

# UTJECAJ PATOGENOGA PUUMALA I APATOGENOGA TULA ORTOHANTAVIRUSA NA UROĐENI IMUNOSNI ODGOVOR PRIMARNIH MONOCITA I MAKROFAGA

---

**Svoboda, Petra**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:231756>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Petra Svoboda

**UTJECAJ  
PATOGENOGA PUUMALA I  
APATOGENOGA TULA  
ORTOHANTAVIRUSA NA UROĐENI  
IMUNOSNI ODGOVOR PRIMARNIH  
MONOCITA I MAKROFAGA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Petra Svoboda

**THE INFLUENCE OF  
PATHOGENIC PUUMALA AND  
APATHOGENIC TULA  
ORTHOHANTAVIRUS ON THE INNATE  
IMMUNE RESPONSE OF PRIMARY  
MONOCYTES AND MACROPHAGES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022

Ovaj doktorski rad je izrađen u Odjelu za znanstvena istraživanja Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Lidijske Cvetko Krajinović, znanstvene suradnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad je izrađen uz potporu Hrvatske zaklade za znanost u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Innate immunity to Hantaviruses“ (IP-2013-11-4393, voditeljica prof. dr. sc. Alemka Markotić, dr. med.), uz potporu Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske u sklopu projekta Znanstveni centar izvrsnosti „Centre of excellence for Research in Viral Immunology and the Development of New Vaccines (CerVirVac)“ (voditelj prof. dr. sc. Stipan Jonjić, dr. med.) te uz potporu Europskog fonda za regionalni razvoj u sklopu projekta „Jačanje kapaciteta Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva (CerVirVac)“ (KK.01.1.1.01.0006, voditelj prof. dr. sc. Stipan Jonjić, dr. med.).

Manji dio istraživanja proveden je u suradnjama s dr. sc. Denisom Polančecom (Odjel za translacijsku medicinu, Dječja Bolnica Srebrnjak, Zagreb; očitavanje uzoraka i prikupljanje podataka na protočnom citometru) te s dr. sc. Vesnom Eraković Haber i dr. sc. Martinom Bosnar (Odjel za translacijska istraživanja i povezivanje, Fidelta d.o.o., Zagreb; očitavanje uzoraka i prikupljanje podataka na uređaju Luminex 200).

**INFORMACIJE O MENTORICI:** dr. sc. Lidija Cvetko Krajinović, znanstvena suradnica

Lidija Cvetko Krajinović rođena je 1976. godine u Zagrebu. Diplomirala je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2001. godine na studiju biologije, smjer: molekularna biologija. Na istom je fakultetu doktorirala 2014. godine s disertacijom pod naslovom "Rane imunoreakcije u mononuklearnim stanicama periferne krvi uzrokovane virusom Puumala". U znanstveno zvanje znanstvene suradnice izabrana je 2015. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u znanstvenom području biomedicine i zdravstva, polje temeljne medicinske znanosti.

Od 2002. do 2005. radila je u Imunološkom zavodu u Zagrebu. Od 2006. do danas zaposlena je u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu u Odjelu za znanstvena istraživanja, prvo kao znanstveni novak, kasnije kao poslijedoktorand, a od 2016. kao molekularni biolog - dr. sc.. Tijekom pandemije COVID-19 obnašala je funkciju zamjenice koordinatora za dijagnostiku COVID-19 u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Tijekom svog rada bila je na nekoliko stručnih usavršavanja - Haartman institut Sveučilišta u Helsinkiju, Finska (2003.), Istituto Clinico Humanitas, Italija (2012.) te The Lautenberg Center for General and Tumor Immunology, The Hebrew University, Izrael (2015.).

Znanstveno područje rada je istraživanje imunobiologije i patogeneze virusnih infektivnih bolesti, s osobitim naglaskom na infekcije uzrokovane ortohantavirusima i virusom SARS-CoV-2; molekularna epidemiologija zoonoza i vektorom prenosivih bolesti; molekularna dijagnostika infektivnih bolesti.

Aktivno je učestvovala u radu preko 20 znanstvenih i stručnih projekata. Znanstvena aktivnost uključuje 12 znanstvenih radova u časopisima koji su citirani u bazi podataka Web of Science (WoS), 4 rada u časopisima koji su citirani u bazi podataka Scopus, 4 stručna rada, 2 poglavlja u knjizi te >70 sažetaka kongresnih priopćenja. Ukupni broj citata je 223, a h-index je 8 iz baze WoS. Održala je deset pozvanih predavanja. Mentorstvo uključuje vođenje jednog rada za nagradu Rektora i trenutno je voditeljica dviju doktorskih disertacija.

Suradnik je u nastavi na Poslijediplomskom specijalističkom studiju infektologije (2008.-2012.) i studiju epidemiologije (2012.-danas) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na Diplomskom studiju forenzike Sveučilišta u Splitu (2011.-2018.). Kroz različite tečajeve radila je na edukaciji zdravstvenih i nezdravstvenih djelatnika po pitanjima biosigurnosti i biozaštite pri radu s opasnim uzročnicima infektivnih bolesti. Članica je Hrvatskog imunološkog društva, Hrvatskog društva za infektivne bolesti, Hrvatskog društva za biosigurnost i biozaštitu, Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti.

**ZAHVALA**

**UTJECAJ PATOGENOGA PUUMALA I APATOGENOGA TULA  
ORTOHANTAVIRUSA NA UROĐENI IMUNOSNI ODGOVOR PRIMARNIH  
MONOCITA I MAKROFAGA**

PETRA SVOBODA

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

Virusi Puumala (PUUV) i Tula (TULV) su RNA virusi koji pripadaju rodu *Orthohantavirus* (HTV) porodice *Hantaviridae*. Virus PUUV patogeni je virus koji uzrokuje hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom, dok se virus TULV smatra apatogenim virusom. Cilj ovog istraživanja bio je dugotrajnom infekcijom ispitati elemente urođenog imunosnog odgovora primarnih monocita/makrofaga inficiranih patogenim ili apatogenim ortohantavirusom u uvjetima *in vitro*. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajne razlike u obrascu ekspresije gena koji kodiraju sintezu proupalnih citokina i kemokina, kao i razlike u koncentracijama pojedinih modulatora biološkog odgovora u ranoj (1 – 24 h od infekcije) i kasnoj (48 h – 7 dana) fazi infekcije. Analiza ekspresije staničnih diferencijacijskih molekula na monocitima/makrofagima tijekom kultivacije pokazala je smanjenje ekspresije molekula CD14 i HLA-DR uz značajno povećanu ekspresiju molekule CD206. U ovom radu prvi su puta dokazane značajne razlike u urođenom imunosnom odgovoru na apatogeni virus TULV u usporedbi s patogenim virusom PUUV. Rezultati ovog rada ukazuju na kompleksnost molekularnih mehanizama urođene imunosne reakcije posredovane monocitima/makrofagima u infekciji patogenim i apatogenim ortohantavirusima.

(191 stranica, 31 slika, 6 tablica, 407 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *ortohantavirusi, virus Puumala, virus Tula, monociti, makrofagi, imunosni odgovor, urođena imunost, ekspresija gena, ekspresija površinskih molekula, citokini, kemokini, hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom*

Mentor: dr. sc. Lidija Cvetko Krajinović, znanstvena suradnica

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Snježana Židovec Lepej, znanstvena savjetnica

izv. prof. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju

izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

**THE INFLUENCE OF PATHOGENIC PUUMALA AND APATHOGENIC TULA  
ORTHOHANTAVIRUS ON THE INNATE IMMUNE RESPONSE OF PRIMARY  
MONOCYTES AND MACROPHAGES**

PETRA SVOBODA

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

Puumala (PUUV) and Tula (TULV) are RNA viruses, belonging to the genus *Orthohantavirus* (HTV), family *Hantaviridae*. Puumala virus is a pathogenic virus that causes hemorrhagic fever with renal syndrome, while TULV is considered to be an apathogenic virus. The aim of this long-term *in vitro* study was to examine the elements of the innate immune response of primary monocytes/macrophages infected with pathogenic or apathogenic orthohantavirus. The results of this research showed significant differences in the expression pattern of genes encoding the synthesis of pro-inflammatory cytokines and chemokines, as well as differences in the concentrations of certain biological response modulators in the early (1-24 h from infection) and late (48 h-7 days) phase of infection. Analysis of the expression of cell differentiation molecules on monocytes/macrophages during cultivation showed a decrease in the expression of CD14 and HLA-DR molecules with a significantly increased expression of the CD206 molecule. We demonstrated here, for the first time, significant differences in the innate immune response to the apathogenic TULV compared to the pathogenic PUUV. The results of this work indicate the complexity of the molecular mechanisms of the innate immune reaction mediated by monocytes/macrophages in infection with pathogenic and apathogenic orthohantaviruses.

(191 pages, 31 figures, 6 tables, 407 references, original in Croatian)

*Keywords: orthohantaviruses, Puumala virus, Tula virus, monocytes, macrophages, immune response, innate immunity, gene expression, surface molecules expression, cytokines, chemokines, hemorrhagic fever with renal syndrome*

Supervisor: Lidija Cvetko Krajinović, PhD, Scientific Associate

Reviewers: Associate professor Snježana Židovec Lepej, PhD, Scientific Advisor

Associate professor Andreja Ambriović Ristov, PhD, Scientific Advisor

Associate professor Maja Matulić, PhD



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Definicija problema</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Svrha i cilj rada</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Radne hipoteze</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. Zadaci rada i metodologija istraživanja</b> .....	<b>5</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1. Ortohantavirusi</b> .....	<b>7</b>
2.1.1. Molekularna i stanična biologija ortohantavirusa.....	9
2.1.2. Hantavirusni i ortohantavirusni rezervoari te patogenost ortohantavirusa .....	13
<b>2.2. Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS)</b> .....	<b>21</b>
2.2.1. Epidemiologija i rasprostranjenost HVBS-a i HCPS-a .....	21
2.2.2. Klinička slika, liječenje i profilaksa HVBS-a.....	24
2.2.3. Patogeneza HVBS-a .....	27
<b>2.3. Urođeni imunosni sustav</b> .....	<b>29</b>
2.3.1. Monociti.....	30
2.3.1.1. Monocitne subpopulacije.....	31
2.3.1.2. Aktivacija monocita.....	34
2.3.2. Monocitni makrofagi .....	36
2.3.2.1. Aktivacija, vrste i funkcije monocitnih makrofaga .....	36
2.3.3. Dendritičke stanice .....	38
2.3.3.1. Vrste i funkcije dendritičkih stanica.....	38
2.3.3.2. Aktivacija dendritičkih stanica .....	39
<b>2.4. Imunoreakcije urođene imunosti na infekcije ortohantavirusima</b> .....	<b>40</b>
2.4.1. Imunoreakcije stanica urođene imunosti .....	40
2.4.2. Imunoreakcije solubilnih komponenti urođene imunosti .....	42
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1. Materijali</b> .....	<b>44</b>
3.1.1. Stanice.....	44
3.1.2. Virusni sojevi .....	44
3.1.3. Mediji i dodaci medijima.....	44

