Histološka analiza utjecaja nedostatka interferonskih receptora alfa i beta na knock-out miševima inficiranim citomegalovirusom

Grgurić, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:428895

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Tamara Grgurić

HISTOLOŠKA ANALIZA UTJECAJA NEDOSTATKA INTERFERONSKIH RECEPTORA ALFA I BETA NA *KNOCK-OUT* MIŠEVIMA INFICIRANIM CITOMEGALOVIRUSOM

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Tamara Grgurić

HISTOLOŠKA ANALIZA UTJECAJA NEDOSTATKA INTERFERONSKIH RECEPTORA ALFA I BETA NA *KNOCK-OUT* MIŠEVIMA INFICIRANIM CITOMEGALOVIRUSOM

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Katedri za medicinsku biologiju i genetiku u suradnji s Medicinskim fakultetom u Rijeci, Zavodom za histologiju i embriologiju.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Svjetlana Marić

Neposredna voditeljica: prof. dr. sc. Jelena Tomac

Rad ima 37 stranica, 16 slika i 2 tablice.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Svjetlani Marić i neposrednoj voditeljici prof. dr. sc. Jeleni Tomac, na suradnji, poticanju, strpljenju i pruženoj pomoći pri izradi završnog rada.

Također se zahvaljujem kolegama i kolegicama koji su mi na bilo koji način pomogli tijekom studiranja.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na strpljenju, razumijevanju i velikoj podršci koju su mi pružili za vrijeme studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. HUMANI CITOMEGALOVIRUS 1
1.1.1. GRAĐA CITOMEGALOVIRUSA 1
1.1.2. REPLIKACIJA CITOMEGALOVIRUSA 2
1.1.3. EPIDEMIOLOGIJA I PATOGENEZA CITOMEGALOVIRUSA 2
1.1.4. KLINIČKE MANIFESTACIJE CITOMEGALOVIRUSA 3
1.1.5. IZRAVNA DIJAGNOSTIKA CITOMEGALOVIRUSA 4
1.1.5.1. HISTOLOŠKE METODE 4
1.1.5.2. MOLEKULARNE METODE 4
1.1.5.3. STANIČNA KULTURA 5
1.1.6. NEIZRAVNA DIJAGNOSTIKA CITOMEGALOVIRUSA 5
1.1.7. LIJEČENJE CITOMEGALOVIRUSNE INFEKCIJE 5
1.2. MIŠJI CITOMEGALOVIRUS 6
1.3. INTERFERON 6
1.4. JETRA 7
1.5. ŽLIJEZDE SLINOVNICE 7
2. HIPOTEZA 9
3. CILJ 10
4. MATERIJALI I METODE 11
4.1. USTROJ STUDIJE 11
4.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE 11
4.3. MATERIJAL I METODE 11
4.3.1. POSTUPAK HEMALAUN - EOZIN (HE) BOJANJA 13
4.3.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE ZA PRIKAZ MIŠJEG CITOMEGALOVIRUSA 14
4.3.3. IMUNOHISTOKEMIJSKI POSTUPAK BOJENJA ZA PRIKAZ STANICA INFICIRANIH MIŠJIM CITOMEGALOVIRUSOM 15
4.4. STATISTIČKE METODE 17

5. REZULTATI **18**
5.1. USPOREDBA UZORAKA JETRE INFICIRANIH I 20
NEINFICIRANIH ŽIVOTINJA SOJEVA IFNαβR KO I C57/B6 20
5.2. USPOREDBA UZORAKA ŽLIJEZDA SLINOVNICA INFICIRANIH 25
I NEINFICIRANIH ŽIVOTINJA SOJEVA IFNαβR KO I C57/B6 25
6. RASPRAVA **30**
7. ZAKLJUČAK **32**
8. SAŽETAK **33**
9. SUMMARY **34**
10. LITERATURA **35**
11. ŽIVOTOPIS **37**

POPIS KRATICA

- HCMV (engl. *Human cytomegalovirus*) - humani citomegalovirus
- DNK (engl. *Deoxyribonucleic acid*) - deoksiribonukleinska kiselina
- ER (engl. *Endoplasmic reticulum*) - endoplazmatski retikulum
- HIV (engl. *Human immunodeficiency virus*) - virus humane imunodeficijencije
- AIDS (engl. *Acquired immunodeficiency syndrome*) – sindrom stečene imunodeficijencije
- CD8+ (engl. *Cluster of differentiation*) – predočne stanice
- CNS (engl. *Central nervous system*) - središnji živčani sustav
- HE (engl. *Hematoxylin and eosin*) – hematoksilin-eozin
- PCR (engl. *Polimerase chain reaction*) - polimerazna lančana reakcija
- IgG (engl. *Immunoglobulin G*) - imunoglobulin G
- IgM (engl. *Immunoglobulin M*) - imunoglobulin M
- MCMV (engl. *Murine cytomegalovirus*) - mišji citomegalovirus
- IFN (engl. *Interferon*) - interferon
- dsRNK (engl. *Double-stranded ribonucleic acid*) - dvostruko zavijena ribonukleinska kiselina
- PKR (engl. *Protein kinase R*) - protein kinaza aktivirana ribonukleinskom kiselinom
- mRNK (engl. *Messenger ribonucleic acid*) - glasnička ribonukleinska kiselina
- eIF2 (engl. *Eukaryotic initiation factor 2*) - faktor eukariotske inicijacije 2
- NK (engl. *Natural killer*) – stanice ubojice
- IFNαβR KO (engl. *Interferon alpha/beta receptor knockout*) – nedostatak interferonskih receptora alfa/beta
- IHC (eng. *Immunohistochemistry)* - imunohistokemija

1. UVOD

1.1. HUMANI CITOMEGALOVIRUS

Humani citomegalovirus (HCMV, od engl. *Human cytomegalovirus*) ubikvitaran je DNK virus iz porodice *Herpesviridae*. Humani herpesvirus 5 najistraženiji je od svih sojeva citomegalovirusa, i spada u podporodicu *Betaherpesvirinae*. Svim je herpes virusima zajednička osobina da nakon infekcije ostaju trajno latentni u organizmu domaćina i mogu se aktivirati u bilo kojem trenutku (1).

HCMV je prvi put uočen 1904. godine u epitelnim stanicama bubrega mrtvorođene djece s karakterističnim citopatskim učinkom - velikim intranuklearnim inkluzijama, no tek mu 1960. godine Thomas Huckle Weller daje ime *Citomegalovirus* (2).

Iako ga je moguće pronaći u svim tkivima, HCMV infekcija obično je povezana sa žlijezdama slinovnicama. Kod zdravih ljudi najčešće prolazi neopaženo, no istodobno može biti po život opasna za imunokompromitirane, kao što su HIV pozitivne osobe, novorođenčad i transplantirani bolesnici. Spada u najčešće infekcije tijekom trudnoće, s učestalošću od 0,6 % i vodeći je uzrok gluhoće i intelektualnih defekata kod djece (3).

HCMV je rasprostranjen na svim geografskim lokacijama i u svim socioekonomskim skupinama. Frekvencija zaraze procjenjuje se od 40 do 100 % u različitim populacijama, pri čemu je niža stopa zaraženosti u Europi, te dijelovima Sjeverne Amerike i Australije, a viša stopa u Africi i Aziji (4).

1.1.1. GRAĐA CITOMEGALOVIRUSA

Genom humanog citomegalovirusa sastoji se od oko 235 pb linearne dvolančane DNK, što ga čini najvećim od svih ljudskih virusa. Pojavljuje se u obliku velikog broja sojeva koji se međusobno vrlo malo razlikuju jer im je zajedničko 80 % genoma (5). Citomegalovirus ima genom E klase, koji sadrži dvije specifične sekvence i koje imaju mogućnost izvrtanja, što rezultira mogućnošću nastajanja četiri izomerne viralne DNK (5). Virion ima ikozaedralnu kapsidu koja okružuje i štiti genetski materijal. Kapsida je sastavljena od 162 heksagonalne kapsomere i okružena je dvoslojnom lipidnom ovojnicom iz koje strše glikoproteinski izdanci kojima se virioni prihvaćaju na površinu i prodiru u stanicu.

Između vanjske ovojnice i kapside nalazi se virusna opna (tegument) koja sadrži dvije glavne vrste proteina: proteine koji imaju strukturnu ulogu i koji su sastavni dio u rastavljanju i sastavljanju viriona za vrijeme ulaza u stanicu te proteine koji moduliraju reakciju stanice domaćina na infekciju (6).

1.1.2. REPLIKACIJA CITOMEGALOVIRUSA

Citomegalovirus se može umnožavati samo unutar stanice domaćina. Bez metaboličkih enzima i ribosoma u stanici domaćinu, virus je inertan. Ciljane stanice su leukociti, neutrofili i monociti, te endotelne i epitelne stanice. Mehanizam infekcije stanice započinje vezanjem virusa za receptore na membrani stanice domaćina pomoću glikoproteina na virusnom omotaču. Zatim dolazi do spajanja virusne membrane s membranom stanice domaćina, a potom se virus umnožava u jezgri zaražene stanice. Novoformirane virusne čestice zatim putuju duž endoplazmatskog retikuluma do stanične membrane, gdje dobivaju ovojnicu te napuštaju inficiranu stanicu pupanjem. U citoplazimi se virusna kapsida omata tegumentom i tegument lipidnom ovojnicom s glikoproteinima (7).

Umnožavanje citomegalovirusa složen je proces koji se odvija u nekoliko faza u jezgri stanice domaćina uz izražaj različitih gena, koji se mogu podijeliti u dvije kategorije, gene ranog odgovora koji reguliraju proces prepisivanja, te gene kasnog odgovora čiji su produkti strukturni proteini virusa.

U replikaciji CMV-a ključnu ulogu ima virusna DNK polimeraza, i zato predstavlja ciljnu molekulu na koju djeluju svi aktivno dostupni lijekovi koji se upotrebljavaju u liječenju citomegalovirusne infekcije (8).

1.1.3. EPIDEMIOLOGIJA I PATOGENEZA CITOMEGALOVIRUSA

Citomegalovirus je široko rasprostranjen diljem svijeta i njime je zaraženo više od polovice čovječanstva. Infekcije su prisutne tijekom čitave godine, a ljudi su jedini domaćini. Virus je slabe virulencije, pa je za njegov prijenos potreban bliski kontakt s inficiranom osobom. Glavni su načini širenja oralnim i spolnim putem, transplacentarno te transfuzijom krvi ili transplantacijom tkiva (9). Zaraza uvelike ovisi i o životnim uvjetima i higijenskim navikama te zemljopisnom području, pa je sukladno tome područje Afrike i dijela Južne Amerike u znatno višem postotku rizika od ostalih dijelova svijeta (10).

Osobito je značajno da infekcija kod imunokompromitiranih osoba kao što su oboljeli od AIDS-a, zloćudnih ili hematoloških bolesti može uzrokovati teške upale pluća ili mozga, koje u više od polovice slučajeva završavaju smrtno. Također, prijenos s majke na dijete tijekom trudnoće može imati teške posljedice ili rezultirati smrću ploda. Postoji rizik i od zaraze transfuzijom krvi ili transplantiranim organima, gdje se seropozitivnim presadcima zaraze dotada seronegativne osobe (9).

Patogeneza infekcije citomegalovirusom nalik je patogenezi ostalih herpesvirusa, uz jednu bitnu razliku, a to je da uzrokuje kratkotrajnu imunosupresiju. Virus u stanicu domaćina obično ulazi putem sluznice orofarinksa ili genitalnog trakta, uz inkubaciju od 4 do 8 tjedana (11).

Opće su karakteristike virusa brzo širenje od stanice do stanice zaraženim leukocitima i limfocitima, čak i uz prisutnost humoralnih protutijela, te perzistencija u domaćinu u latentnom stanju, najčešće u leukocitima i u bubrežnim i srčanim stanicama (11).

U inficiranih osoba tijekom akutne infekcije virus je moguće izolirati iz brojnih tjelesnih tekućina poput krvi, sline,urina, ispirka ždrijela, sjemene tekućine, vaginalnog sekreta i majčinog mlijeka (11).

