *Apodemus* mice in Croatia and analysis of local strains. *Journal of Medical Virology. 2011;83(1):108-114.*

5. Ivan Puljiz, Alemka Markotić, **Lidija Cvetko Krajinović**, Marija Gužvinec, Ozren Polašek, Ilija Kuzman. Mycoplasma pneumoniae in adult community-acquired pneumonia increases matrix metalloproteinase-9 serum level and induces its gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Medical Science Monitor. 2012;18(8):500-505.*

6. **Lidija Cvetko Krajinović**, Silvija Šoprek, Miša Korva, Boris Dželalija, Oktavija Đaković Rode, Višnja Škerk, Tatjana Avšič-Županc, Alemka Markotić. Serum levels of metalloproteinases and their inhibitors during infection with pathogens having integrin receptor-mediated cellular entry. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2012;44(9):663-669.*

7. Ante Tadin, Linda Bjedov, Josip Margaletić, Branka Žibrat, **Lidija Cvetko Krajinović**, Petra Svoboda, Ivan-Christian Kurolt, Zrinka Štritof, Nenad Turk, Oktavija Đaković Rode, Rok Čivljak, Ilija Kuzman, Alemka Markotić. High infection rate of bank voles (Myodes glareolus) with Puumala virus is responsible for the winter outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome on Medvednica mountain in Croatia. *Epidemiology and Infection. 2014 (u tisku).*

8. Petra Svoboda, Gerhard Dobler, Alemka Markotić, Ivan-Christian Kurolt, Stephanie Speck, Josipa Habuš, Marko Vucelja, **Lidija Cvetko Krajinović**, Ante Tadin, Josip Margaletić, Sandra Essbauer. Survey for hantaviruses, tick-borne encephalitis virus and *Rickettsia* spp. in small rodents, Croatia. *Vector-Borne and Zoonotic Disease. 2014 (u tisku).*

9. Sébastien Jaillon, Federica Moalli, Bryndis Ragnarsdottir, Eduardo Bonavita, Federica Riva, Elisa Barbati, Manuela Nebuloni, **Lidija Cvetko Krajinovic**, Alemka Markotic, Sonia Valentino, Andrea Doni, Silvia Tartari, Giorgio Graziani, Alessandro Montanelli, Yves Delneste, Catharina Svanborg, Cecilia Garlanda, Alberto Mantovani. The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infection. *Immunity. 2014 (prihvaćeno za objavljivanje).*

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. Josip Margaletić, Alemka Markotić, Marica Miletić-Medved, **Lidija Cvetko**, Nenad Turk, Zoran Milas, Heikki Hentonnen, Ana Pavelić. Sitni glodavci kao rezervoari hantavirusa i leptospira na području zapadne Slavonije. *Glasnik za šumske pokuse. 2006; Posebno izdanje 5:387-393.*

2. **Lidija Cvetko Krajinović**. Molekularna epidemiologija hantavirusa. *Infektološki glasnik. 2007;27(3):123-129.*

3. Alemka Markotić, **Lidija Cvetko Krajinović**, Josip Margaletić, Nenad Turk, Marica Miletić-Medved, Ljiljana Žmak, Mateja Janković, Ivan-Christian Kurolt, Silvija Šoprek, Oktavija Đaković Rode, Zoran Milas, Ivan Puljiz, Dragan Ledina, Mirsada Hukić, Ilija Kuzman. Zoonoses and vector-borne diseases in Croatia - a multidisciplinary approach. *Veterinaria Italiana. 2009;45(1):55-66.*

4. Gorana Džepina**, Lidija Cvetko Krajinović**, Alemka Markotić. Klinička slika HVBS-a u međuepidemijskom razdoblju. *Infektološki Glasnik. 2009;29(1):13-18.*

5. Vladimir Krajinović, **Lidija Cvetko Krajinović**. Krpeljni meningoencefalitis. *MEDIX. 2010;16(89/90):216-228.*

6. Alemka Markotić, **Lidija Cvetko Krajinović**. Protuupalno djelovanje antibiotika. *Infektološki Glasnik. 2011;31(1):41-48.*

7. Marica Miletić-Medved, Oktavija Đaković Rode, **Lidija Cvetko Krajinović**, Alemka Markotić. Krpeljni meningoencefalitis u hrvatskoj srednjoj Posavini: seroepidemiološko ispitivanje u šumskih radnika. *Infektološki Glasnik. 2011;31(2):87-94.*

8. Vladimir Krajinović, **Lidija Cvetko Krajinović**. Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom. *MEDIX. 2012;18(100):263-266.*

Poglavlja u knjizi:

1. **Lidija Cvetko Krajinović**, Ivan-Christian Kurolt, Mirna Vranić-Ladavac, Alemka Markotić. *Filoviridae.* U: Selma Uzunović-Kamberović i ur. Medicinska mikrobiologija. Zenica: Štamparija Fojnica d.o.o., 2009;861-864.

2. Ivan-Christian Kurolt, **Lidija Cvetko Krajinović**, Mirna Vranić-Ladavac, Alemka Markotić. *Flaviviridae.* U: Selma Uzunović-Kamberović i ur. Medicinska mikrobiologija. Zenica: Štamparija Fojnica d.o.o., 2009;845-849.

Sažeci u zbornicima skupova:

- 48 sažetaka