3.1.4. Osnovne kemikalije .....	45
3.1.5. Otopine i puferi .....	46
3.1.6. Reagensi i kompleti .....	47
3.1.7. Protutijela.....	52
3.1.8. Početnice.....	53
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>53</b>
3.2.1. Uzgoj virusnih štokova .....	53
3.2.2. Prikupljanje uzoraka .....	53
3.2.3. Izolacija primarnih monocita.....	54
3.2.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi na gradijentu gustoće.....	54
3.2.3.2. Magnetska separacija monocita iz mononuklearnih stanica periferne krvi.....	55
3.2.3.3. Određivanje čistoće izoliranih monocita.....	56
3.2.4. Infekcija monocita ortohantavirusima i uspostava dugotrajne kultivacije primarne kulture monocita .....	56
3.2.5. Indirektna imunofluorescencija za praćenje uspješnosti infekcije .....	57
3.2.6. Praćenje kinetike infekcije monocita i određivanje razine ortohantavirusne RNA .....	59
3.2.6.1. Izolacija ukupne RNA iz supernatanta i stanica.....	59
3.2.6.2. Reverzna transkripcija .....	59
3.2.6.3. Dizajn specifičnih početnica i standarada za virus PUUV i TULV .....	60
3.2.6.4. Kvantitativni PCR (qPCR) .....	61
3.2.7. Određivanje relativne ekspresije gena urođenog imunskog odgovora .....	62
3.2.7.1. Prikupljanje stanica nakon infekcije za analizu genske ekspresije .....	62
3.2.7.2. Izolacija ukupne RNA iz stanica .....	62
3.2.7.3. Određivanje kvalitete RNA .....	63
3.2.7.4. Uklanjanje genomske DNA i sinteza prvog lanca cDNA .....	63
3.2.7.5. qPCR array .....	63
3.2.8. Multiparametrijska imunofenotipizacija monocita/makrofaga pri određivanju ekspresije staničnih površinskih molekula .....	64
3.2.8.1. Sastavljanje višebojnog panela protutijela .....	64
3.2.8.2. Titracija protutijela i boje za vijabilnost.....	64
3.2.8.3. Postupak odvajanja stanica od površine na kojoj rastu nakon infekcije .....	67
3.2.8.4. Priprema uzoraka za imunofenotipizaciju.....	67
3.2.8.5. Analiza na protočnom citometru .....	68
3.2.8.6. Analiza podataka u računalnom programu FlowJo.....	69

3.2.9. Određivanje koncentracije solubilnih komponenti nespecifične imunosti u supernatantu .....	71
3.2.9.1. Pojedinačni i multipleks imunotestovi na bazi magnetskih mikrokuglica .....	71
3.2.10. Testiranje na mikoplazme .....	72
3.2.11. Statistička i bioinformatička analiza podataka .....	72
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1. Uspostava dugotrajne infekcije monocita ortohantavirusima .....</b>	<b>74</b>
4.1.1. Kinetika infekcije primarnih monocita ortohantavirusima .....	74
4.1.2. Uspješnost infekcije primarnih monocita ortohantavirusima .....	76
<b>4.2. Imunosni odgovor primarnih monocita na infekciju patogenim ili apatogenim ortohantavirusom .....</b>	<b>79</b>
4.2.1. Rani imunosni odgovor primarnih monocita na infekciju .....	79
4.2.1.1. Koncentracija citokina i kemokina u supernatantu tijekom faze ranog uođenog imunosnog odgovora primarnih monocita .....	79
4.2.1.2. Promjene u genskoj ekspresiji tijekom faze ranog uođenog imunosnog odgovora primarnih monocita .....	84
4.2.2. Kasni imunosni odgovor primarnih monocita na infekciju .....	90
4.2.2.1. Koncentracija citokina i kemokina u supernatantu tijekom faze kasnog uođenog imunosnog odgovora primarnih monocita .....	90
4.2.2.2. Promjene u genskoj ekspresiji tijekom faze kasnog uođenog imunosnog odgovora primarnih monocita .....	93
<b>4.3. Diferencijacija monocita kao odgovor na infekciju patogenim ili apatogenim ortohantavirusom .....</b>	<b>98</b>
4.3.1. Multiparametrijska imunofenotipizacija monocita/makrofaga metodom protočne citometrije za određivanje ekspresije staničnih površinskih molekula .....	98
4.3.1.1. Morfologija monocita tijekom praćenja infekcije .....	99
4.3.1.2. Ekspresija staničnih površinskih molekula monocita, makrofaga i dendritičkih stanica .....	101
4.3.1.3. Postotak površinske ekspresije molekula/biljega CD14 i CD16 na membrani inficiranih monocita i stanica MDM/MDDC .....	107
4.3.2. Diferencijacija monocita i promjene u genskoj ekspresiji .....	109
<b>4.4. Individualni odgovor donora na infekciju patogenim ili apatogenim ortohantavirusom .....</b>	<b>110</b>
4.4.1. Individualne razlike donora u viremiji .....	110
4.4.2. Individualne razlike donora u koncentraciji solubilnih komponenti .....	111

4.4.3. Individualne razlike donora u genskoj ekspresiji .....	115
<b>4.5. Analiza bioloških procesa i mreže interakcija molekula .....</b>	<b>119</b>
<b>4.6. Biomarkeri u patogenoj u odnosu prema apatogenoj infekciji.....</b>	<b>128</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>130</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>152</b>
<b>7. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>154</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>182</b>
8.1. Popis kratica.....	182
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>189</b>

## 1. UVOD

Ortohantavirusi (HTV), rod *Orthohantavirus*, obitelj *Hantaviridae*, red *Bunyavirales*, su emergentni, trisegmentni RNA virusi s ovojnicom, jednolančanog minus lanca, koji uzrokuju hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS) u Euroaziji, sa širokim rasponom kliničke prezentacije od asimptomatske i blage bolesti do teške bolesti s mogućim smrtnim ishodom (Vaheiri, Strandin, i ostali 2013; Adams i ostali 2017). Rezervoari HTV sitni su glodavci s perzistentnom asimptomatskom infekcijom. Infekcije u ljudi posljedica su udisanja inficiranog aerosola virusom zagađenih izlučevina glodavaca (urin, feces i slina) te variraju od sporadičnih slučajeva u neepidemijskom razdoblju do pojave epidemija svakih nekoliko godina (Vaheiri, Strandin, i ostali 2013). U Europi, kao i u Hrvatskoj, postoji nekoliko vrsta HTV-ova (A Markotić i ostali 2002; Ante Tadin i ostali 2012). Virus Puumala (PUUV) i Dobrava (DOBV) su patogeni za ljude i imaju medicinski značaj (Avšič Županc, Korva, i Markotić 2014). Virus Puumala uzrokuje blage i srednje teške oblike bolesti, te je uzrok većine dosad zabilježenih epidemija. Virus Tula (TULV) i virus Kurkino su također dokazani u Hrvatskoj, ali im je medicinski značaj trenutno nepoznat ili nedostavno istražen (Scharninghausen i ostali 2002; Plyusnina i ostali 2009; Klempa i ostali 2013). Infekcija čovjeka virusom TULV je dokazana u samo četiri bolesnika (Klempa i ostali 2003; Zelená, Mrázek, i Kuhn 2013; Reyes i ostali 2015; Hofmann i ostali 2021).

Još uvijek su nedostavno istraženi imunopatogenetski mehanizmi kojima HTV u ljudi uzrokuju bolest. Smatra se kako je patogenezna HVBS-a uglavnom posredovana imunim odgovorom organizma. Tzv. „citokinska oluja“ prije se smatrala kao jedan od glavnih uzroka nastanka simptoma tijekom razvoja HVBS-a jer su u serumu, urinu i tkivima bolesnika pronađene povećane vrijednosti proinflammatoryh citokina, prvenstveno interleukina (IL)-1, IL-6 i čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) tijekom akutne faze bolesti (Krakauer, Leduc, i Krakauer 1995; Linderholm i ostali 1996). Urođena imunost prva je linija obrane od različitih patogena te može značajno odrediti daljnji razvoj i ishod infekcije i bolesti. Imunopatogenetska istraživanja otežana su jer ne postoje animalni modeli za istraživanje HVBS-a kao niti učinkoviti antivirusni lijekovi ili cjepiva (Schönrich i ostali 2008). Cvetko Krajinović 2014. je pokazala supresiju ranog imunskog odgovora, perifernih mononuklearnih stanica u bolesnika inficiranih virusom PUUV, na razini ekspresije gena važnih za sintezu receptora za prepoznavanje općih struktura (PRR), kemokina i njihovih receptora, citokina, čimbenika transkripcije, kao i nekih signalnih molekula.

Monociti se diferenciraju iz pluripotentnih krvotvornih matičnih stanica u koštanoj srži. Nakon izlaska iz koštane srži, u krvotoku se zadržavaju oko jedan do četiri dana te dio njih prelazi u tkiva (Ginhoux i Jung 2014). U prosjeku čine oko 8 – 10% populacije leukocita u ljudskoj perifernoj krvi. Imaju primarnu ulogu u urođenom imunom odgovoru, u fagocitiranju svih čestica sa svojstvima antigena (npr. virusi, bakterije) te značajnu ulogu u predočavanju antigena drugim stanicama urođene i stečene imunosti. Cirkulirajući monociti heterogena su skupina stanica koja može djelovati proupalno ili protuupalno ovisno o utjecaju raznih čimbenika upale iz mikrookoliša. Klasificiraju se u tri subpopulacije: klasični ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ); intermedijerni ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) te neklasični ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) (L. Ziegler-Heitbrock i ostali 2010a). Monociti koji tijekom upale i infekcije pod utjecajem kemokina i komplementa iz cirkulacije, prelaze u tkiva nazivamo monocitnim makrofagima (MDM, od engl. *monocyte-derived macrophages*) (Ginhoux i Jung 2014). Monocitni makrofagi također su heterogena populacija potentnih fagocita koji predočuju antigene drugim stanicama urođene i stečene imunosti. Pod utjecajem signala iz mikrookoliša dolazi do funkcionalne aktivacije MDM-a. Proupalna aktivacija (M1) stanica MDM događa se pod utjecajem interferona ( $IFN-\gamma$ ), lipopolisaharida (LPS) te čimbenika stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF, od engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), koji dalje potiču lučenje proupalnih citokina (npr.  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-12$ ,  $IL-18$ ). Fenotipski M1 MDM eksprimiraju visoke razine molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti razreda II (MHC II), CD68 te kostimulatornih molekula CD40 i CD86 (Chávez-Galán i ostali 2015). Protuupalna aktivacija (M2) stanica MDM javlja se sa svrhom rješavanja upalnog procesa. M2 MDM sudjeluju u popravku tkiva, angiogenezi i alergijskim bolestima (Chávez-Galán i ostali 2015). Aktivacija u M2 subpopulaciju događa se pod utjecajem čimbenika stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF, od engl. *macrophage colony-stimulating factor*),  $IL-4$ ,  $IL-13$ ,  $IL-10$ , transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta 1$  ( $TGF-\beta 1$ , od engl. *transforming growth factor  $\beta 1$* ) te izlučujući  $IL-10$  u visokim koncentracijama, a  $IL-12$  u malim količinama. Fenotipski, M2 MDM eksprimiraju visoke razine molekula CD206, CD200R, CD301a/b te niske razine MHC II (Chávez-Galán i ostali 2015). Budući da su MDM izrazito plastične stanice, podjela u opisane podtipove predstavlja krajnje točke pojedinog aktivacijskog stanja koji vrijede u uvjetima *in vitro*, dok *in vivo* zadržavaju mogućnost promjene svojeg aktivacijskog stanja (Martinez i Gordon 2014). Postoje i tkivni makrofagi (od engl. *tissue-resident macrophages*) poput Kupffer-ovih stanica u jetri, mikroglija u mozgu, alveolarnih makrofaga u plućima, peritonealnih makrofaga u seroznim šupljinama te ostalim organima i tkivima (Andreis et al.