U nadzoru i savladavanju infekcije bitnu ulogu imaju čimbenici prirođene i stanične imunosti. Dok CD8+ limfociti kontroliraju akutnu infekciju, protutijela štite domaćina od razmnožavanja i širenja infekcije ako dođe do reaktivacije virusa (12).

Kod seropozitivnih majki protutijela u mlijeku sprječavaju razvoj teške bolesti, ali ne sprječavaju prijenos virusa s majke na dijete (12).

1.1.4. KLINIČKE MANIFESTACIJE CITOMEGALOVIRUSA

Kod imunokompetentnih osoba infekcija citomegalovirusom najčešće je asimptomatska, s viremijom koja može trajati do nekoliko mjeseci.

Kod imunokompromitiranih osoba CMV djeluje kao oportunistički infektivni agens, i čest je uzrok oboljenja i smrtnosti. Kliničke manifestacije variraju, od kolitisa i egzofagitisa, do pneumonija, gastroenteritisa, upala oka i encefalitisa. Moguća je pojava hepatitisa s hepatosplenomegalijom u osoba s transplantiranim bubregom. Infekcija može biti primoinfekcija, koja je puno težeg tijeka, ili reaktivacija virusa.

Transplantacija seropozitivnih organa seronegativnoj osobi dovodi do virusne reaktivacije i mogućeg odbacivanja transplantata (13).

Citomegalovirus je najčešći virusni uzročnik kongenitalne infekcije. Do prijenosa s majke na dijete može doći putem posteljice, prilikom prolaska kroz porođajni kanal, gdje dolazi do kontakta s majčinim vaginalnim sekretima i majčinim mlijekom (14). Razlikuju se primarna i sekundarna infekciju majke. Primoinfekcija nastaje kada se seronegativna majka po prvi put inficira virusom i tada je veća mogućnost prelaska s majke na dijete, dok se sekundarna infekcija javlja ako je majka već bila u kontaktu s virusom i ima pozitivna protutijela u krvi. Sekundarna infekcija se može javiti kao reaktivacija latentnog virusa koji je već prisutan u tijelu majke ili kao reinfekcija novim sojem citomegalovirusa. Ako se infekcija javi u prva dva trimestra trudnoće, može dovesti do prijevremenog porođaja ili smrti ploda (14). U postnatalnom periodu kliničke manifestacije variraju od blagih do teške diseminirane bolesti sa zaostajanjem u rastu, žuticom, hepatosplenomegalijom, encefalitisom, mikrocefalijom, trombocitopenijom i hemolitičkom anemijom (15).

Blaže forme oštećenja CNS-a, kao što su defekti u percepciji, slabije učenje, minorni motorički poremećaji koordinacije ili emocionalna labilnost, mogu se primijetiti tek u odraslijoj dobi (13).

1.1.5. IZRAVNA DIJAGNOSTIKA CITOMEGALOVIRUSA

Izravna dijagnostika CMV obuhvaća histološke i molekularne metode, te staničnu kulturu.

1.1.5.1. HISTOLOŠKE METODE

Histološke metode podrazumijevaju analizu uzoraka tkiva ili urina inficiranih osoba, pri čemu se detektiraju citomegalične stanice s karakterističnim inkluzijama u jezgri stanice (stanice poput sovina oka), a koje su vidljive nakon bojenja po Papanicolau ili HE metodom (16).

1.1.5.2. MOLEKULARNE METODE

Molekularne metode, kao što je lančana reakcija polimeraze (PCR, od engl. *Polimerase chain reaction*) koriste se za detektiranje i mjerenje količine virusne DNK u ispitivanom uzorku osobe. Analiza uzorka može biti kvalitativna, za određivanje prisutnosti ili odsutnosti virusa, ili kvantitativna, za određivanje količine prisutnog virusa (16).

1.1.5.3. STANIČNA KULTURA

Stanična kultura je tradicionalna metoda detekcije virusa za koju su najpogodniji uzorci leukociti i sediment urina. Prisutnost virusa (pozitivna kultura) često se može odrediti nakon samo jednog do dva dana. Međutim kulture negativne na virus moraju se održati tijekom tri tjedna za potvrdu odsutnosti virusa jer može biti prisutan u vrlo niskim koncentracijama u izvornom uzorku ili se može raditi o soju koji sporo raste. CMV se umnožava isključivo u staničnoj kulturi ljudskih fibroblasta (16).

1.1.6. NEIZRAVNA DIJAGNOSTIKA CITOMEGALOVIRUSA

Osim izravne, za detekciju citomegalovirusa, koristi se i neizravna dijagnostika.

Testiranje antitijela obavlja se na uzorcima krvi i može se koristiti za utvđivanje izlaganja citomegalovirusu. Razlikuju se dvije vrste CMV antitijela koja se proizvode kao odgovor na infekciju, IgM i IgG, te ih je moguće detektirati u krvi (17).

IgM antitijela nastaju kao prvi odgovor na infekciju, i mogu se detektirati unutar tjedan ili dva nakon početnog izlaganja CMV. Proizvodnja IgM protutijela raste u kratkom vremenskom razdoblju, a zatim opada. Nakon nekoliko mjeseci razina im obično padne ispod mjerljive razine. Dodatna IgM antitijela proizvode se ako se ponovno aktivira latentni virus (17).

IgG antitijela nastaju nekoliko tjedana nakon početka infekcije i pružaju zaštitu od primarnih infekcija. Razina IgG antitijela počinje rasti tijekom aktivne infekcije, a zatim se stabilizira kako CMV postaje neaktivan. Nakon što je osoba bila izložena citomegalovirusu, imat će mjerljiv iznos IgG protutijela u krvi ostatak života (17).

Usporedbom prisutnosti ili odsutnosti IgG i IgM protutijela u istom uzorku ili njihove količine može se razlikovati latentna i aktivna CMV infekcija (17).

1.1.7. LIJEČENJE CITOMEGALOVIRUSNE INFEKCIJE

Blaga infekcija citomegalovirusom se ne liječi jer obično prolazi sama od sebe. Kada je infekcija opasna po život, za liječenje se koriste ganciklovir ili foskarnet. Također, isti se lijekovi koriste i u profilaksi kod seropozitivnih primatelja presatka koštane srži, kao prevencija reaktivacije (18).

1.2. MIŠJI CITOMEGALOVIRUS

Mišji citomegalovirus (MCMV, od engl. *Murine cytomegalovirus*) je herpesvirus iz podporodice *Betaherpesvirinae*, specifičan je za miševe i spada u DNK viruse.

Prijenos je najčešće horizontalan, putem zaražene sline i urina, dok se vertikalni prijenos obično odvija u eksperimentalnim uvjetima (19). MCMV se primarno nalazi u žlijezdama slinovnicama koje pokazuju kroničnu upalu i izlučuju virus u slinu, čak i u prisutnosti cirkulirajućih imunoglobulina. Ovisno o načinu inokulacije, miševi razvijaju sistemsku viremiju ili putem parenteralne inokulacije ili nakon replikacije iz primarnog mjesta infekcije (19). Replikacija virusa događa se u žlijezdama slinovnicama, jetri, slezeni, nadbubrežnim žlijezdama, limfnim čvorovima, bubrezima, plućima, crijevima i gušterači uz uobičajenu pojavu nekroze (19).

Zaražene stanice imaju intranuklearne inkluzije koje ispunjavaju jezgru i mogu izazvati povećani izgled stanice.

Mišji model najčešće se koristi zbog relativno niske cijene eksperimentalnih životinja i njihovog kratkog životnog ciklusa, ali i zbog velike sličnosti u građi i imunobiologiji mišjeg i humanog CMV (19).

1.3. INTERFERON

Interferoni su prirodni proteini koje proizvode stanice imunološkog sustava, kao reakciju na štetne čimbenike kao što su virusi, paraziti, bakterije ili tumorske stanice. Spadaju u skupinu glikoproteina koji se nazivaju citokini (20). Razlikuju se alfa, beta i gama interferon. Alfa i beta interferoni su stavljeni od 166 aminokiselina, dok je interferon gama sastavljen od 143 aminokiselina. Alfa interferon stvaraju limfociti, beta interferon fibroblasti, a gama interferon imunokompetentni T-limfociti (20).

Interferoni djeluju tako da sprječavaju razmnožavanje virusa unutar inficirane stanice, sprječavaju širenje infekcije na druge stanice, povećavaju djelovanje obrambenih stanica (T-limfociti i makrofagi) i sprječavaju rast nekih vrsta tumorskih stanica (21).

Interferoni alfa i beta djeluju kao dio urođene imunološke reakcije na patogene. Do njihove aktivacije dolazi kada se u stanici poveća koncentracija dsRNK, što rezultira stvaranjem velike količine protein kinaze R koja ima pro-apoptotičko djelovanje. PKR prebacuje grupe fosfata na protein eIF2. Zbog fosforizacije eIF2 ima smanjenu sposobnost poticanja stvaranja virusnih proteina kodiranih u mRNK, čime se sprječava replikacija virusa.

Interferon gama nema posebnu ulogu kod reakcija na viruse, no on je glavni aktivator makrofaga, kako kod urođenih imunoloških reakcija tako i kod onih potaknutih vanjskim faktorima (21).

1.4. JETRA

Jetra je najveća žlijezda, koja u organizmu ima brojne važne uloge poput detoksifikacije, sinteze glikogena i proteina plazme, te proizvodnje žuči.
Osnovni plan građe jetre zajednički je većini sisavaca. Parenhim jetre izgrađuju nakupine kubičnih epitelnih žlijezdanih stanica, hepatocita, složenih u režnjiće i lobule jetre. Režnjići su u obliku poligonalnih polja, međusobno se dodiruju i teško je odrediti točnu granicu između njih. Na mjestima gdje se sastaju tri ili više režnjića nalaze se interlobularni Kiernanovi portalni prostori. Između hepatocita su smještene sinusoide koje sadrže brojne otvore koji omogućuju da tvari iz venske krvi lako odlaze u prostor između stanica stijenke sinusoida i jetrenih stanica (22) . Taj prostor se naziva Disseov prostor, a iz njega tekućina odlazi u limfne žile (23). U Disseovom prostoru se nalaze i Itove stanice, koje služe za pohranu masti. Osim endotelnih stanica, sinusoide sadrže i makrofage ili Kupfferove stanice koje su većinom smještene u periportalnom području jetrenih režnjića (22).

1.5. ŽLIJEZDE SLINOVNICE

Žlijezde slinovnice egzokrine su žlijezde koje lučenjem sekreta u usnu šupljinu i ždrijelo održavaju sluznice vlažnima i pokreću enzimatske procese važne za učinkovitu razgradnju hranjivih tvari. Podjela žlijezda slinovnica temelji se na njihovoj veličini, te se razlikuju dvije skupine, velike i male. Parotidne, sublingualne i submandibularne žlijezde čine skupinu velikih žlijezda slinovnica, dok su male žlijezde slinovnice vrlo sitne pa sukladno tome njihov broj nije moguće točno odrediti. Žlijezde slinovnice su većinom smještene na tvrdom nepcu, ali je velik broj njih prisutan i u ostatku usne šupljine i ždrijela.
Egzokrine žlijezde sastoje se od žlijezdanog dijela i sustava odvodnih kanala. Prema vrsti proizvedenog sekreta razlikuju se dvije vrste žlijezdanih stanica, serozne koje se povezuju u acinuse i mukozne koje su udružene u tubuluse, dok sustav odvodnih kanala čine prijelazne cijevi, sekretne cijevi i interlobularni kanali.

Također, značajne su i mioepitelne stanice čija kontrakcija ubrzava izlučivanje sline, ali i sprječava širenje žlijezdanih dijelova za vrijeme izlučivanja zbog povišenja intraluminalnog tlaka (24).

2. HIPOTEZA

Citomegalovirus izaziva specifične promjene u tkivu jetre i žlijezda slinovnica miševa soja C57/B6 i IFNαβR KO.