2009). Monociti i makrofagi imaju ključne, ali različite uloge u homeostazi tkiva i imunitetu (Martinez i ostali 2006). Monociti su ključni stanice tijekom upale i infekcije, dok tkivni makrofagi imaju važne funkcije u razvoju i homeostazi tkiva te rješavanju upale (Ginhoux i Jung 2014). Dendritičke stanice (DC, od engl. *dendritic cells*) povezuju urođeni i stečeni imunostani sustav (Guilliams i ostali 2014) jer su ključne za prezentaciju peptida i proteina T- i B- limfocitima te ih također ubrajamo u antigen prezentirajuće stanice (Polanec 2011). Postoji nekoliko različitih populacija DC, plazmocitoidne (pDC) i mijeloidne (cDC), koje se dalje mogu podijeliti u subpopulacije ovisno o ekspresiji molekula CD141 i CD1c na svojoj površini.

### **1.1. Definicija problema**

Iako su monociti, monocitni makrofagi i DC važne stanice urođenog imunostanog sustava još uvijek nije razjašnjena njihova funkcija i uloga tijekom infekcije ortohantavirusima. Primarni monociti jedne su od ciljnih stanica za HTV. Pri infekciji se ne javlja citopatski učinak, a pretpostavlja se da te stanice mogu poslužiti kao „rasadnik“ virusa i tako doprinijeti diseminaciji virusa u organizmu i infekciji susjednih endotelnih stanica te razvoju bolesti (Alemka Markotić i Schmaljohn 2008). Kao odgovor na infekciju ortohantavirusima monocitni makrofagi luče proupalne citokine. Pokazano je kako ljudski alveolarni makrofagi zaraženi visokopatogenim ortohantavirusima mogu proizvoditi niske razine TNF- $\alpha$  i GM-CSF-a (Khaiboullina i ostali 2000; Alemka Markotić i ostali 2007a). Također je pokazano kako virus PUUV u monocitnim makrofagima inducira vrlo niske koncentracije IFN- $\alpha$  detektirane u kasnijoj fazi infekcije (5 – 7 dana nakon infekcije), ali potiče proizvodnju antivirusnog proteina MxA (Temonen i ostali 1995). Zreli monocitni makrofagi bili su osjetljiviji na infekciju virusom PUUV te su proizvodili više virusa (Temonen i ostali 1995). Prijašnja istraživanja su pokazala kako HTV induciraju različit imunostani odgovor u monocitnim makrofagima i u ljudskoj monomijelocitnoj staničnoj liniji (THP-1) te tako stanice THP-1, kao modelne stanice za primarne monocite, nisu pogodne u istraživanju HTV (Alemka Markotić i ostali 2007a). Visokopatogeni HTV-ovi su potaknuli lučenje  $\beta$ -kemokina (CCL3, CCL4, CCL5) u primarnim kulturama monocitnih makrofaga te povećali gensku ekspresiju njihovih receptora (CCR1, CCR5), dok su zaražene stanice THP-1 izlučivale samo niske količine  $\beta$ -kemokina, ali poticale ekspresiju receptora za CXC kemokine (Alemka Markotić i ostali 2007a). Nakon infekcije apatogenim virusom TULV monocitni makrofagi lučili su većinom kemokine (CXCL8, CCL2, CCL4) bez značajne proizvodnje citokina

(Cebalo i Markotić 2007). Moguće da zbog ulaska virusa u stanice preko različitih receptora (integrin  $\alpha_V\beta_3$  za patogene i integrin  $\alpha_5\beta_1$  za apatogene HTV-ove) dolazi do aktivacije različitih unutarstaničnih signalnih puteva (Cebalo i Markotić 2007). Štoviše, pokazano je kako monocitni makrofagi inficirani visokopatogenim HTV-om prolaze morfološke promjene u smjeru razvoja monocitnih DC-ova uz povećanu ekspresiju ko-stimulatornih molekula (Alemka Markotić i ostali 2007a). Inficirane nezrele monocitne DC imaju povećanu ekspresiju ko-stimulatornih, adhezijskih i molekula MHC II (Raftery i ostali 2002a). Ortohantavirusima zaražene DC mogu također sudjelovati u transportu virusa do regionalnih limfnih čvorova, gdje mogu dalje zaraziti druge stanice imunskog sustava (Raftery i ostali 2002a).

## **1.2. Svrha i ciljevi rada**

Svrha ovog istraživanja je ispitati i usporediti elemente urođenog imunskog odgovora primarnih stanica ljudskih monocita/makrofaga na infekciju patogenim ili apatogenim ortohantavirusom (PUUV ili TULV) te potencijalne razlike tijekom rane i kasne faze infekcije.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Detektirati promjene u genskoj ekspresiji glavnih komponenti urođenog imunskog odgovora primarnih monocita/makrofaga na infekcije patogenim ili apatogenim ortohantavirusom.
2. Analizirati ekspresiju pojedinih površinskih biljega primarnih monocita/makrofaga važnih za njihovu aktivaciju, diferencijaciju te interakciju s drugim stanicama urođene i stečene imunosti te moguće razlike između infekcije patogenim i apatogenim ortohantavirusom.
3. Analizirati repertoar solubilnih komponenti (citokina i kemokina) u supernatantu te moguće razlike između infekcije patogenim i apatogenim ortohantavirusom.

## **1.3. Radne hipoteze**

Osnovne hipoteze koje sam željela ispitati ovim istraživanjem su:

1. Ortohantavirusi potiču urođeni imunski odgovor primarnih monocita/makrofaga na razini genske ekspresije, ekspresije površinskih biljega i lučenja solubilnih čimbenika.
2. Postoje razlike u urođenom imunskom odgovoru primarnih monocita/makrofaga



inficiranih patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom.

3. Ortohantavirusi induciraju diferencijaciju primarnih monocita/makrofaga, a smjer diferencijacije se razlikuje pri infekciji patogenim i apatogenim ortohantavirusom.

#### **1.4. Zadaci rada i metodologija istraživanja**

##### Izolacija primarnih monocita

Dobivenu punu krv obraditi unutar dva sata od uzimanja. Iz pune krvi izolirati mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC, od engl. *peripheral blood mononuclear cells*) centrifugiranjem na gradijentu gustoće pomoću Ficoll-Paque PLUS. Iz PBMC-ova dalje separirati monocite negativnom selekcijom pomoću magnetske separacije te definirani broj stanica nasaditi u pločice za kulturu stanica. Preostale krvne stanice nastale kao nusprodukt izolacijskih postupaka nisu obuhvaćene istraživanjem i ne mogu biti iskorištene u druge svrhe. Te stanice odmah uništiti sukladno propisima o postupanju s potencijalno infektivnim medicinskim materijalom.

##### Infekcija monocita ortohantavirusima

Monocite inficirati virusima PUUV ili TULV istom višestrukosti infekcije (MOI, od engl. *multiplicity of infection*) (MOI=0,1), tj. istim omjerom između broja dodanih infektivnih virusnih čestica i broja stanica u kulturi. Infekciju monocita pratiti tijekom šest vremenskih točaka (1 sat, 6 sati, 24 sata, 48 sati, 5 dana, 7 dana). Infekcije ortohantavirusima provesti u laboratoriju 3. stupnja biosigurnosti (BSL-3, od engl. *biosafety level 3 laboratory*). Kao kontrolu koristiti neinficirane stanice u istim uvjetima kultivacije.

##### Praćenje kinetike i uspješnosti infekcije

Kinetiku i uspješnost infekcije pratiti određivanjem razine ortohantavirusne RNA u supernatantu te inficiranim stanicama reverznom transkripcijom i kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom (RT-qPCR) te detekcijom nukleokapsidnog (N) proteina virusa PUUV i TULV u inficiranim stanicama metodom indirektno imunofluorescencije (IIFT).

##### Određivanje solubilnih komponenti nespecifične imunosti

Kinetiku lučenja odabrane 21 molekule nespecifične imunosti (solubilni citokini i kemokini - IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-6, IL-10, IL-17F, IL-27, IL-37, IFN- $\gamma$ , CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ),

CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL22 (MDC), CD40L, CXCL8, CXCL10 (IP-10), GM-CSF, MIF, M-CSF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1) odrediti koristeći multipleks imunotest pomoću magnetskih mikrokuglica (*Luminex* test) u šest vremenskih točaka. Na temelju analizirane kinetike izlučivanja odabranih solubilnih citokina i kemokina analizirati promjene relativne genske ekspresije inficiranih monocita te smjera diferencijacije monocita (na temelju ekspresije površinskih markera).

#### Određivanje relativne genske ekspresije

Izolirati ukupnu RNA iz stanica u šest vremenskih točaka (1 h, 6 h, 24 h, 48 h, 5 d, 7 d) nakon infekcije s virusom TULV ili PUUV pomoću reagensa za izolaciju *TriPure*. Iz ukupne pročišćene RNA pripremiti cDNA pomoću RT te ju koristiti kao kalup za qPCR koristeći specifične početnice i probe za pojedini gen od interesa (za 19 gena koji su uključeni u urođeni imunosti odgovor: receptora (*CD40LG*, *CD68*, *CD206*, *CCR2*, *CCR5*, *CXCR4*), citokina (*TNF*, *IL-1 $\beta$* , *IL-1RN*, *IL-6*, *IL-27*, *IL-37*), kemokina (*CCL4*, *CCL13*, *CXCL8*, *CXCL10*), virusom induciranih gena (*IFITM3*, *STAT1*, *STAT3*) te tri referentna gena (*PPIA*, *TBP*, *OAZ1*)). Relativnu ekspresiju gena odrediti na temelju očitanih  $C_t$  vrijednosti. Normalizaciju rezultata napraviti na osnovu referentnih („housekeeping”) gena. Relativne razine ekspresije izračunati metodom  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

#### Određivanje ekspresije površinskih biljega

Metodom protočne citometrije odrediti ekspresiju pojedinih staničnih površinskih molekula važnih za aktivaciju monocita/makrofaga i njihovu interakciju s drugim stanicama urođene i stečene imunosti te diferencijaciju prema monocitnim M1 ili M2 makrofagima ili monocitnim dendritičkim stanicama u tri vremenske točke (1 h, 48 h, 7 d) nakon infekcije s virusom TULV ili PUUV. Upotrijebiti specifična monoklonska protutijela obilježena fluorokromima koja prepoznaju površinske biljege monocita, makrofaga i dendritičkih stanica (*CD14*, *CD16*, *CD40*, *CD45*, *CD163*, *CD206*, *CD209*, *HLA-DR*).

#### Statistička analiza podataka

Za analizu podataka dobivenih u prethodno opisanom planu istraživanja koristiti neparametrijski test koji podnosi analizu malog uzorka, Wilcoxon-ov test rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću (od engl. *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*) te specijalizirane programe, ovisno o vrsti podataka.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Ortohantavirusi

Hantavirusi su zoonotski jednolančani RNA virusi negativnog polariteta s lipidnom ovojnicom. Taksonomski pripadaju redu *Bunyvirales*, porodici *Hantaviridae*, koja je podjeljena u četiri podporodice: *Mammantavirinae*, *Actantavirinae*, *Agantavirinae* te *Repantavirinae* (Maes i ostali 2018; 2019; Abudurexiti i ostali 2019; Laenen, Vergote, Calisher, i ostali 2019). Hantavirusi koji su predmet istraživanja ovog rada, a koje danas smatramo tzv. „klasičnim“ hantavirusima, prenose se glodavcima i rovkama, a svrstani su unutar podporodice *Mammantavirinae*, roda *Orthohantavirus* (Adams i ostali 2017). Prema Međunarodnom odboru za taksonomiju virusa (ICTV, od engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*), na temelju novih spoznaja te otkrića novih hantavirusa u raznim vrstama domaćina, u rod *Orthohantavirus* službeno je uključeno 38 vrsta ortohantavirusa s ukupno 58 virusa (Abudurexiti i ostali 2019; Laenen, Vergote, Calisher, i ostali 2019).

Kao preduvjet radu s ortohantavirusima potreban je specijalizirani laboratorij 3. stupnja biosigurnosti (BSL-3, od engl. *biosafety level 3 laboratory*), zbog prijenosa virusa aerosolom, njegove visoke patogenosti te istovremenog nepostojanja lijekova ili cjepiva, što otežava istraživanja te spoznaje o bolestima koje uzrokuju. Stoga su eksperimentalne mogućnosti istraživanja ortohantavirusa u svijetu iznimno ograničene.

Ortohantaviruse je izuzetno teško izolirati iz tkiva domaćina ili oboljelih ljudi, a često su im potrebne višestruke „slijepe“ pasaže u staničnoj kulturi kako bi se uspjeli dobiti izolati te dovoljno velike koncentracije virusa za daljnju karakterizaciju i istraživanje (A. Plyusnin 2002; J.-L. Li i ostali 2013; Prescott, Feldmann, i Safronetz 2017). Trenutno se prilagodba ortohantavirusa na staničnu kulturu izvodi na stanicama Vero E6 (epitelne stanice bubrega afričkog zelenog majmuna *Chlorocebus aethiops* (Linnaeus, 1758.), klon E6) kojima nedostaje sposobnost proizvodnje interferona tipa I (IFN- $\alpha/\beta$ ), što može omogućiti evoluciju virusnih varijanti s genotipskim i fenotipskim svojstvima koja se razlikuju od roditeljskog soja divljeg tipa virusa (A. L. Schmaljohn i ostali 1995; O. Vapalahti i ostali 1996a). Važno je napomenuti da su mutacije virusnog genoma tijekom adaptacije na staničnu kulturu primijećene i kod drugih zoonotskih virusa iz različitih virusnih obitelji (Nemirov, Vapalahti, i ostali 2003; Stoltz i ostali 2011). To je kod ortohantavirusa pokazano za virus PUUV, za koji

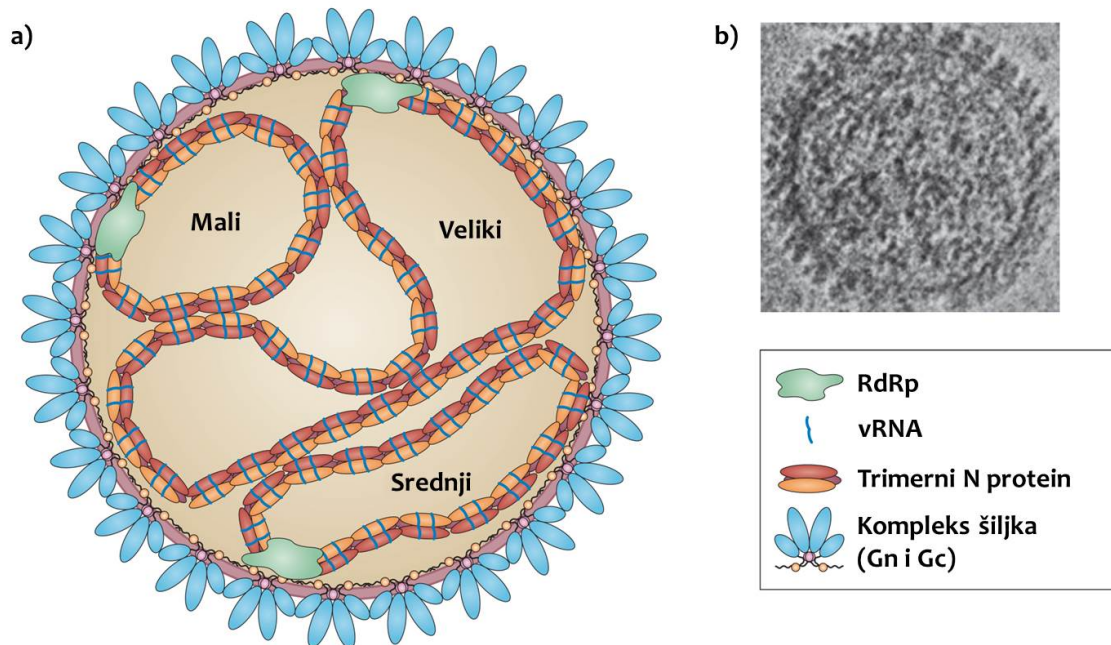
je adaptacija virusa na staničnu kulturu povezana s pojavom mutacija u segmentu za RNA polimerazu ovisnu o RNA i u nekodirajućim regijama segmenta za nukleokapsidni protein (Lundkvist i ostali 1997; Nemirov, Lundkvist, i ostali 2003). Te mutacije vrše selekcijski pritisak koji rezultira varijantama s boljim preživljenjem, a koje imaju različite fenotipe, ali manju infektivnost (Nemirov, Lundkvist, i ostali 2003; Sundström i ostali 2011). Istraživanja su pokazala kako ortohantavirusi koji se uzgajaju u svojim prirodnim domaćinima uzrokuju bolest u neljudskih primata koja oponaša tijek bolesti u ljudi. Pasažiranje u staničnoj kulturi oslabljuje hantaviruse do te mjere da ne uzrokuju mjerljivu bolest u neljudskih primata (J. Klingström i ostali 2002; Prescott, Feldmann, i Safronetz 2017). Nadalje, istraživanja su pokazala kako je divlji soj virusa dobro prilagođen za razmnožavanje u voluharicama, ali ne i u staničnoj kulturi, dok se sojevi virusa uzgojeni u staničnoj kulturi Vero E6 repliciraju s velikom učinkovitošću u staničnoj kulturi, ali ne mogu zaraziti voluharice (Lundkvist i ostali 1997). Budući da za istraživanje patogeneze ortohantavirusa ne postoji prikladan životinjski model bolesti (Kruger, Schonrich, i Klempa 2011), dojenački BALB/c miševi se i dalje koriste u pokusima na životinjama, posebno u pogledu virulencije ortohantavirusa (J.-L. Li i ostali 2013). Ipak, postoje nedavne uspješne uspostave nekoliko novih staničnih linija iz primarnih stanica voluharica, koje bi mogle biti dragocijene za izolaciju ortohantavirusa divljeg tipa (Essbauer i ostali 2011; Stoltz i ostali 2011; Sanada i ostali 2012; Binder i ostali 2019).

Ortohantavirusi su „spororastući“ virusi te sporo rastu u staničnoj kulturi usprkos prilagođenosti na takav uzgoj. Također, ortohantavirusi u stanicama ne uzrokuju citopatski učinak *in vivo* ni u uvjetima *in vitro* (Masanori Terajima i ostali 2007). Prilikom uzgoja potrebno ih je uzgajati nekoliko (3 – 10) dana u staničnoj kulturi, s uzgojem virusa niskog titra od  $4,5 \times 10^5$  FFU/ml (od engl. *focus-forming units/mililiter*) virusnih čestica (R. Yanagihara i Silverman 1990; Temonen i ostali 1993; Lundkvist i ostali 1997; Bourquain i ostali 2019). U jednoj studiji je povećanje broja virusne RNA (PUUV, soj Kazan) dokazano 24 sata poslije infekcije u Vero E6 staničnoj liniji, dok je prisutnost virusne RNA u supernatantu stanične kulture dokazano u kasnijim danima (2 – 6 dana) nakon infekcije (Wigren Byström i ostali 2018). Za razliku od hantavirusa, „brzorastući“ virusi npr. virusi SARS-CoV ili SARS-CoV-2 dosegnu visok titar od  $5 \times 10^7$  PFU/ml (od engl. *plaque-forming units/mililiter*) i  $1 \times 10^7$  PFU/mililitru za 48 – 72 sata (Sims i ostali 2008; Hao i ostali 2020). Često se kod ortohantavirusa primijenjuje ultracentrifugiranje kako bi ih se koncentriralo i time dobio veći titar virusnih čestica.