3. CILJ

Cilj ovog rada bio je, na tkivim uzorcima miševa C57/B6 i IFNαβR KO, koji su inficirani citomegalovirusom prvog dana po okotu, ustanoviti prisutnost citomegalovirusa, odnosno detektirati promjene uzrokovane njegovom infekcijom.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Provedeno istraživanje temeljilo se na principu istraživanja parova (*case-control*). Za njegovu provedbu korišteni su miševi soja IFNαβR KO, koje su bili imundeficitni, odnosno bez interferonskih receptora alfa i beta, koji normalno sudjeluju u suzbijanju virusnih infekcija. Za razliku od soja IFNαβR KO, životinje soja C57/BL6 bile su imunokompetentne i imale su interferonske receptore. Životinje iz oba soja inficirane su citomegaloviruson, te su praćene promjene izazvane njegovim djelovanjem. Također, oba soja su imala i kontrolu, odnosno neinficirane životinje.

4.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Za eksperiment su korišteni miševi soja C57/B6 i IFNαβR KO. Od svakog soja analizirane su po dvije životinje, jedna koja je primila samo medij bez virusa i jedna koja je intravenozno inficirana sojem virusa Δm157 u dozi od 4 x 10^5 PFU. Navedene životinje žrtvovane su uspavljivanjem na parama CO_2, nakon čega su im izdvojene jetra i žlijezde slinovnice, od kojih je pripremljeno po 14 inficiranih i 14 kontrolnih tkivnih preparata za daljnje histološke analize.

4.3. MATERIJAL I METODE

Nakon izdvajanja, organi su prvo smješteni u plastične kasete, a zatim su obrađeni klasničnom histološkom metodom za dobivanja parafinskog bloka koji se može rezati na mikrotomu.

Fiksacija je prvi i ujedno najvažniji korak pri obradi tkiva. Ovaj postupak služi kako bi se očuvala struktura i morfološke karakteristike tkiva. Također, zaustavlja se i enzimska razgradnja (autoliza), izazvana staničnim enzimima, i putrefakcija, izazvana enzimima saprofitnih bakterija (25).

Najčešće korišteni fiksativi su formaldehid i glutaraldehid, čiji je mehanizam djelovanja reakcija s aminoskupinama (NH_2) tkivnih bjelančevina, čime se aktivne skupine povezuju i inaktiviraju, a solubilni proteini učvršćuju uz citoskelet, što tkivo čini čvršćim.

Trajanje fiksacije ovisi o vrsti, temperaturi i veličini tkiva, a količina fiksativa koji se koristi treba biti 15 – 20x veća od volumena tkiva. Za bolju kvalitetu preparata fiksacija treba biti duža i na nižoj temperaturi (26).

Za fiksaciju je korištena 4 %-tna otopina paraformaldehida, koji dolazi u obliku bijelog praha (polimeriziranog formaldehida) koji se kod pripreme fiksativa grije i time depolarizira u formaldehid. Tkiva su fiksirana preko noći na temperaturi od 4 °C.

Nakon fiksacije uzorci tkiva su stavljeni u histokinet – stroj za automatsku dehidraciju. Dehidraciju je potrebno provesti kako bi se uklonila voda iz tkiva, i na taj način omogućilo potpuno prodiranje parafina u tkivo. Da bi se izbjeglo oštećenje tkiva, dehidracija mora biti postupna, što se ostvaruje prenošenjem tkiva kroz niz dehidrirajućih sredstava koji imaju sve višu koncentraciju. U tu svrhu koristi se etilni alkohol u koncentracijama od 70 %, 90 % i 100 %. Kako se parafin koji je potreban za uklapanje preparata ne miješa s vodom, nakon dehidracije se uvodi univerzalno otapalo (ksilol) koje se može miješati i s parafinom i s alkoholom. To svojstvo mu omogućava istiskivanje alkohola iz tkiva i prodor parafina (27).

Ksilol tkivo čini staklastim, prozirnim i tvrdim, što je vrlo važno, jer ako u tkivu nakon dehidracije zaostane vode, preparati će biti neoštri, nejednoliko obojani i sa slabo izraženim detaljima jezgre (26). Tkivo je potrebno tanko izrezati, a za to ga treba prožeti odgovarajućim sredstvom kako bi bilo jednolično i dovoljno tvrdo. U tu se svrhu koristi parafin, mješavina lančanih ugljikovodika s 21 - 28 ugljikova atoma koja ima talište na 54 - 60 °C, dok je na sobnoj temperaturi čvrst. Parafin se pri prožimanju tkiva miješa s ksilolom i istiskuje ga (28).

Nakon impregnacije, tkivo se uklapa u parafinske blokove, za što se koristi plastična kaseta u kojoj se tkivo nalazi od žrtvovanja životinje. Proces se izvodi tako što se metalna kadica napuni parafinom, tkivo se utisne na dno i poklopi plastičnom kasetom koja nosi oznaku uzorka (28).

Nakon toga parafin se mora brzo ohladiti, kako ne bi došlo do pojave velikih kristala koji bi u preparatu biti vidljivi u obliku ledenih kristala. Ako su prethodni procesi dehidracije i bistrenja bili nepotpuni, parafinski blokovi bit će mekani i neće se moći dobro rezati (28).

Rotacijskim mikrotom rezani su preparati debljine 2 μm koji su potom prebačeni u toplu kupelj zagrijanu na 45 °C. Ovim postupkom se omogućuje pravilno izravnavanje reza koji se zatim montira na predmetno staklo. Predmetna stakalca preko noći ostavljaju se u termostatu na 37 °C da se rezovi osuše (29). Prije početka bojenja preparata potrebno ih je deparafinizirati i rehidrirati, zato što je većina boja koje se koriste u histologiji topljiva u vodi. Deparafinizacija se provodi u tri otopine ksilola po 5 minuta kako bi se u potpunosti uklonio parafin.

Nakon toga stakla se stavljaju u silazni niz alkohola, 100 %, 90 % i 70 %-tni alkohol i na kraju u destiliranu vodu. Zatim slijedi bojanje preparata.

Hemalaun - eozin standardni je način bojanja preparata, zbog jednostavnosti izvođenja i jasnog prikaza tkivnih struktura. Ime je dobilo prema dvije osnovne boje kojima se koristi, a od kojih hematoksilin jezgru i kisele sastojke (kromatin, membrane i jezgricu) boji u plavo, dok eozin različitim nijansama crvene oboji mišićna vlakna, eritrocite i vezivno tkivo (30).

4.3.1. POSTUPAK HEMALAUN - EOZIN (HE) BOJANJA

1. Deparafinizacija

1.1. Xylol I - 5 min

1.2. Xylol II - 5 min

1.3. Xylol III - 5 min

2. Rehidracija

2.1. Alkohol 100 % - 3 min

2.2. Alkohol 100 % - 3 min

2.3. Alkohol 90 % - 3 min

2.4. Alkohol 70 % - 3 min

2.5. Alkohol 50 % - 3 min

2.6. Ispiranje - *aqua destilata* - 3 min

3. Bojanje

3.1. Hematoksilin boja - 5 min

3.2. Ispiranje – tekuća voda - 2 min

3.3. Diferenciranje u alkoholu - 2 sek

3.4. Ispiranje – tekuća voda - 2 min

3.5. Ispiranje – *aqua destilata* - 2 min

3.6. Eozin boja - 3 min

3.7. Ispiranje – *aqua destilata* – 5 x 1 min

4. Dehidracija

4.1. Alkohol 70 % - 5 min

4.2. Alkohol 96 % - 5 min

4.3. Alkohol 96 % - 5 min

4.4. Alkohol 100 % - 5 min

4.5. Alkohol 100 % - 5 min

5. Sušenje stakalaca na zraku

6. Bistrenje

6.1. Xylol I - 5 min

6.2. Xylol II - 5 min

6.3. Xylol III - 5 min

7. Uklapanje

7.1. Sintetska smola - Entelan

4.3.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE ZA PRIKAZ MIŠJEG CITOMEGALOVIRUSA

Imunohistokemijska metoda koristi se za otkrivanje položaja specifičnih antigena u tkivu, zahvaljujući specifičnim protutijelima koja prepoznaju ciljna mjesta na antigenima (epitope).

Kako se antigeni i protutijela ne mogu mikroskopski vidjeti, potrebno je mjesto reakcije, odnosno mjesto nastalog imunokompleksa vizualizirati. To se postiže primjenom enzima koji oksidira kromogen u prisustvu odgovarajućeg supstrata ili fluorescentnom bojom. Za izvođenje imunohistokemijske metode najvažnije je izolirati antigen koji se želi prikazati, što se postiže imunizacijom životinje, uslijed čega ona proizvodi protutijela protiv tog antigena (31).

Kao primarno protutijelo korišteno je protutijelo Croma 101, mišje monoklonsko protutijelo specifično za virusni fosfoprotein pp89. Primarno protutijelo u tkivu se veže za virusni protein i tvori imuni kompleks. Stvoreni kompleks zatim se vizualizira imunohistokemijskim bojanjem.

Primarno protutijelo vezano u imunom kompleksu u tkivu detektirano je sekundarnim protutijelom. Korišteno je kozje sekundarno protutijelo, sa specifičnošću prema mišjim imunoglobulinima.

Sekundarna protutijela su uvijek usmjerena prema vrsti životinje čije su stanice proizvele primarna protutijela, i obilježena su biotinom koji omogućuje daljnje vezanje kompleksa streptavidina i peroksidaze. Na taj način se na mjesto stvaranja primarnog kompleksa antigena i primarnog protutijela dovodi enzim peroksidaza koji reagira s kromogenom i stvara netopljivi precipitat. Uobičajeno se koristi kromogen diaminobezidin (DAB) koji u reakciji s peroksidazom stvara smeđi precipitat, te tako postaje vidljivo mjesto gdje je u tkivu smješten antigen. Kao rezultat imunohistokemijskog bojenja MCMV inficiranog tkiva dobiveno je smeđe obojanje u jezgrama inficiranih stanica.

Za potvrdu točnosti dobivenih rezultata uvijek se pri analizama koriste i kontrolni preparati, kod kojih je izostavljeno primarno protutijelo, odnosno kod kojih nisu stvoreni kompleksi između protutijela Croma 101 i inficiranih stanica.

4.3.3. IMUNOHISTOKEMIJSKI POSTUPAK BOJENJA ZA PRIKAZ STANICA INFICIRANIH MIŠJIM CITOMEGALOVIRUSOM

1. Deparafiniranje

1.1. Xylol I - 5 min

1.2. Xylol II - 5 min

1.3. Xylol III - 5 min

2. Rehidracija

2.1. Alkohol 100 % - 4 min

2.2. Alkohol 90 % - 4 min

2.3. Alkohol 70 % - 4 min

2.4. Alkohol 50 % - 4 min

3. Ispiranje – *aqua destilata* – 3 x 1 min

4. Digestija tkiva zagrijanim tripsinom - 15 min

5. Ispiranje – *aqua destilata* – 3 x 1 min

6. Otopina za blokiranje endogene peroksidaze - 30 min

(30 ml metanola + 30 ml PBS + 1 ml H_2O)

7. Ispiranje – *aqua destilata* – 3 x 1 min
8. Primarno antitijelo Croma 101 (1:400 u 1 %-tnom puferu) - 60 min
9. Ispiranje – pufer PBS – 3 x 5 min
10. Sekundarno protutijelo (kozja protiv mišjih IgG 1:200 u 1 %-tnom puferu) – 30 min
11. Ispiranje – pufer PBS – 3 x 5 min
12. Streptavidin – peroksidaza kompleks - 30 min
13. Ispiranje - pufer PBS – 3 x 5 min
14. Kromogen DAB - 5 min
15. Ispiranje – *aqua destilata* – 3 x 1 min
16. Hematoksilin boja (kontrastiranje) - 1 min
17. Ispiranje – *aqua destilata* – 5 x 1 min

18. Dehidracija

18.1. Alkohol 70 % - 5 min
18.2.. Alkohol 96 % - 5 min
18.3. Alkohol 96 % - 5 min
18.4. Alkohol 100 % - 5 min
18.5. Alkohol 100 % - 5 min

19. Bistrenje

19.1. Xylol I - 5 min
19.2. Xylol II - 5 min
19.3. Xylol III - 5 min

20. Uklapanje (sintetska smola – Entelan)

4.4. STATISTIČKE METODE

Rezultati provedenih analiza prikazani su tablično i tekstualno, s prikazom apsolutnih vrijednosti za svaku pojedinu skupinu preparata.