Ortohantavirusi se mogu inaktivirati toplinom (kroz 15 minuta (min) pri 56°C u staničnom mediju te suhi virus kroz 2 sata pri 56°C), deterdžentima, UV zračenjem, organskim otapalima (metanol, paraformaldehid, aceton/metanol) i otopinom hipoklorita (Kraus i ostali 2005; Kallio, Klingström, i ostali 2006). 70% etanol potpuno inaktivira bunyaviruse, s time da je *Hantaan orthohantavirus* (HTNV) djelomično otporan na 30% etanol (Hardestam i ostali 2007). Unatoč tome, ortohantavirusi su prilično izdržljivi i neočekivano stabilni izvan domaćina, jer mogu preživjeti najmanje osam dana pri 37°C, dulje od 10 dana na sobnoj temperaturi i čak do 96 dana pri 4°C (Kallio, Klingström, i ostali 2006; Hardestam i ostali 2007). Za većinu ortohantavirusa, kontaminirana prašina ili aerosol mogu prenijeti virus drugim glodavcima čak do 15 dana nakon izlučivanja (Kallio, Klingström, i ostali 2006). Ova značajka nužna je za prijenos ortohantavirusa.

### **2.1.1. Molekularna i stanična biologija ortohantavirusa**

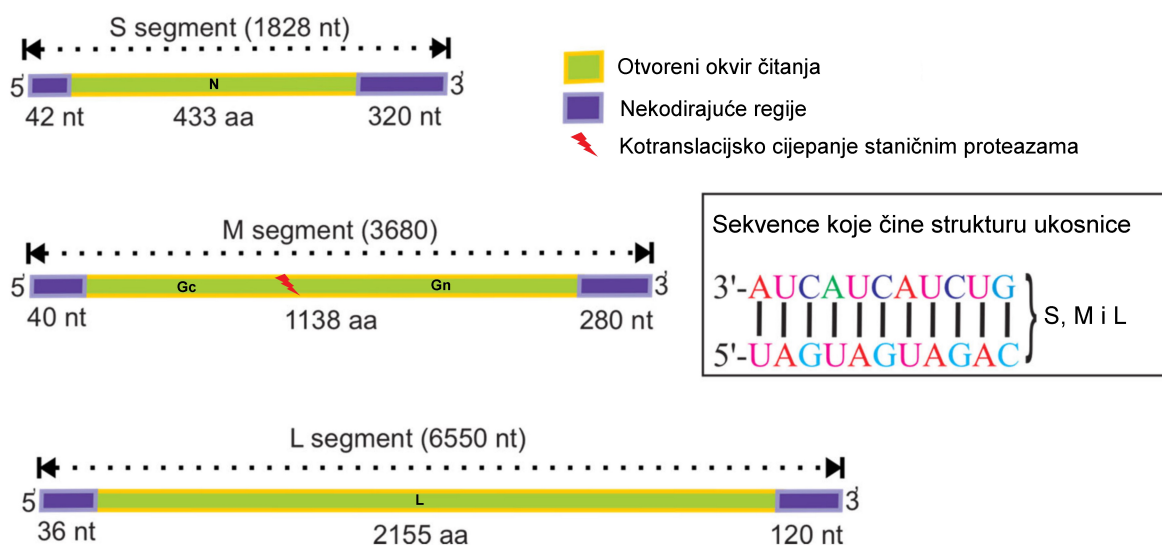
Virioni ortohantavirusa pleomorfne su strukture, većinom kuglaste čestice promjera od 120 – 160 nm te izdužene duljine od 110 do 170 nm, mogu biti dugi čak do 350 nm te promjera oko 80 nm (McCormick i ostali 1982; Huiskonen i ostali 2010; Muyangwa i ostali 2015) (Slika 1). Genom ortohantavirusa čini jednolančana RNA minus lanca koja je upakovana u tri segmenta: mali segment (S, od engl. *small*) veličine 1,6 – 2,1 kilobaza (kb) koji kodira za 50 kDa nukleokapsidni protein (N, od engl. *nucleocapsid*); srednji segment (M, od engl. *medium*) veličine 3,7 – 3,8 kb koji kodira za prekursor glikoproteina veličine 126 kDa (GPC, od engl. *glycoprotein precursor*; koji se kotranslacijski cijepa dajući zrele Gn (N-terminalna podjedinica) i Gc (C-terminalna podjedinica) glikoproteine) i veliki segment (L, od engl. *large*) veličine 6,5 – 6,6 kb koji kodira za 250 kDa RNA polimerazu ovisnu o RNA (RdRp, od engl. *RNA-dependent RNA polymerase*) (Slika 1) (C. S. Schmaljohn i Dalrymple 1983; C. S. Schmaljohn i ostali 1983; Giebel i ostali 1989; Hepojoki i ostali 2012; Muyangwa i ostali 2015).



**Slika 1.** Virion ortohantavirusa. a) Shematski prikaz viriona ortohantavirusa. Ortohantavirusna čestica sadrži trisegmentirani virusni RNA genom (vRNA), koji se sastoji od malog, srednjeg i velikog otvorenog okvira čitanja. Svaki segment je inkapsidiran trimernim nukleokapsidnim (N) proteinom. Na vanjskoj lipidnoj ovojnici viriona nalaze se šiljci koji se sastoje od po četiri jedinice Gn i četiri jedinice Gc glikoproteina. Virusni genom se replicira i prepisuje pomoću RNA-ovisne RNA-polimeraze (RdRp). b) Čestica ortohantavirusa promatrana pomoću krioelektronske mikroskopije. Visina šiljka je uvijek 12 nm, a srednji promjer viriona je 135 nm. Modificirano prema Vaheri et al. 2013b.

Svaki segment sadrži jedan otvoreni okvir čitanja (ORF, od engl. *open reading frame*) (Slika 2) te ima jako dobro očuvane nekodirajuće regije (NCRs, od engl. *non-coding regions*) na 3' i 5' krajevima, koje sadrže komplementarne nukleotide te se spajaju čineći strukturu ukosnice i daju kružni izgled svakom segmentu RNA (C. S. Schmaljohn i Dalrymple 1983; Chizhikov i ostali 1995). Strukture ukosnica zaštitni su znak virusa reda *Bunyavirales* i funkcioniraju kao virusni promotor te su ključne za transkripciju i replikaciju (Elliott, Schmaljohn, i Collett 1991; Hussein i ostali 2011). Osim kodiranja proteina N, mali segment ortohantavirusa koji nose glodavci obitelji *Cricetidae* sadrži preklapajući ORF koji kodira za nestrukturane proteine (NSs, od engl. *nonstructural proteins*), koji funkcioniraju kao slab interferonski inhibitor (Jääskeläinen i ostali 2007a). Protein N je glavna strukturna komponenta virusa koja komunicira sa staničnim proteinima domaćina i čija je glavna funkcija zaštititi virusnu RNA od staničnih nukleaza. Trimerne jedinice proteina N te po jedna molekula RdRp, prekrivaju

svaki segment vRNA tvoreći tri spiralna kompleksa ribonukleoproteina (RNP) (Mir i Panganiban 2006; Mir i ostali 2006; Wichgers Schreur, Kormelink, i Kortekaas 2018). Orthohantavirusi su jednostavni virusi i nemaju matriksne proteine pa protein N vrši funkciju fizičkog povezivanja RNP-a s citoplazmatskim krajevima glikoproteina u lipidnoj ovojnici viriona (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Uz to, protein N znatno olakšava prevođenje virusne mRNA u stanicama. RdRp ima aktivnosti transkriptaze, replikaze i endonukleaze (Kukkonen, Vaheri, i Plyusnin 2005). Segmenti su upakirani u lipidnu ovojnicu dobivenu od domaćina koja je obložena tetramernim strukturama šiljaka sastavljenim od Gn+Gc heterodimera (Slika 1) (Huiskenen i ostali 2010; Battisti i ostali 2011; Cifuentes-Muñoz, Salazar-Quiroz, i Tischler 2014). Takva tetramerna simetrija kompleksa šiljka smatra se jedinstvenom, barem među virusima s ovojnicom. Glikoproteini, Gn i Gc, igraju glavnu ulogu u vezanju virusa i ulasku u stanice domaćina, virulenciji te sastavljanju novih viriona u zaraženim stanicama (Hussein i ostali 2011). Virioni se sastoje od > 50% proteina, 20 – 30% lipida, 7% ugljikohidrata i 2% RNA (C S Schmaljohn i ostali 1985).

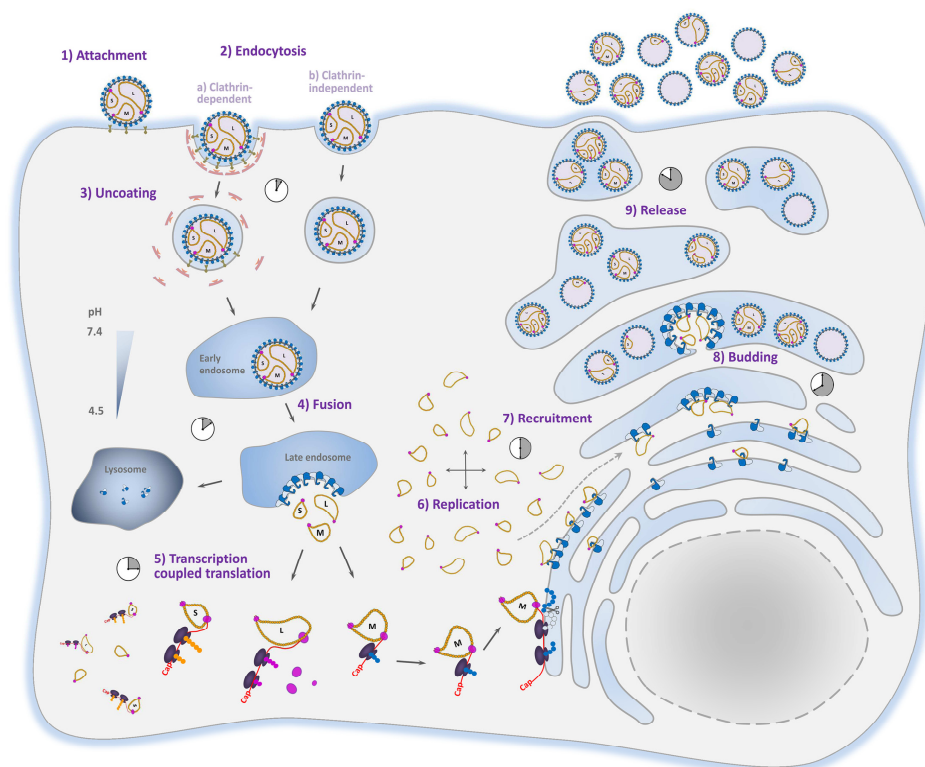


**Slika 2.** Genom orthohantavirusa, primjer virus PUUV. Preuzeto i modificirano iz (Kabwe i ostali 2020).

Znanje o mehanizmima ulaska orthohantavirusa u stanice i dalje je ograničeno. Istraživanja u uvjetima *in vitro* pokazala su kako postoji nekoliko staničnih proteina koji posreduju vezanje orthohantavirusa na stanice - integrini ( $\alpha_V\beta_3$  je receptor za patogene viruse i  $\alpha_5\beta_1$  za nepatogene

viruse) (I. N. Gavrilovskaya i ostali 1998; E. R. Mackow i Gavrilovskaya 2001); čimbenik ubrzavanja propadanja komplementa (DAF/CD55, od engl. *complement decay-accelerating factor*) (Krautkrämer i Zeier 2008); gC1qR/p32 (receptor za globularnu domenu komponente komplementa C1q) (Choi i ostali 2008) i protokaderin-1 (PCDH1, od engl. *protocadherin-1*) (Jangra i ostali 2018). Nakon vezanja ortohantavirusi ulaze u stanice koristeći različite mehanizme endocitoze, uključujući endocitozu posredovanu klatrinom, putove neovisne o dinaminu i makropinocitozu, ovisno o tipu stanice i eksperimentalnim uvjetima (Mittler i ostali 2019). Nakon ulaska u stanice, virusne čestice se nalaze u ranim endosomima te padom pH prelaze u kasne endosome i lizosomske odjeljke (Albornoz i ostali 2016) (Slika 3). Ulazak virusa završava fuzijom virusne membrane s membranom endosoma uslijed velikih konformacijskih promjena u proteinu Gc (Cifuentes-Muñoz, Salazar-Quiroz, i Tischler 2014; Mittler i ostali 2019). Fuzija virusne membrane i ulazak izuzetno je osjetljiv na mala smanjenja koncentracije staničnog kolesterola (Kleinfelter i ostali 2015). Nakon fuzije membrane slijedi oslobađanje virusnih nukleokapsida u citoplazmu. Transkripcija virusnih mRNA uključuje lokalizaciju proteina N i RdRp u citoplazmatskim procesirajućim tijelima (od engl. *P bodies*) gdje za pokretanje transkripcije koriste 5'-kapice mRNA domaćina namijenjene razgradnji pomoću procesa „otimanja 5'-kapica“ (od engl. *cap-snatching*) (Mir i ostali 2008). Protein N također štiti 5'-kapice mRNA domaćina od razgradnje u procesirajućim tijelima (Cheng i Mir 2012). Procesirajuća tijela tada služe kao izvor početnica tijekom transkripcije virusne mRNA pomoću virusne RdRp (Mir i ostali 2008). Sinteza virusne RNA započinje mehanizmom „sparivanja i prestrojavanja“ (od engl. *prime-and-realign*) (Garcin i ostali 1995; Cheng i Mir 2012). Mehanizmi „sparivanja i prestrojavanja“ (ili proklizavanja ili vraćanja) koji pokreću sintezu virusnog genoma zahtijevaju ponavljanja terminalne sekvence, a svi bunyavirusi sadrže takva ponavljanja di- ili trinukleotida na svojim krajevima (Garcin i ostali 1995). Endoplazmatski retikulum-Golgi-jev intermedijarni odjeljak (ERGIC, od engl. *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*) smatra se mjestom virusne replikacije (Ramanathan i ostali 2007). Pretpostavlja se kako virioni pupaju u Golgi-jevom tijelu, a zatim se dostavljaju na plazmatsku membranu radi otpuštanja, vjerojatno putem reciklirajućih endosoma (od engl. *recycling endosome*) pomoću proteina RabGTP-aza Rab8a, Rab11a (Rowe, Suszko, i Pekosz 2008).





**Slika 3.** Replikacijski ciklus ortohantavirusa. Preuzeto iz Schreur and Kortekaas 2016.

### 2.1.2. Hantavirusni i ortohantavirusni rezervoari te patogenost ortohantavirusa

Ortohantavirusi su prema zemljopisnoj distribuciji domaćina i bolestima koje uzrokuju klasificirani u dvije skupine: ortohantavirusi Starog i ortohantavirusi Novog svijeta (Slika 4). Ortohantaviruse Starog svijeta, koji uzrokuju hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS), prenose glodavci iz obitelji miševa (*Muridae*), podporodice pravih miševa (*Murinae*) iz rodova *Apodemus* i *Rattus* te iz obitelji hrčaka (*Cricetidae*), podporodice voluharica (*Arvicolinae*) iz rodova *Myodes*, *Microtus*, *Lemmus* i *Arvicola* (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010; Hussein i ostali 2011; Laenen, Vergote, Calisher, i ostali 2019). Ortohantaviruse Novog svijeta, koji uzrokuju hantavirusni kardiopulmonarni sindrom (HCPS) prenose glodavci iz obitelji hrčaka (*Cricetidae*), podporodice miševa i štakora Novog svijeta (*Neotominae*) iz roda *Peromyscus* te podporodice miševa i štakora Novog svijeta (*Sigmodontinae*) iz rodova *Oligoryzomys*, *Sigmodon*, *Oryzomys* i *Akodon* (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010; Hussein i ostali 2011; Laenen, Vergote, Calisher, i ostali 2019). Do prije nekoliko godina glavnim prirodnim domaćinima ortohantavirusa smatrali su se samo glodavci.

Nedavna otkrića brojnih novih hantavirusa iz raznih vrsta rovki i krtica (red *Eulipotyphla*, obitelji *Soricidae* i *Talpidae*) te šišmiša (red *Chiroptera*) iz Afrike, Azije i Amerike (Arai i ostali 2007; J.-W. Song, Kang, i ostali 2007; Kang i ostali 2009; Weiss i ostali 2012; Guo i ostali 2013) te njihova karakterizacija, doprinjeli su potrebi promjene taksonomije hantavirusa. Hantavirusi glodavaca i dio novootkrivenih hantavirusa su uvršteni u podobitelj *Mammantavirinae* u rod *Orthohantavirus*, dok su drugi novootkriveni hantavirusi uvršteni u rodove *Loanvirus*, *Mobatvirus* i *Thottimvirus* (Laenen, Vergote, Calisher, i ostali 2019). Novootkriveni hantavirusi iz rovkica, krtica, šišmiša, riba i gmazova još uvijek nisu povezani s nekom ljudskom bolešću.

Orthohantavirusi se smatraju jednim od najboljih primjera dugotrajne povezanosti između RNA virusa i njihovih domaćina. Orthohantavirusi su usko povezani s ekologijom i evolucijskom poviješću svojih domaćina glodavaca (Liphardt i ostali 2019). Svaka vrsta orthohantavirusa vezana je uz jednu karakterističnu vrstu domaćina ili nekoliko vrlo srodnih vrsta domaćina (Alexander Plyusnin i Sironen 2014). Rasprostranjenost i raznolikost orthohantavirusa tako odražava geografsku rasprostranjenost i bioraznolikost njihovih domaćina. Do prije nekoliko godina je prevladavala teorija koevolucije s prijenosom virusa među vrstama glodavaca zbog filogenetske kodivergencije (paralelne divergencije ekološki povezanih loza) orthohantavirusa i njihovih domaćina glodavaca (koji pripadaju podobiteljima *Murinae*, *Arvicolinae*, *Neotominae* i *Sigmodontinae*) (Alexander Plyusnin i Sironen 2014; Richard Yanagihara i ostali 2014). Međutim, novim analizama koji su obuhvatile više dostupnih potpunih sekvenci hantavirusa, pokazalo se kako su filogenetske povijesti virusa samo djelomično podudarne s onima njihovih domaćina (Guo i ostali 2013). Hantavirusi evoluiraju različitim brzinama u odnosu na evoluciju svojih domaćina tako da se ne može govoriti o strogoj kodivergenciji (Bennett i ostali 2014). Također, pokazalo se kako je prisutna polifiletska filogenija orthohantavirusa koji se prenose glodavcima, rovkama, krticama i šišmišima (Bennett i ostali 2014).



Sironen 2014). Evolucija je vjerojatno uključivala jednu ili više razmjena preteče virusa s drugim simpatričnim i sintopičnim vrstama sisavaca, ili njihovog zajedničkog pretka (Kang i ostali 2009; Guo i ostali 2013). Glavni mehanizam genetske raznolikosti hantavirusa su prirodna selekcija i genetski drift (postepeno nakupljanje točkastih mutacija, većinom neutralnih ili kvazineutralnih te male delecije/insercije u nekodirajućim regijama), dok su u manjoj mjeri tome doprinjeli događaji prebacivanja između domaćina (O. Vapalahti i ostali 1996a; Lin i ostali 2012; Guo i ostali 2013; Holmes i Zhang 2015), razmjene segmenata genoma (engl. *reassortment events*) (Bennett i ostali 2014) te rekombinacija genoma (Alexander Plyusnin i ostali 2002; Ramsden, Holmes, i Charleston 2009; Klempa 2018). Osnovne snage evolucije su drugačije oblikovale diversifikaciju hantavirusa u različitim skupinama domaćina i u različitim staništima (Guo i ostali 2013; Bennett i ostali 2014; Klempa 2018).

Ovisno o gustoći populacije, 10 – 30% populacije glodavaca sadrži virusni antigen na razini RNA ili proteina te je do 50% seropozitivno (Kallio i ostali 2009; Hussein i ostali 2011), dok u povoljnim godinama s velikim povećanjem populacije glodavaca, taj postotak može doseći čak do 77,4% glodavaca koji su pozitivni na virusnu RNA (A. Tadin i ostali 2014) doprinoseći razvoju epidemija u ljudi. Kroz eksperimentalne infekcije i terenska istraživanja, pokazano se kako je prijenos među glodavcima isključivo horizontalan i događa se udisanjem zaraženog aerosola, preko sline ili izlučevina, grizenjem i drugim agresivnim interakcijama u ponašanju glodavaca (H. W. Lee, Lee, i ostali 1981; H. W. Lee, French, i ostali 1981; Glass i ostali 1988; Botten i ostali 2002). Ne postoji vertikalni prijenos s majke na potomstvo, a majčina protutijela mogu zaštititi potomstvo od infekcije nekoliko mjeseci (Kallio, Poikonen, i ostali 2006). Seroprevalencija virusa PUUV pozitivnih voluharica raste s njihovom dobi (procjenjuje se prema težini) (Escutenaire i ostali 2002; Katrien Tersago, Verhagen, i Leirs 2011; A. Tadin i ostali 2014). Početnu akutnu infekciju s izlučivanjem velikih količina virusa kroz mjesec dana prati kronično stanje, gdje je prisutna niska viremija te kontinuirano ispuštanje infektivnih čestica (Voutilainen i ostali 2015) uz proizvodnju velikih količina neutralizirajućih protutijela (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Uspjeh dugotrajnog preživljavanja virusa u svojim domaćinima usprkos prisutnosti visokih razina protutijela je još uvijek otvoreno pitanje bez odgovora (Schönrich i ostali 2008). Većina istraživanja ukazuje kako je infekcija domaćina glodavaca njihovim ortohantavirusima asimptomatska te kako ne izaziva očitu bolest. Ipak, u nekoliko istraživanja dokazan je razvoj pojedinih simptoma bolesti u domaćinima, poput plućnog edema i periportalnog hepatitisa (Netski, Thran, i St