Za usporedbu kategoričkih podataka između nezavisnih skupina korišteni su Hi-kvadrat test i Fisherov egzaktni test. Razina statističke značajnosti je postavljena na $\alpha=0,05$, a analiza je rađena statističkim alatom MedCalc (inčica 14.12.0, MedCalc Software bvba).

5. REZULTATI

U ovom radu histološki je obrađeno po 14 inficiranih preparata jetre i žlijezda slinovnica sojeva C57/B6 i IFNαβR KO. Inficirani preparati uspoređeni su s kontrolnim, neinficiranim preparatima u kojima je izostala reakcija, odnosno nije ustanovljen niti jedan lažno pozitivan rezultat (Tablica 1).

Distribucija preparata sa pozitivnom reakcijom prema organu i vrsti bojanja prikazana je u Tablici 2.

Tablica 1. Usporedba reakcije uzoraka inficiranih MCMV uzoraka s kontrolnim uzorcima

Reakcija	Broj preparata od ukupno		P*
	Inficirani	Kontrola	
pozitivna reakcija	98 (87,5)	0	<0,001
bez reakcije	14 (12,5)	112 (100,0)	
Ukupno	112 (100,0)	112 (100,0)	

*Hi-kvadrat test

Polovica analiziranih preparata obojena je rutinskom hemalaun-eozin metodom koja je dala uvid u mikroskopsku građu organa zdravih životinja sa strukturom istih organa kod inficiranih životinja.

Druga polovica preparata analizirana je imunohistokemijskim bojanjem pomoću kojeg je praćena eksprimiranost virusnog proteina pp89, s ciljem detekcije inficiranih stanica.

Nakon provedene statističke analize, nije utvrđena statistički značajna razlika između inficiranih preparata jetre i žlijezda slinovnica sojeva C57/B6 i IFNαβR KO, niti kod rutinskog HE bojenja niti kod imunohistokemijskog bojenja (Tablica 2).

Za obje vrste bojanja, kod oba promatrana organa, u sva četiri slučaja je broj preparata s pozitivnom reakcijom statistički značajno veći u usporedbi s preparatima kod kojih je reakcija izostala (Tablica 2).

Od ukupno 112 inficiranih, 98 preparata je pozitivno reagiralo na bojanje, dok je kod 14 preparata izostala reakcija (Tablica 1). Najviše preparata bez reakcije, ukupno 9, preparati su slinovnica obojani hemalau-eozin bojanjem (Tablica 2).

Tablica 2. Usporedba reakcije pojedinih sojeva i organa na bojenja

Bojanje		Broj preparata od ukupno			P*
		soj C57/B6	soj IFNαβR KO	Ukupno	
Hemalaun - eozin bojanje					
Jetra	pozitivna reakcija	11	14	25	0,22
	bez reakcije	3	0	3	
Slinovnice	pozitivna reakcija	9	10	19	>0,99
	bez reakcije	5	4	9	
Imunohistokemijsko bojanje na virusni protein pp89					
Jetra	pozitivna reakcija	14	14	28	>0,99
	bez reakcije	0	0	0	
Slinovnice	pozitivna reakcija	12	14	26	0,48
	bez reakcije	2	0	2	
UKUPNO		14	14	28	

*Fisherov egzaktni test

5.1. USPOREDBA UZORAKA JETRE INFICIRANIH I NEINFICIRANIH ŽIVOTINJA SOJEVA IFNαβR KO I C57/B6

Proučavani preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopom B40, Olympus i fotografirani pod različitim povećanjima objektiva (20 x,40 x).

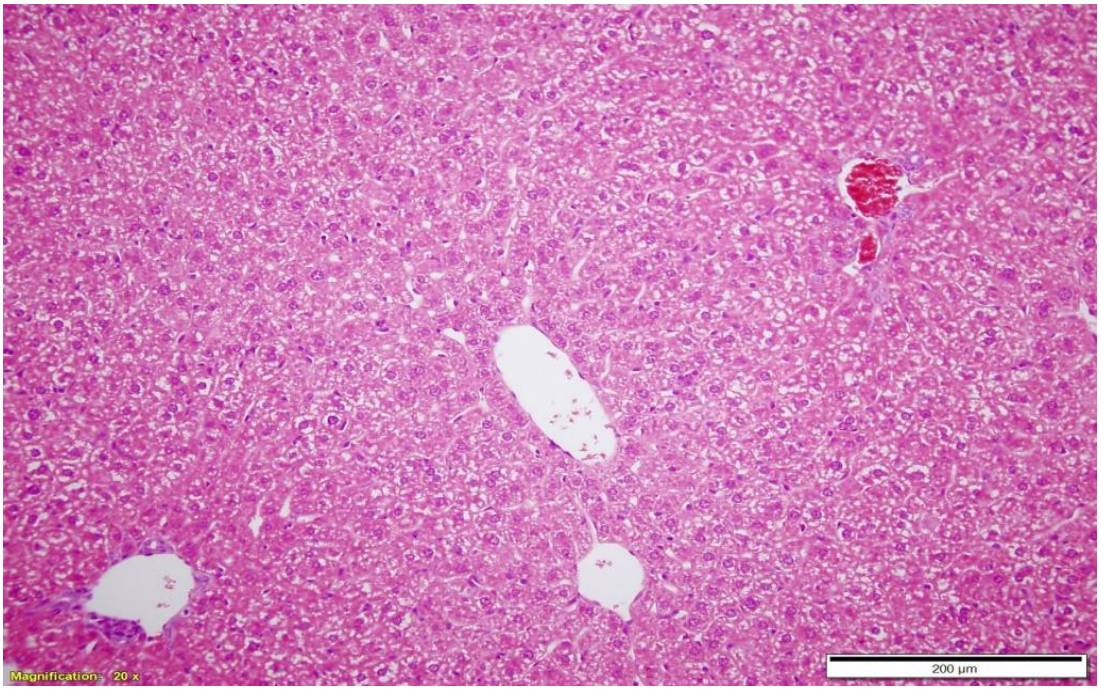
U preparatima jetre neinficiranih životinja uočava se karakteristična građa jetre s hepatocitima koji su zvjezdasto raspoređeni oko centralnih vena. Također, vidljive su i dovodne krvne žile, kao i žučni kanalići između jetrenih režnjića (Slika 1, 3).

Patohistološke promjene kod soja C57/B6 blagog su karaktera kako u HE preparatima tako i u preparatima obojenim imunohistološkim bojanjem. Mogu se detektirati pojedinačne stanice s citopatskim učinkom i morfonuklearni infiltrati (Slika 2).

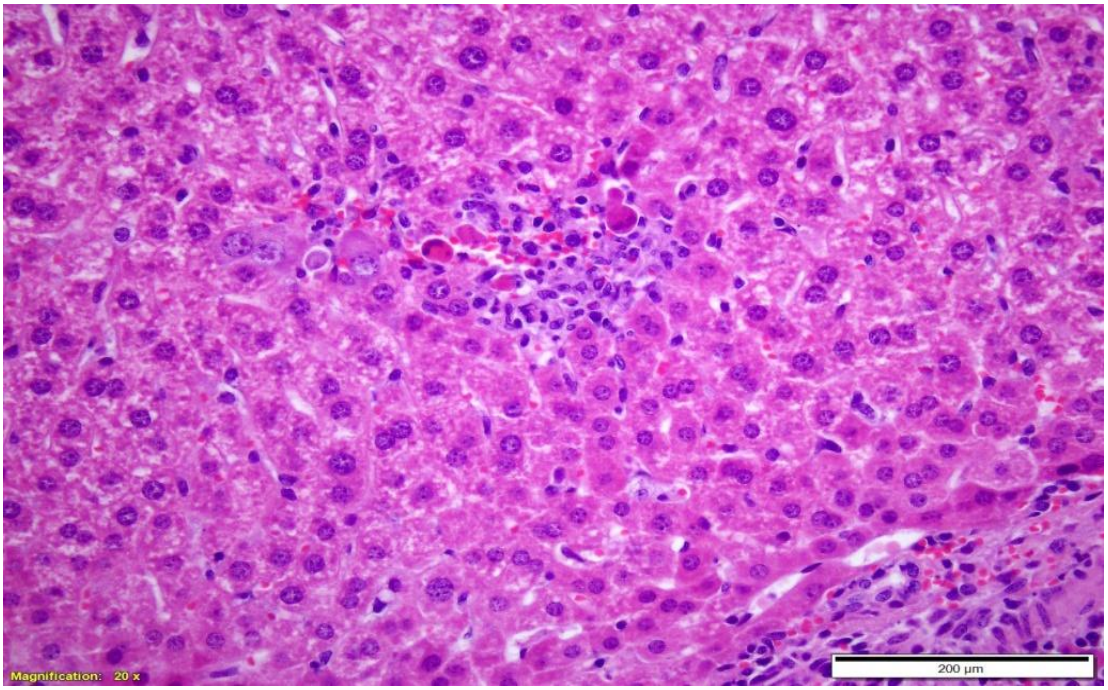
U preparatima jetre neinficiranih miševa sojeva C57/B6 i IFNαβR KO obojanim imunohistološkim bojanjem nema ispoljenosti virusnog proteina pp89 (Slika 5,7).

Imunohistološkim bojanjem obojane su jezgre stanica pozitivnih na virusni protein pp89, te se uočava da su smještene u skupinama i da su neke izrazito povećane (citomegalične) (Slika 6).

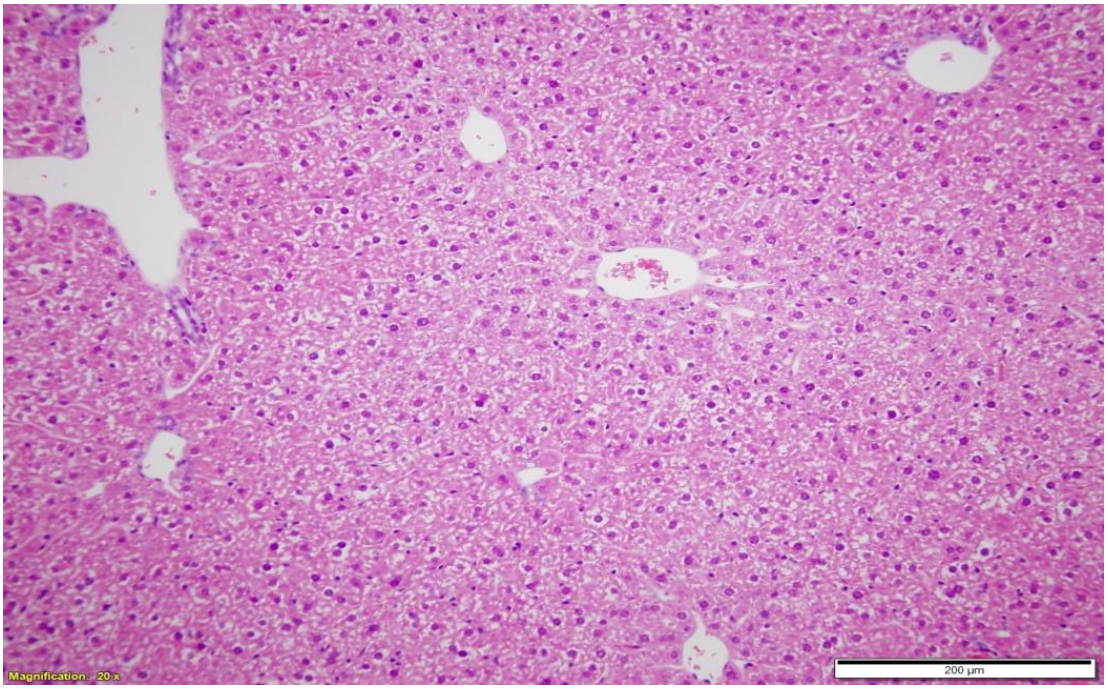
U preparatima IFNαβR KO promjene su izrazitijeg karaktera, pa se uočava velik broj infiltrata i povećanih stanica te stanica pozitivnih na virusni protein pp89 (Slika 4, 8).