Jeor 1999), sporije stope rasta štakora (Childs i ostali 1989) te smanjenog preživljavanja voluharica preko zime (Kallio i ostali 2007). Odsutnost bolesti kod glodavaca unatoč trajnoj infekciji je način preživljavanja ortohantavirusa kojim izbjegavaju ubijanje vlastitih domaćina. Također, naglašava koevolucijski odnos virusa i domaćina koji je razvijen tijekom stotina tisuća godina međusobne interakcije. Preživljavanje domaćina usprkos kroničnoj virusnoj infekciji posreduje kombinacija jedinstvenog imuniteta domaćina protiv virusa te virusne genetske varijabilnosti, koja mu pomaže izbjegavanju obrambenih mehanizama domaćina. Eksperimentalni podaci pokazali su kako su obrasci ekspresije gena vezanih uz imunski odgovor različiti kod zaraženih mužjaka i ženki (Hannah, Bajic, i Klein 2008), a te razlike imaju važnu ulogu u ekologiji ortohantavirusa. Naime, mužjaci i ženke razlikuju se u svojoj osjetljivosti na ortohantaviruse (S. L. Klein, Bird, i Glass 2000). Otkriveno je više zaraženih mužjaka nego ženki, dok su eksperimentalno inficirani mužjaci štakora proizvodili veće količine virusa dulje vrijeme te su također imali veće razine protutijela od ženki (S. L. Klein, Bird, i Glass 2000; S L Klein, Bird, i Glass 2001; Hannah, Bajic, i Klein 2008).

Glavni čimbenici koji utječu na dinamiku populacije glodavaca uključuju povoljne klimatske uvjete poput vlage, oborina i temperature te uvjeta u staništu (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Sukladno, zabilježene su pozitivne korelacije između vlage i oborina s velikom učestalošću HVBS-a (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010; A. Tadin i ostali 2014). U različitim geografskim područjima se povećanje populacije glodavaca događa uslijed različitih razloga (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). U umjerenoj europskoj klimi „eksplozivno“ povećanje populacije glodavaca nastaje zbog lokalnog obilnog uroda (od engl. *mast years*) šumskog drveća svakih nekoliko godina (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010; Paul Heyman i ostali 2012; A. Tadin i ostali 2014; Monchatre-Leroy i ostali 2018; He i ostali 2019). Godina punog uroda je godina kada plodovima obilno rode šumske sastojine (većinom bukva s bukvicom i hrast sa žirom) (Sever i ostali 2013) te time pružaju obilje hrane šumskim glodavcima (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Velika brojnost glodavaca korelira s te se može predvidjeti visokim ljetnim temperaturama dvije godine prije (kada se razvijaju cvjetni pupoljci) i s visokim jesenskim temperaturama jednu godinu prije (kada dozrijevaju plodovi) (Schwarz i ostali 2009; K. Tersago i ostali 2009; Sever i ostali 2013). Bez pojave fenomena obilnog uroda gustoća populacije glodavaca ima samo manja kolebanja (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Ostali čimbenici koji utječu na populaciju glodavaca uključuju bioraznolikost biocenoza, predatore i kompetitivne vrste, nisko raslinje poput grmlja i travnjaka s mnogim biljkama koje glodavcima pružaju hranu i sklonište (Paul Heyman i ostali

2012; He i ostali 2019). Posljedično, povećanje gustoće populacija glodavaca može dovesti do povećanih kontakata između glodavaca koji mogu poticati prijenos virusa rezultirajući većom prevalencijom te tako utjecati na razvoj epidemija u ljudi (Paul Heyman i ostali 2012).

Detaljan popis svih ortohantavirusa s popisom njihovih domaćina, rasprostranjenosti te patogenosti virusa nalazi se u Prilogu (8.2. Popis vrsta ortohantavirusa), dok su dalje u tekstu spomenuti samo oni povezani s Europom i ovim istraživanjem.

### **Puumala orthohantavirus (PUUV)**

Patogeni ortohantavirusi koji uzrokuju bolesti u ljudi, a cirkuliraju u Europi uključuju viruse: *Seoul orthohantavirus* (SEOV) koji prenose smeđi štakor (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769.), crni štakor (*R. rattus* (Linnaeus, 1758.)) koji su prisutni globalno te *R. losea* (Swinhoe, 1871.) u jugoistočnoj Aziji; *Dobrava-Belgrade orthohantavirus* (DOBV) koji je identificiran u žutogrlom šumskom mišu (*A. flavicollis* (Melchior, 1834.)), prugastom poljskom mišu (*A. agrarius* (Pallas, 1771.)) i šumskom mišu (*A. sylvaticus* (Linnaeus, 1758.)) koji su prisutni u Europi te crnomorskom poljskom mišu (*A. ponticus* Sviridenko, 1936.) u Aziji; *Tatenale orthohantavirus* kojeg prenosi livadna voluharica (*Microtus agrestis* (Linnaeus, 1761.)) u Ujedinjenom Kraljevstvu (Pounder i ostali 2013) te *Puumala orthohantavirus* (PUUV).

Prototip europskog ortohantavirusa je virus PUUV koji je pronađen u tkivu šumske voluharice 1980. godine u južnoj Finskoj te nazvan prema općini Puumala, oko 300 km udaljenoj od Helsinkija (Brummer-Korvenkontio i ostali 1980; Brummer-Korvenkontio, Henttonen, i Vaheri 1982). Međutim, europska literatura već od 1934. godine spominje blaži lokalni oblik HVBS-a u Fenoskandiji, prikladno nazvan *nephropathia epidemica* (NE), a za koji se utvrdilo da je uzrokovan virusom PUUV (Clement, Maes, i Van Ranst 2014). Novom taksonomijom u virus PUUV su uvrštena tri virusa – virus Puumala, virus Hokkaido te virus Muju (Laenen, Vergote, Calisher, i ostali 2019).

Virus Puumala je najrašireniji ortohantavirus prisutan u Europi zbog rasprostranjenosti svog domaćina šumske voluharice (*Myodes glareolus* (Schreber, 1780.)) čije stanište se rasprostire širom Europe sve do Urala (osim mediteranske regije) (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010; Paul Heyman i ostali 2012). Do danas je virus Puumala otkriven u voluharicama iz većine europskih zemalja uključujući i Hrvatsku (A Markotić i ostali 2002).

Virus Hokkaido pronađen je u sivoj crvenoleđoj voluharici (*M. rufocanus* (Sundevall, 1846.)) prisutnoj u sjevernoj Fenoskandiji, sjevernoj Aziji do Japana te nije povezan s bolestima u ljudi (Sanada i ostali 2012). Virus Muju je pronađen u korejskoj crvenoleđoj voluharici (*M. regulus* (Thomas, 1907.)), endemu Korejskog poluotoka gdje uzrokuje HVBS u ljudi (K.-J. Song i ostali 2007).

U ovoj disertaciji je korišten virus Puumala (soj CG1820) te se skraćenica PUUV odnosi na taj virus.

Analiza sekvenci virusa PUUV otkrila je visoku razinu raznolikosti koja tvori osam genetskih loza u voluharicama u Europi: srednjoeuropska, alpsko-jadranska, danska, južno skandinavska, sjeverno skandinavska, finska, ruska i latvijska (T. Sironen, Vaheri, i Plyusnin 2001; Razzauti i ostali 2012). Predloženo je kako bi takva raznolikost virusa PUUV mogla biti rezultat geografske izolacije populacija šumskih voluharica u glacijalnom utočištu/refugiju tijekom posljednjeg ledenog doba (prije 28 – 23 000 godina) te kako su ortohantavirusi rekolonizirali Euroaziju na kraju ledenog doba (Wójcik i ostali 2010). Ova pretpostavka podržana je filogenetskom analizom, ukazujući na rano razdvajanje predaka genetske loze virusa PUUV, nakon čega su se loze neovisno razvijale (Castel, Tordo, i Plyusnin 2017). Pokazano je da raznolikost sekvenci nukleotida između virusa PUUV loza za mali (S) segment iznosi 15 – 19%, dok se razlike u sekvencama nukleotida između sojeva virusa PUUV unutar iste loze mogu kretati od 0 – 9% (T. Sironen, Vaheri, i Plyusnin 2001; Razzauti i ostali 2013). Genetska raznolikost virusa PUUV rezultat je nakupljanja točkastih mutacija i preslagivanja unutar virusnog genoma, kao što su rekombinacija i razmjene segmenata genoma (Razzauti i ostali 2008). Virus PUUV akumulira genetske promjene brzinom od  $10^4$  supstitucija po lokalitetu po godini (Laenen, Vergote, Vanmechelen, i ostali 2019). Genetske promjene mogu generirati mnoge različite varijante genoma virusa PUUV i dovesti do stvaranja novih sojeva. Ovakva raznolikost sugerira kako bi virus PUUV mogao biti najpromjenjiviji ortohantavirus. Ko-cirkulacija dva soja virusa PUUV unutar ograničenog područja zabilježena je u Rusiji (Dekonenko i ostali 2003), Švedskoj (Johansson i ostali 2008), Finskoj (Razzauti i ostali 2009), Latviji (Razzauti i ostali 2012), Sloveniji (Miša Korva i ostali 2013) i Hrvatskoj (Svoboda i ostali 2014).

Također, podaci istraživanja *in vitro* ukazali su na važne razlike u infektivnosti različitih sojeva virusa PUUV (Lundkvist, Fatouros, i Niklasson 1991; Lundkvist i ostali 1996; Ruo i ostali 1991). Moglo bi postojati nekoliko mogućih objašnjenja za ova opažanja, npr. a) sojevi izolirani na staničnoj kulturi manje su infektivni za životinje od divljih sojeva virusa, b) sojevi virusa PUUV različitog podrijetla mogu se razlikovati u svojoj infektivnosti, i c) neki od

ranijih rezultata mogu se djelomično objasniti različitim povijestima uzgoja virusa ili upotrebom različitih vrsta glodavaca, različitim protokolima inokulacije i različitim sustavima za analizu (Lundkvist i ostali 1997).

### **Tula orthohantavirus (TULV)**

Europski nepatogeni ortohantavirusi uključuju *Seewis orthohantavirus* (SWSV) koji je detektiran u šumskoj rovki (*Sorex araneus* Linnaeus, 1758.) diljem Europe, u sibirskoj dugozuboj rovki (*S. daphaenodon* Thomas, 1907.) i rovki tundre (*S. tundrensis* Merriam, 1900.) u Aziji (Sibiru) (J.-W. Song, Gu, i ostali 2007; Yashina i ostali 2010); *Asikkala orthohantavirus* koji je detektiran u patuljastoj rovki (*S. minutus* Linnaeus, 1766.) (Radosa i ostali 2013) u Europi te *Bruges orthohantavirus* koji je detektiran u europskoj krtici (*Talpa europaea* Linnaeus, 1758.) u središnjoj Europi (Laenen i ostali 2017).