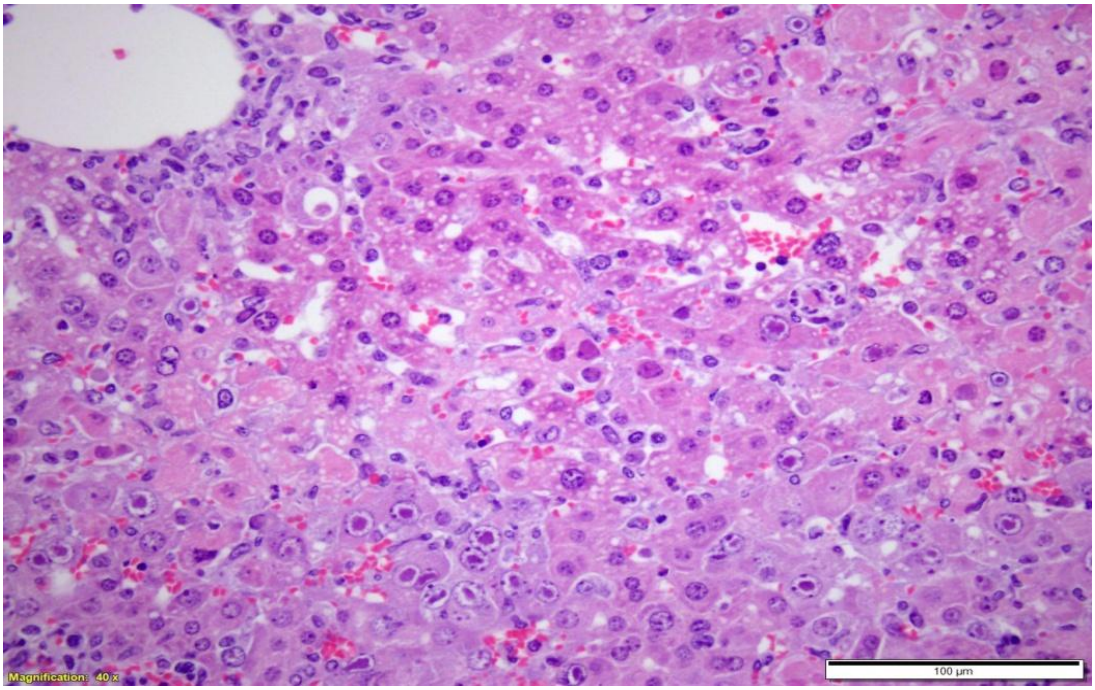
Slika 1. Jetra neinficiranog miša soja C57/B6 – HE bojanje (ukupno povećanje 200 x) - fotografirala autorica



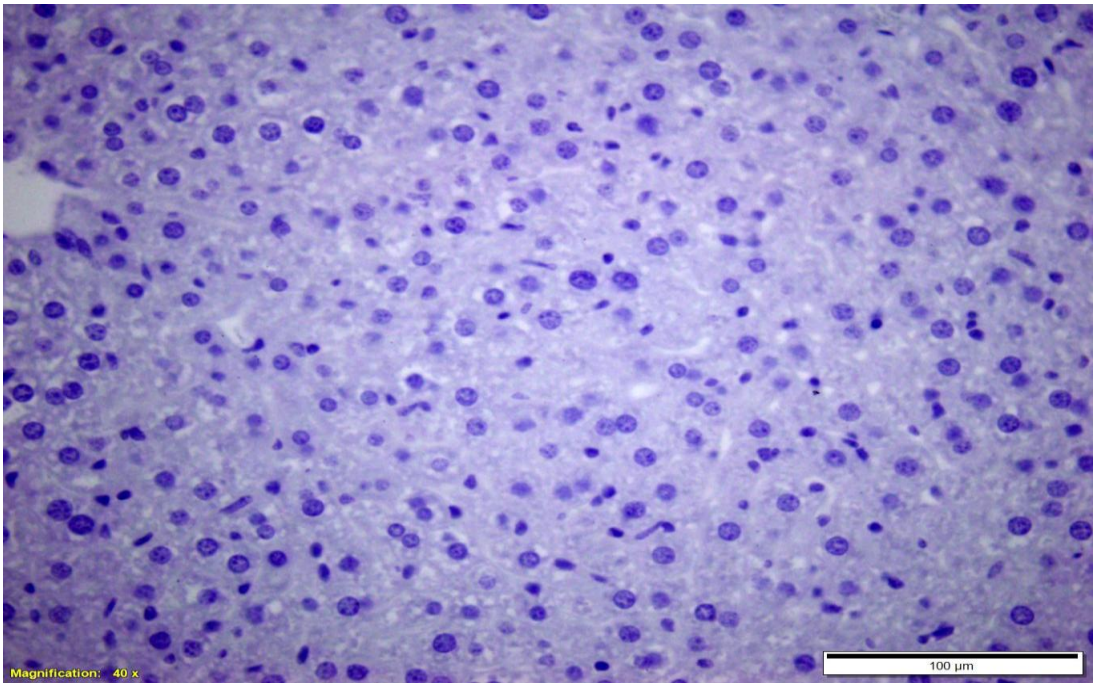
Slika 2. Jetra inficiranog miša soja C57/B6 – HE bojanje (ukupno povećanje 200 x) - fotografirala autorica



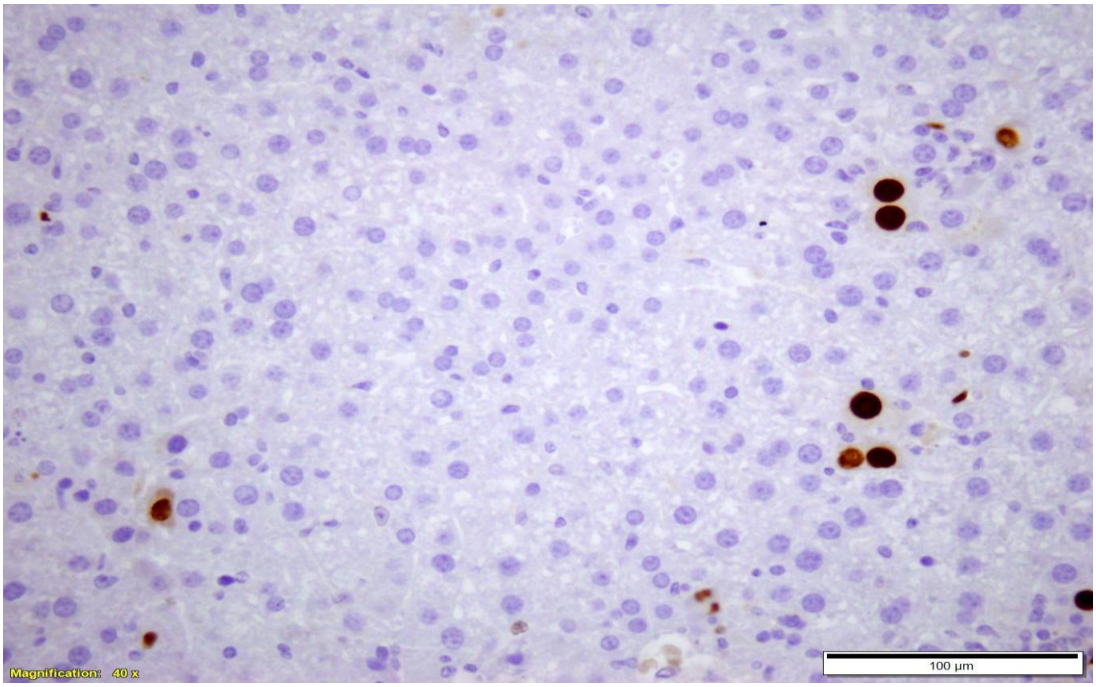
Slika 3. Jetra neinficiranog miša soja IFNαβR KO – HE bojanje (ukupno povećanje 200 x) - fotografirala autorica



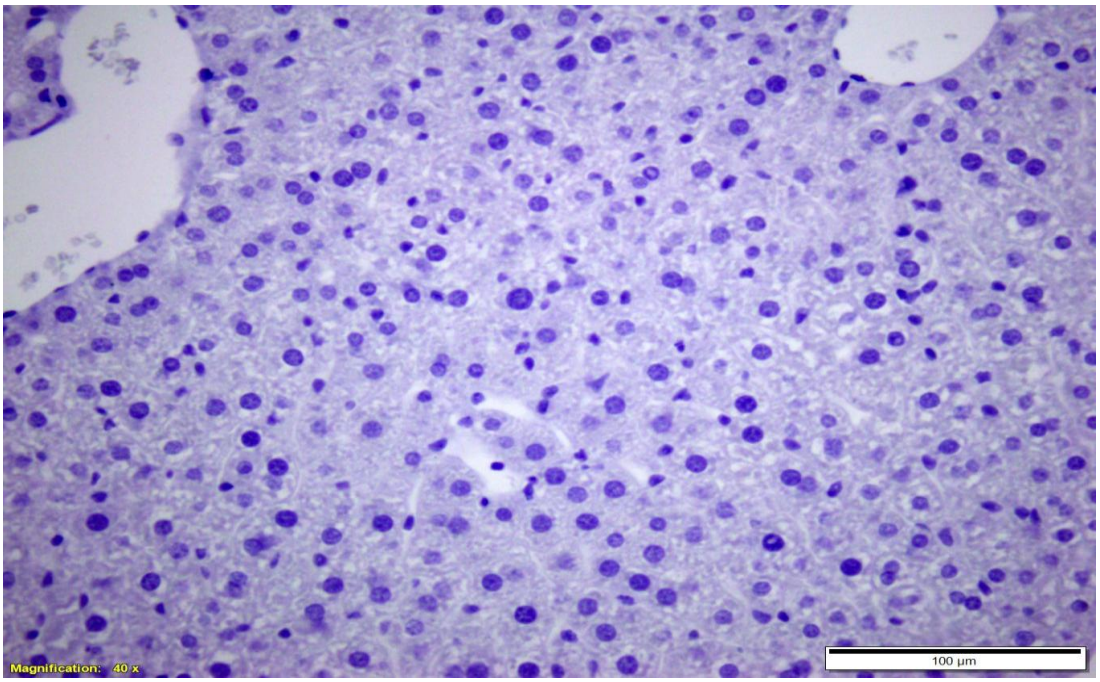
Slika 4. Jetra inficiranog miša soja IFNαβR KO – HE bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica



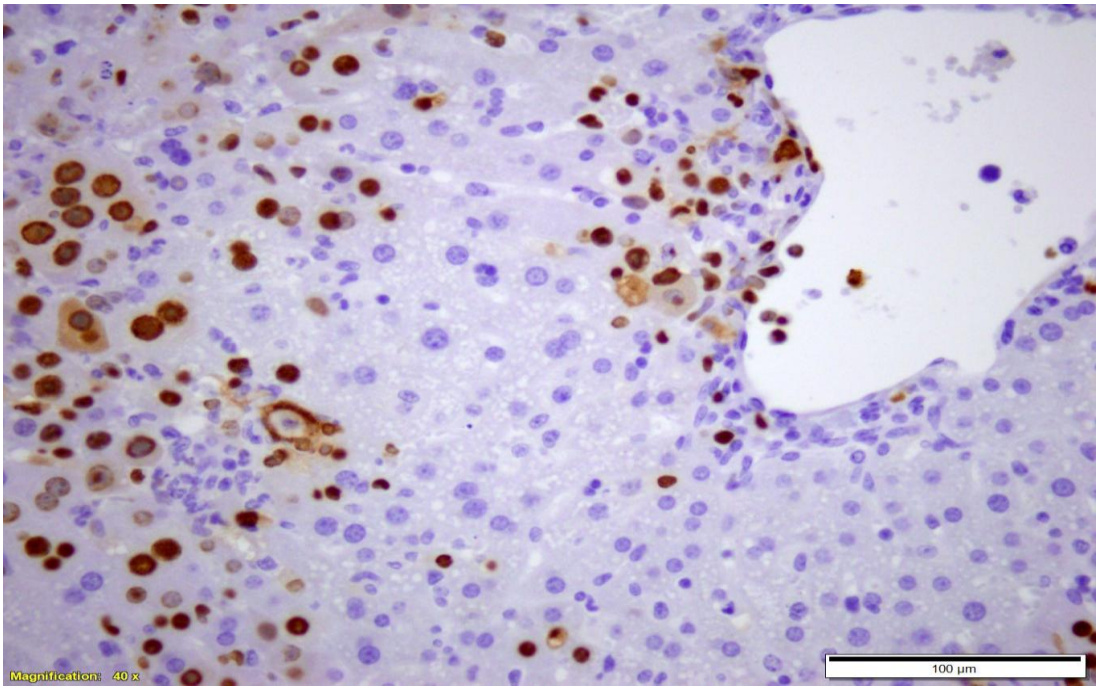
Slika 5. Jetra neinficiranog miša soja C57/B6 – imunohistokemijsko bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica



Slika 6. Jetra inficiranog miša soja C57/B6 – imunohistokemijsko bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica



Slika 7. Jetra neinficiranog miša soja IFNαβR KO – imunohistokemijsko bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica



Slika 8. Jetra inficiranog miša soja IFNαβR KO – imunohistokemijsko bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica

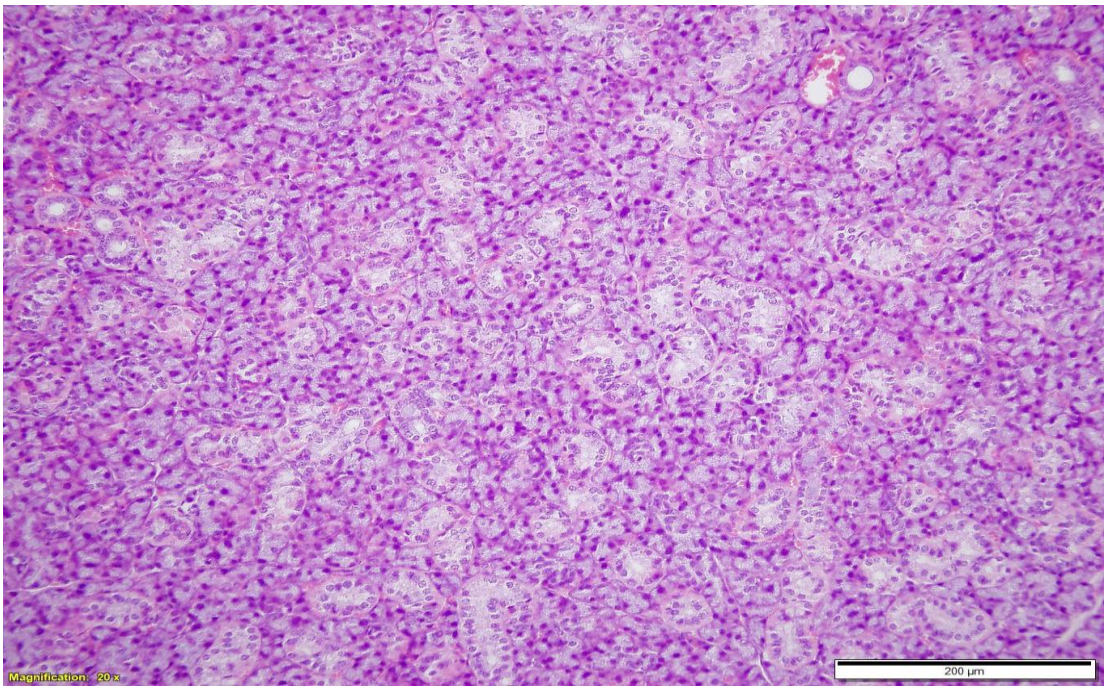
5.2. USPOREDBA UZORAKA ŽLIJEZDA SLINOVNICA INFICIRANIH I NEINFICIRANIH ŽIVOTINJA SOJEVA IFNαβR KO I C57/B6

U preparatima žlijezda slinovnica neinficiranih miševa jasno se raspoznaje režnjasta građa organa, serozni i mukozni sekretorni dijelovi te izvodni kanalići. Također, uočavaju se i intralobularni kanalići unutar režnjića, te interlobularni kanalići u vezivnom tkivu između režnjića (Slika 9, 11).

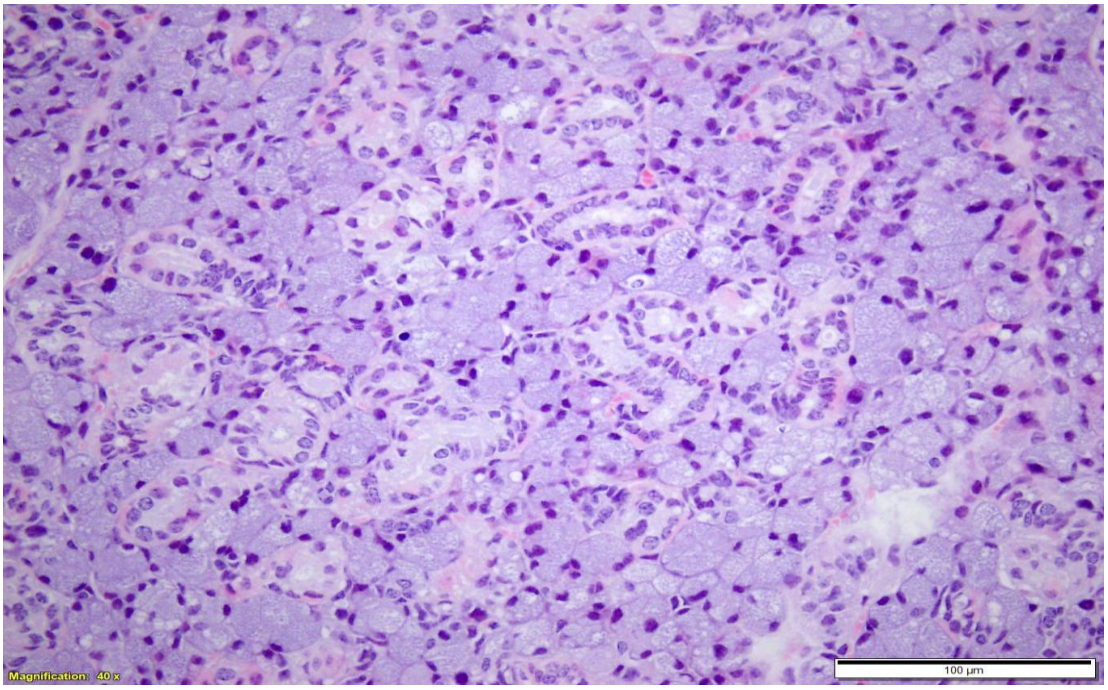
U prikazanom HE preparatu soja C57/B6 inficirane životinje nisu detektirane karakteristične promjene koje izaziva virus (Slika 10), dok se stanice pozitivne na virusni protein pp89 uočavaju kako u interlobularnom vezivnom tkivu tako i unutar samih režnjića (Slika 14).

U HE preparatima soja IFNαβR KO uočavaju se patohistološke promjene uzrokovane virusom. Prisutan je znatan broj stanica s citopatskim učinkom i infiltrata mononuklearnih stanica (Slika 12). Također, uočava se velik broj stanica pozitivnih na virusni protein pp89 (Slika 16).

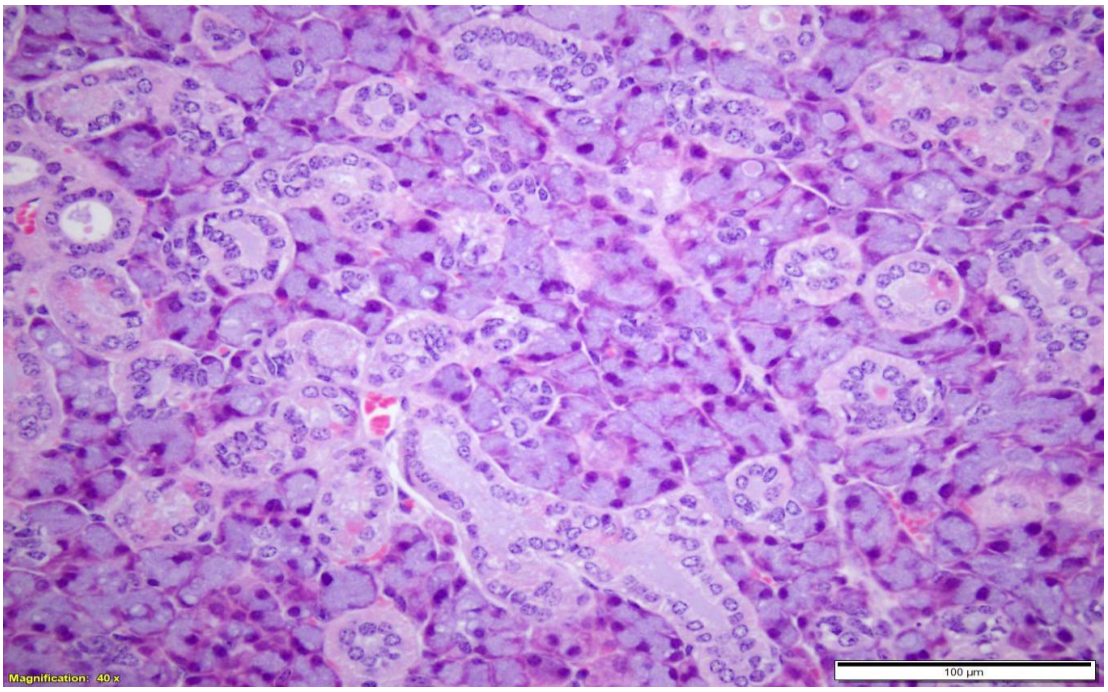
U preparatima žlijezda slinovica neinficiranih miševa sojeva C57/B6 i IFNαβR KO obojanim imunohistološkim bojanjem virusni protein pp89 nije ispoljen (Slika 13,15).



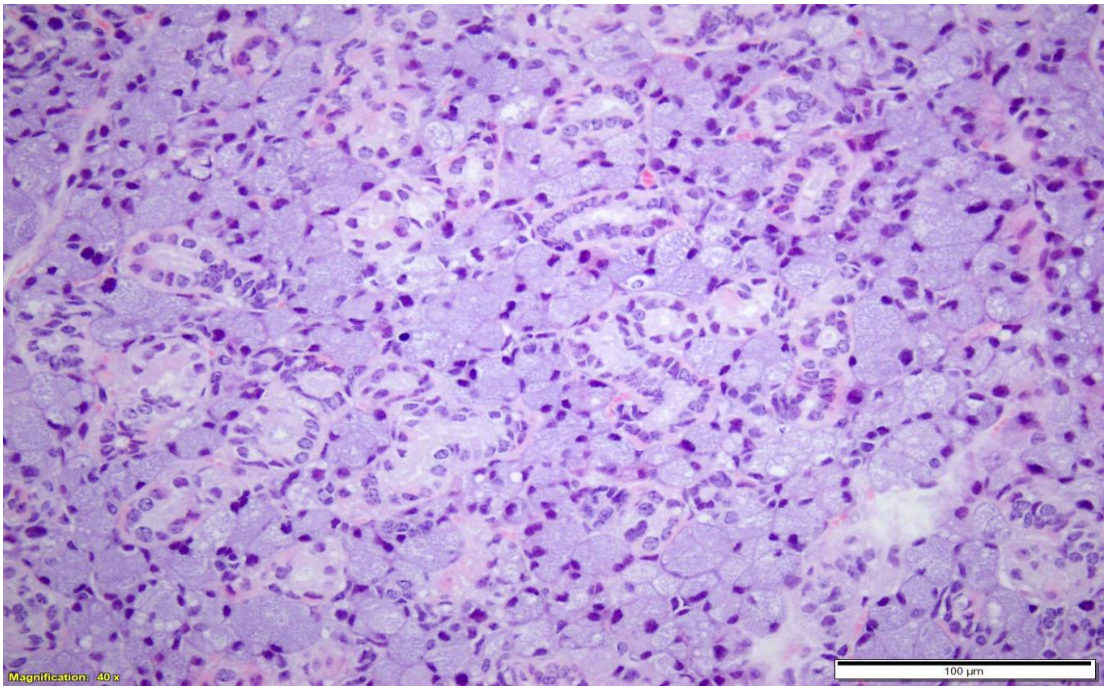
Slika 9. Doušna žlijezda slinovnica neficiranog miša soja C57/B6 – HE bojanje (ukupno povećanje 200 x) - fotografirala autorica



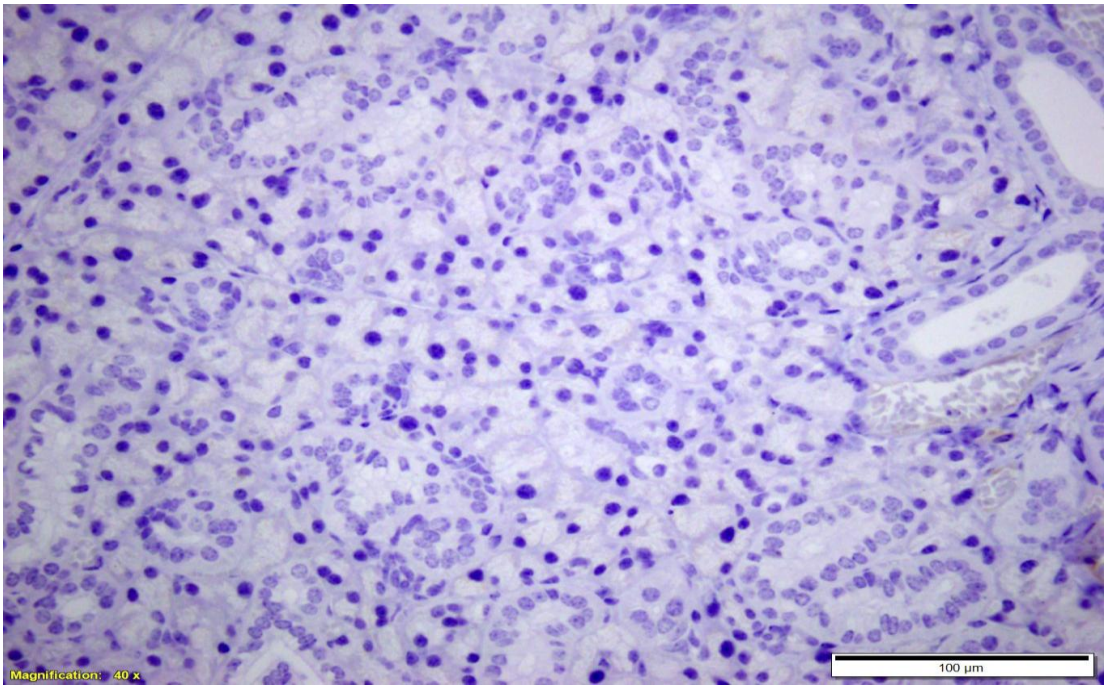
Slika 10. Doušna žlijezda slinovnica inficiranog miša soja C57/B6 – HE bojanje (ukupno povećanje 200 x) - fotografirala autorica



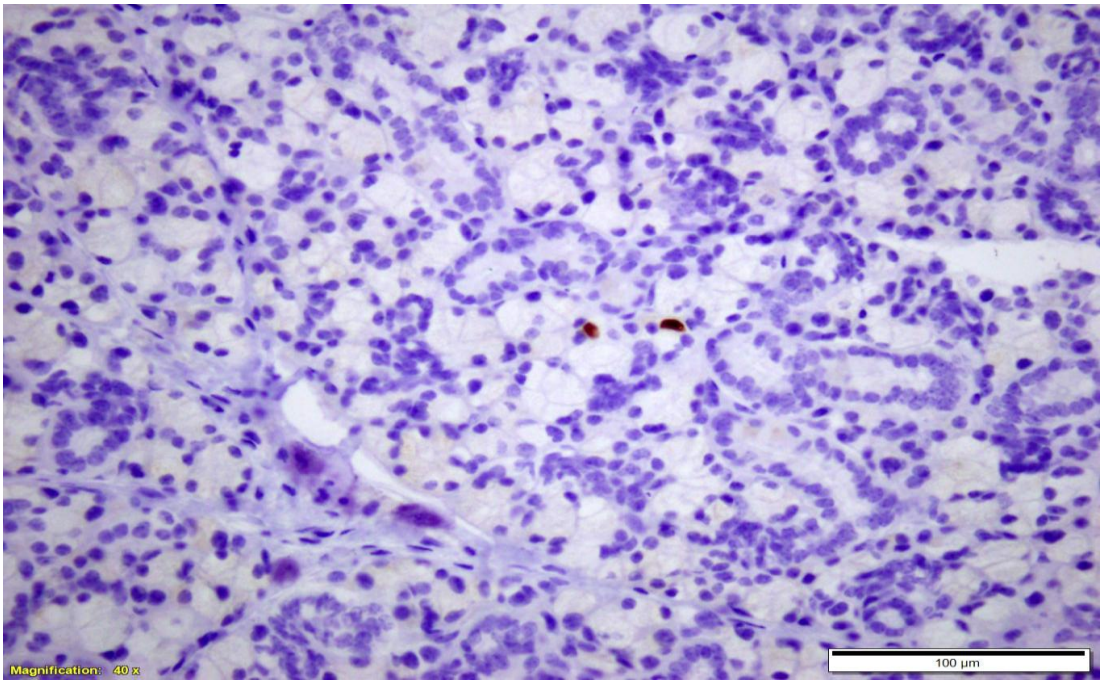
Slika 11. Doušna žlijezda slinovnica neinficiranog miša soja IFNαβR KO – HE bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica



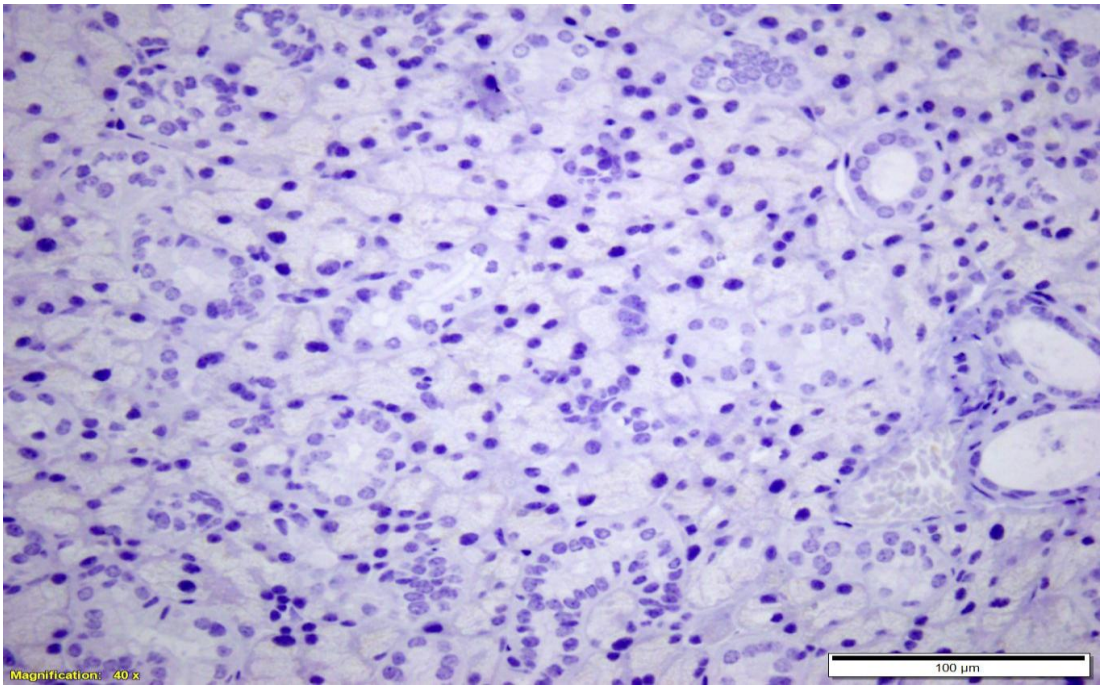
Slika 12. Doušna žlijezda slinovnica inficiranog miša soja IFNαβR KO – HE bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica



Slika 13. Doušna žlijezda slinovnica neinficiranog miša soja C57/B6 – imunohistokemijsko bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica

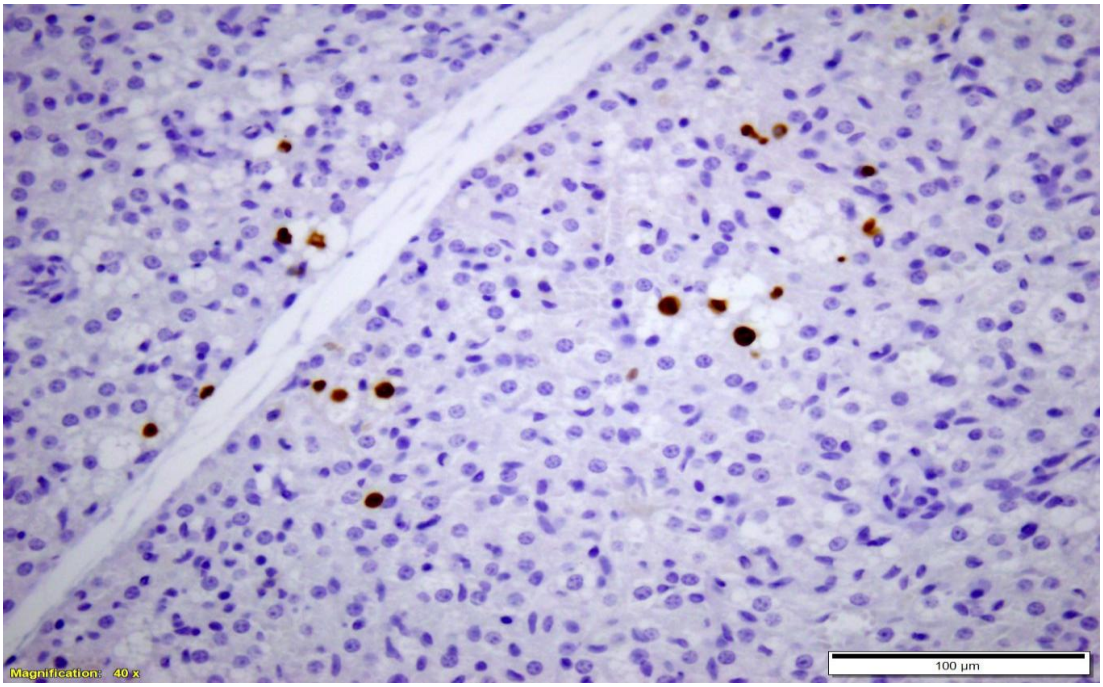


Slika 14. Doušna žlijezda slinovnica inficiranog miša soja C57/B6 – imunohistokemijsko bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica



Slika 15. Doušna žlijezda slinovnica neficiranog miša soja

IFNαβR KO – imunohistokemijsko bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica



Slika 16. Doušna žlijezda slinovnica inficiranog miša soja IFNαβR KO – imunohistokemijsko bojanje (ukupno povećanje 400 x) - fotografirala autorica

6. RASPRAVA

Proučavanje citomegalovirusa važno je područje biomedicinskih istraživanja, zbog njegove velike rasprostranjenosti u humanoj populaciji i opasnosti po život za inficirane imunokompromitirane osobe.

Imunološka kontrola citomegalovirusne infekcije osigurana je različitim strukturama imunološkog sustava. Najvažnija je uloga stanične imunosti i interferona u kontroli primarne MCMV infekcije, čijom aktivnošću se uspostavlja latencija i sprječava ponovna aktivacija virusa. U ovom radu provedena je histološka analiza preparata jetre i žlijezda slinovnica miševa C57/B6 i IFNαβR KO zaraženih citomegalovirusom da bi se utvrdile promjene koje ovaj virus uzrokuje u strukturi pojedinih organa. Rana osjetljivost miševa na infekciju u izravnoj je vezi sa sposobnošću organizma da u odgovor uključi citokine i NK stanice. Soj miševa C57/B6 korišten u ovom radu po ranoj osjetljivosti spada u skupinu MCMV rezistentnih sojeva. Stoga su za eksperiment korišteni novookoćeni miševi, inficirani dan nakon okota, jer, za razliku od humanog, mišji MCMV ne prolazi placentu. Novookoćeni miševi imunološki su nezreli jer su kod njih mnogi tipovi stanica još uvijek u stupnju diferencijacije, pa se prema literaturnim podacima može pretpostaviti da bi kod odraslih, imunokompetentnih miševa infekcija prošla asimptomatski, bez oštećenja organa, dok kod novookoćenih životinja uzrokuje oštećenja (19).

U hemalaun – eozin (HE) preparatima jetre i žlijezda slinovnicama s pozitivnom reakcijom kod soja C57/B6 promjene uzrokovane virusom su eksprimirane s niskim intenzitetom. Naime, detektirane su pojedinačne stanice s citopatskim učinkom te povećani broj mononuklearnih infiltrata.

Da bi se što preciznije analiziralo djelovanje MCMV, proučavani preparati su analizirani i primjenom imunohistokemijske metode (IHC). Pri IHC bojanju, kao primarno protutijelo korišteno je protutijelo specifično za virusni protein pp89, koji je prisutan u jezgri inficiranih stanica u vrijeme virusne replikacije.

U preparatima jetre nakon IHC bojanja detektirane su stanice pozitivne na virusni protein, smještene u skupinama i koje su izrazito povećanih jezgara, dok su pozitivne stanice kod žlijezda slinovnica detektirane u vezivnom i žlijezdanom epitelu.

Miševi soja IFNαβR KO bili su imunodeficijentni s nedostatkom interferonskih receptora alfa i beta. Interferoni djeluju tako da sprječavaju razmnožavanje virusa unutar inficiranih stanica, sprječavaju širenje infekcije na druge stanice i povećavaju djelovanje obrambenih stanica.

U analiziranim preparatima jetre i žlijezda slinovnica uočen je velik broj citomegaličnih stanica i mononuklearnih infiltrata, znatno veći nego kod preparata miševa soja C57/B6. Takva znatna razina uočena je i kod preparata analiziranih imunohistokemijskom metodom.

Može se pretpostaviti da bi u narednim danima infekcije došlo do postupne progresije navedenih promjena, što bi rezultiralo ozbiljnom destrukcijom žljezdanih režnjića i hepatocita, te time i zatajenjem rada organa.

Statistička analiza dobivenih rezultata pokazala je da postoje razlike u načinu na koji virus utječe na pojedine organe inficiranih mišjih sojeva.

Rezultati ovog istraživanja u sukladnosti su sa sličnim istraživanjima o reakciji organizama na infekciju ovisno o aktivnosti NK stanica, čiji su rezultati literaturn dostupni (19).

Iz svega navedenog očito je da postoji znatna potreba za daljnjim istraživanjima, i dalje postoji potreba za daljnjim proučavanjem kako samog tropizma virusa tako i stanica i uvjeta koji omogućavaju njegovu replikaciju *in vivo*, jer ta istraživanja daju velik doprinos razvoju novih strategija u liječenju citomegalovirusne infekcije.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenog istraživanja i analize dobivenih podataka mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U većini preparata jetre i žlijezda slinovnica obojenim HE metodom moguće je detektirati promjene uzrokovane virusom.
2. Za detekciju virusnih proteina inficiranim CMV primjenjuje se imunohistokemijska metoda.
3. Nakon imunohistokemijskog bojenja kojim je detektiran protein pp89 u jezgrama inficiranih stanica analize su pokazale patogeni učinak MCMV na proučavana tkiva.
4. U uzorcima *knock-out* miševa kojima su nedostajali interferonski receptori uočene patohistološke promjene bile su znatno izraženije od promjena kod C57/B6.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog rada bio je na tkivnim uzorcima miševa soja C57/B6 i IFNαβR KO, koji su inficirani citomegalovirusom prvog dana po okotu, ustanoviti prisutnost virusa, odnosno promjene uzrokovanje infekcijom.

Nacrt studije: Istraživanje parova

Ispitanici i metode: Istraživanje je provedeno na miševima soja C57/B6 i IFNαβR KO. Iz svakog soja korištene su po dvije životinje: jedna kontrolna koja je primila samo medij bez virusa i druga koja je inficirana divljim tipom citomegalovirusa. Životinje su žrtvovane četvrtog dana po okotu te im je od jetre i žlijezda slinovnica pripremljeno 14 inficiranih i 14 kontrolnih preparata za daljnje analize. Preparati su tretirani dvjema metodama, rutinskom hemalaun-eozin metodom i imunohistokemijskom metodom. Kod imunohistokemijske metode korišteno je primarno protutijelo Croma 101, mišje monoklonsko protutijelo specifično za virusni fosfoprotein pp89.

Rezultati: Mikroskopskom analizom preparata obojenim hemalaun-eozin metodom u jetri i žlijezdama slinovnicama mogu se uočiti promjene uzrokovane virusom, eksprimirane niskim intenzitetom. Primjenom imunohistokemijskog bojenja preciznije su detektirane promjene uzrokovane virusom, zahvaljujući utvrđivanju mjesta ekspresije virusnog proteina pp89.

Zaključak: Promjene uzrokovane citomegalovirusom znatno su izraženije kod miševa soja IFNαβR KO, koji je imunodeficijentan zbog nedostatka interferonskih receptora, u odnosu na soj C57/B6, kod kojeg je na suzbijanje infekcije djelovala aktivnst interferonskih receptora.

Ključne riječi: citomegalovirus, Croma 101, imunohistokemijska metoda, jetra, žlijezde slinovnice

9. SUMMARY

Histological analysis of the impact of the lack interferon receptors alpha and beta in the knock-out mice infected with cytomegalovirus

Objectives: The aim of this study was to detect the presence of cytomegalovirus on the tissue samples from mice of C57/B6 and IFNαβR KO strains, infected with cytomegalovirus on day one after birth, as well as to detect the changes caused by the infection.

Study Design: Case-control study

Material and methods: The study was performed on mice of C57/B6 and IFNαβR KO strains. Two animals of each strain were used, one as a control, that received only a virus-free medium and another infected with a wild-type cytomegalovirus. The animals were sacrificed on the fourth day after birth, and 14 infected and 14 control tissue samples of liver and salivary glands were prepared for further analysis. Samples were stained using the routine hemalaun-eosin method and specific immunohistochemical staining for cytomegalovirus protein detection where antibody Croma 101, a monoclonal antibody specific for viral phosphoprotein pp89, was used as the primary antibody.

Results: By microscopic analysis of the hemalaun-eosin stained samples of liver and salivary glands, changes can be detected by the viral activity, expressed in low intensity. By using immunohistchemical staining, more specificaly, viral induced changes have been detected due to the determination of the site of expression of the viral protein pp89.

Conclusion: Changes induced by cytomegalovirus are significantly more difficult in the mouse of IFNαβR KO strain that is immunodeficient due to the lack of interferon receptors. In C57/B6 strain interferon receptors have influenced the suppression of infection.

Keywords: cytomegalovirus, Croma 101, immunohistochemical staining, liver, salivary glands

10. LITERATURA

1. Meyding-Lamade U, Strank C. Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients. Ther Adv Neuroal Disord. 2012 Sep; 5(5): 269-296

2. Riley HD Jr. History of cytomegalovirus. South Med J. 1999 Feb; 90(2). 184-90

3. McIntosh M, Hauschild B, Miller V. Human cytomegalovirus and transplantation: drug development and regulatory issues. J Virus Erad. 2016 Jul; 2(3): 143-148

4. Vilibic-Cavlek T, Kolaric B, Ljubin-Sternak S, Kos M, Kaic B, Mlinaric-Galinovic G. Prevalence and dynamics of cytomegalovirus infection among patients undergoing chronic hemodialysis. Indian J Nephrol. 2015 Mar-Apr; 24(2). 95-98

5. Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation Sequencing. Viruses. 2014 Nov; 6(3): 1049-1072

6. Thomtishen JP III. Human cytomegalovirus teguments proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). Virology Journal. 2012; 9:21

7. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus; from bench to bedside. Clin. Microbiol. 2009 Jan; Vol 21, No1: 76-98

8. Beltran PMJ., Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lession from proteomics. Expert Rev Proteomics. 2014 Dec; 11(6): 697-711

9. Nogalski MT., Collins-McMillan D, Yurochko AD. Overview of human cytomegalovirus pathogenesis. Methods Mol Biol. 2014; 1119: 15-28

10. Cannan MJ., Schmid DS., Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristic associated with infections. Rev Med Virol. 2010 Jul; 20(4): 202-203

11. Presečki i sur. Virologija. Medicinska naklada Zagreb, 2002, str. 155-156

12. Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada Zagreb, 2013, str. 381-384

13. Pernjak Pugel E, Cetkinović Đ. Prirođena citomegalovirusna infekcija. Medicina flumensis. 2012: Vol 48, No 1: 21-29

14. Van Zuylen W, Hamilton ST, Naing Z, Hall B, Shand A, Rawlinson WD. Congenital cytomegalovirus infection: Clinical presentation, epidemiology, diagnosis and prevention. Obstet Med. 2014 Dec; 7(4): 140-146

15. Swanson EC, Schleiss MR. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. Pediatric Clin North Am, 2013 Apr; 60(2): 335-49

16. Presečki i sur. Virologija. Medicinska naklada Zagreb, 2002, str. 157-158

17. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Diagnosis of cytomegalovirus infection. Infect Disord Drug Targets. 2011 Oct; 11(5): 466-474

18. Tešković G. Konatalna citomegalovirusna bolest. Pediatric Croat. 2011; 55: 126-158

19. Krmpotic A, Bubic I, Polic B, Lucin P, Jonjic S. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. Microbes Infect. 2003 Nov; 5(13): 1253-77

20. Marušić M. i sur. Imunološko prepoznavanje. Jumena, Zagreb 1990, str. 263-264

21. Anderis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb 1998, str. 162-163

22. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. Školska knjiga, Zagreb 2005, str. 332-344

23. Ohtani O, Ohtani Y. Lymph Circulation in the Liver. The Anatomical Record. 2008; 291: 643-652

24. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije, Školska knjiga, Zagreb 2005, str. 324-328

25. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of moleculas fixatives on downstream staining procedures. Methods. 2014 Nov; 70(1): 12-19

26. Junquieira LC, Carneiro J. Osnove histologije. Školska knjiga, Zagreb 2005, str. 1

27. Sangeeta M, Raja P, Shilpa N, Sahana BN. Tissue processing, our experience in the lab. IOSR-JDMS. 2014 Nov; 2179-0861: 4-5

28. Glavina-Durdov M. Imunohistokemija u istraživanju novotvorina. Sveučilište u Splitu. 2011: 5

29. Wai CC, Ruiting W, Yongwei T. A study on tissue processing. IJRD. 2012; 1839-9053: 39

30. Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. Int J Surg Pathol. 2014; 21(1): 12-32

31. Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K, Palanisamy M.
Applications of immunohistochemistry. J Pharm Bioallied Sci. 2012; 4 (Suppl 2): 307-309

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Tamara Grgurić

Datum i mjesto rođenja: 23. 1. 1992., Rijeka

Adresa: Rešetari 10, 51205 Kastav

Telefon: 051/213-792, 098/174-8185

E-*mail*: tamara_grguric@yahoo.com

PODATCI O STUDIJU

Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku,

Adresa fakulteta: Huttlerova 4, 31 000 Osijek

Telefon: 031/512-800

PODATCI O ŠKOLOVANJU

1998. - 2006.: Osnovna škola *Milan Brozović* Kastav

2006. - 2010.: Prva riječka hrvatska gimnazija – jezični smjer

2010. - 2014.: Preddiplmski stručni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Rijeka