Godine 1994. pronađen je novi ortohantavirus u europskim voluharicama (*Microtus* spp.), a koji je povezan s virusom PUUV te je nazvan *Tula orthohantavirus* (TULV) prema gradu Tula u Rusiji, smještenom 200-tinjak km južno od Moskve (A. Plyusnin i ostali 1994). Od tada je virus TULV otkriven u voluharicama iz nekoliko europskih regija uključujući i Hrvatsku (A. Plyusnin i ostali 1995; Sibold i ostali 1995; O. Vapalahti i ostali 1996a; Bowen i ostali 1997; P. Heyman i ostali 2002; Scharninghausen i ostali 2002). Zanimljivost i jedinstvenost ovog virusa jest što ga prenosi čak pet različitih vrsta voluharica: poljska voluharica (*Microtus arvalis* (Pallas, 1778.)), livadna voluharica (*M. agrestis* (Linnaeus, 1761.)), europska borova voluharica (*M. subterraneus* (de Selys-Longchamps, 1836.)), istočno europska voluharica (*M. levis* Miller, 1908.) u Europi i Aziji te euroazijski vodeni voluhar (*Arvicola amphibius* (Linnaeus, 1758.)) u Europi i Aziji (A. Plyusnin i ostali 1994; Scharninghausen i ostali 2002; Misa Korva i ostali 2009; 2009; Schmidt-Chanasit i ostali 2010; Schlegel i ostali 2012).

Novom taksonomijom u virus TULV uvrštena su dva virusa – virus Tula i virus Adler (Laenen, Vergote, Calisher, i ostali 2019). Virus Tula smatra se nepatogenim ortohantavirusom. U kojoj mjeri je virus Tula sposoban zaraziti ljude i uzrokovati bolest ostaje i dalje nejasno s obzirom na jako rijetke ljudske slučajeve. Potvrđena ljudska infekcija virusom Tula je zabilježena samo u četiri slučaja pomoću seroloških i molekularnih metoda. S obzirom kako se anti-TULV i anti-PUUV seroreaktivnost ne može razlikovati uobičajenim serološkim tehnikama (tj. bez provođenja testa neutralizacije), infekcije virusom TULV mogu se pogrešno dijagnosticirati kao infekcije s virusom PUUV tijekom rutinske kliničke dijagnostike (O. Vapalahti i ostali 1996a). U studiji seroprevalencije u šumskih radnika iz



sjeveroistočne Njemačke, od 563 uzorka seruma njih 22 (3,9%) reagirala su isključivo na antigen TULV, potvrđen i testom neutralizacije (Mertens i ostali 2011).

Virus Adler je pronađen u Majorovoj borovoj voluharici (*Microtus majori* Thomas, 1906.) na Kavkazu (Tkachenko i ostali 2015) te je trenutno nepoznat njegov utjecaj na ljude.

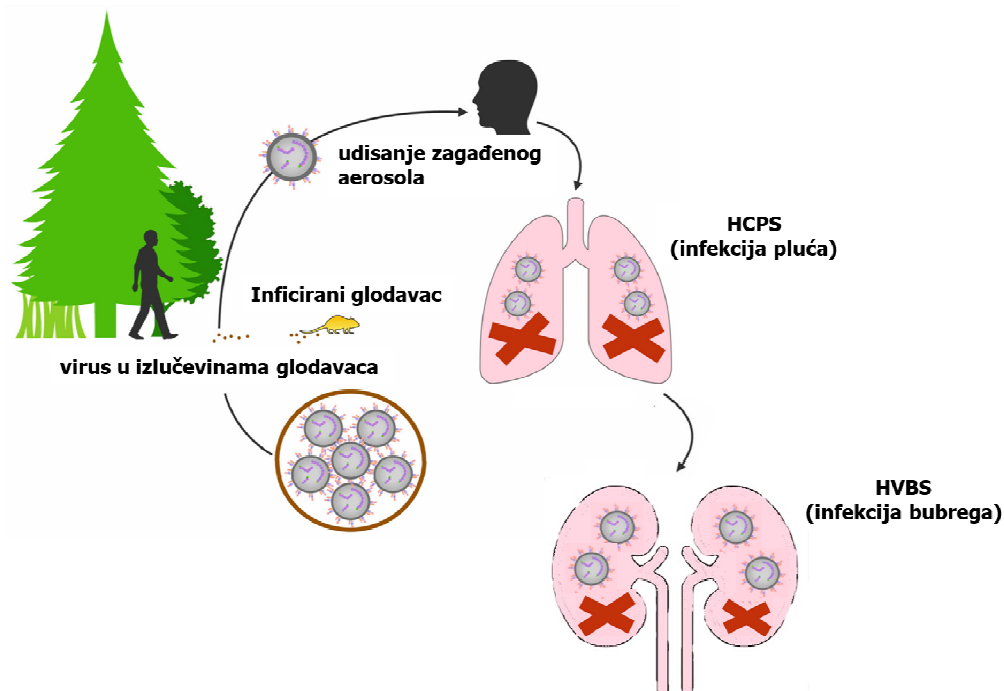
U ovoj disertaciji je korišten virus Tula (soj Moravia) te se skraćeniica TULV odnosi na taj virus.

Također, pokazano je kako sekvence virusa TULV pokazuju geografsko grupiranje umjesto vrsno-specifičnog kao drugi ortohantavirusi te nisu specifične prema vrsti voluharice na istom području (Misa Korva i ostali 2009). Utvrđeno je kako nepatogeni ortohantavirusi imaju veću raznolikost (u odnosu na patogene) te je prisutno nekoliko genetskih loza na malom geografskom području (Miša Korva i ostali 2013). Također, prvi dokaz rekombinacije kod RNA virusa negativnog polariteta je zabilježen kod virusa TULV (Sibold i ostali 1999).

## **2.2. Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS)**

### **2.2.1. Epidemiologija i rasprostranjenost HVBS-a i HCPS-a**

Ljudska infekcija ortohantavirusima događa se slučajno, udisanjem inficiranog aerosola virusom zagađenih izlučevina glodavaca (urin, feces i slina) (Slika 5.) (H. W. Lee, Lee, i ostali 1981). To je uglavnom sezonska (javlja se od proljeća do jeseni) te ruralna bolest povezana s poljoprivredom, šumarstvom, lovom, vojnim aktivnostima, planinarenjem i kampiranjem jer te aktivnosti dovode ljude u blizak kontakt sa staništem divljih glodavaca (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Jedini ortohantavirus koji uzrokuje bolest u urbanoj sredini je SEOV jer su njegovi domaćini štakori (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Ortohantavirusna infekcija se ne prenosi s čovjeka na čovjeka te je akutna samoograničavajuća bolest, dok je interhumani prijenos vrlo rijedak i zabilježen samo za *Andes orthohantavirus* (ANDV) u Južnoj Americi (Padula i ostali 1998).



**Slika 5.** Put prijenosa ortohantavirusa. Modificirano prema Kabwe et al. 2020.

Ortohantavirusi Starog svijeta uzrokuju HVBS, prisutni su u Euroaziji te su poznati nekoliko desetljeća, od 1951. godine i Korejskog rata, a prototip virusa je pronađen 1978. godine u Južnoj Koreji i nazvan prema tamošnjoj rijeci Hantan - hantavirus. Ipak, bolest je u Kini bila lokalno poznata i prije 1000 godina (H. Lee 1982). Godišnje se u svijetu zabilježi približno 50 000 – 100 000 slučajeva HVBS-a, većinom u Kini, uzrokovanim prvenstveno HTNV i srodnim virusima u Aziji koji uzrokuju teške oblike bolesti (G. Song 1999; Hansen i ostali 2015; J. Sane i ostali 2016). U Europi je DOBV najpatogeniji za ljude s četiri virusa koji imaju različite stupnjeve patogenosti. Virus Dobrava i virus Sochi imaju najvišu virulenciju te uzrokuju srednje teške do teške oblike bolesti s većom razinom smrtnosti od 9 –12%, zatim virus Kurkino koji uzrokuje blage oblike bolesti s 0,5 – 0,9% smrtnosti te virus Saaremaa s najmanjom virulencijom i moguće subkliničkim značajem s obzirom na samo tri HVBS bolesnika serološki povezana s tim virusom (Avsic-Zupanc i ostali 1995; 1999; Klempa i ostali 2013; Witkowski i ostali 2016; Klempa 2018). Virus PUUV uzrokuje blage i srednje teške oblike bolesti, s niskom razinom smrtnosti od 0,08 – 0,4% (Vaheri, Henttonen, i ostali 2013) te je uzrok većine dosad zabilježenih epidemija u Europi i Hrvatskoj (Avšič Županc, Korva, i Markotić 2014). Virus Muju uzrokuje HVBS na području korejskog poluotoka (K.-J. Song i ostali 2007). Bolesnici s infekcijom virusom TULV imali su tipične simptome HVBS-a te su svi preživjeli. Infekcija uzrokovana virusom TULV zabilježena je u jednog

imunokompromitiranog bolesnika u Češkoj i jednog imunokompetentnog bolesnika u Njemačkoj koji su imali ozbiljnu kliničku sliku HVBS-a te u dva imunokompetentna bolesnika (iz Francuske i Njemačke) bez komorbiditeta koji su imali blagu kliničku sliku HVBS-a (Klempa i ostali 2003; Zelená, Mrázek, i Kuhn 2013; Reynes i ostali 2015; Hofmann i ostali 2021). Također, otkriven je i akutni slučaj infekcije kod dječaka iz Švicarske nakon ugriza divljeg glodavca, što se pretpostavlja da je bila akutna infekcija s virusom TULV (Schultze i ostali 2002).

Ortohantavirusi Novog svijeta uzrokuju HCPS, s približno 1000 slučajeva godišnje u Sjevernoj i Južnoj Americi, a otkiveni su tek 1993. godine na jugozapadu Sjedinjenih američkih država (SAD) uslijed epidemije novo otkrivenog *Sin Nombre orthohantavirusa* (SNV) te 1995. godine u Paragvaju (Chapman i Khabbaz 1994; Williams i ostali 1997). Bolest je bila lokalno poznata kod Indijanaca u Sjevernoj Americi i prije otkrića uzročnika bolesti (Hjelle i Torres-Pérez 2010). HCPS je uzrokovan virusom SNV i srodnim virusima u Sjevernoj Americi te ANDV-om, ortohantavirusom Laguna Negra i srodnim virusima u Južnoj Americi (Hjelle i Torres-Pérez 2010; Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). HCPS uzrokuje teške oblike bolesti s visokom razinom smrtnosti od 30 – 40% (Macneil, Nichol, i Spiropoulou 2011).

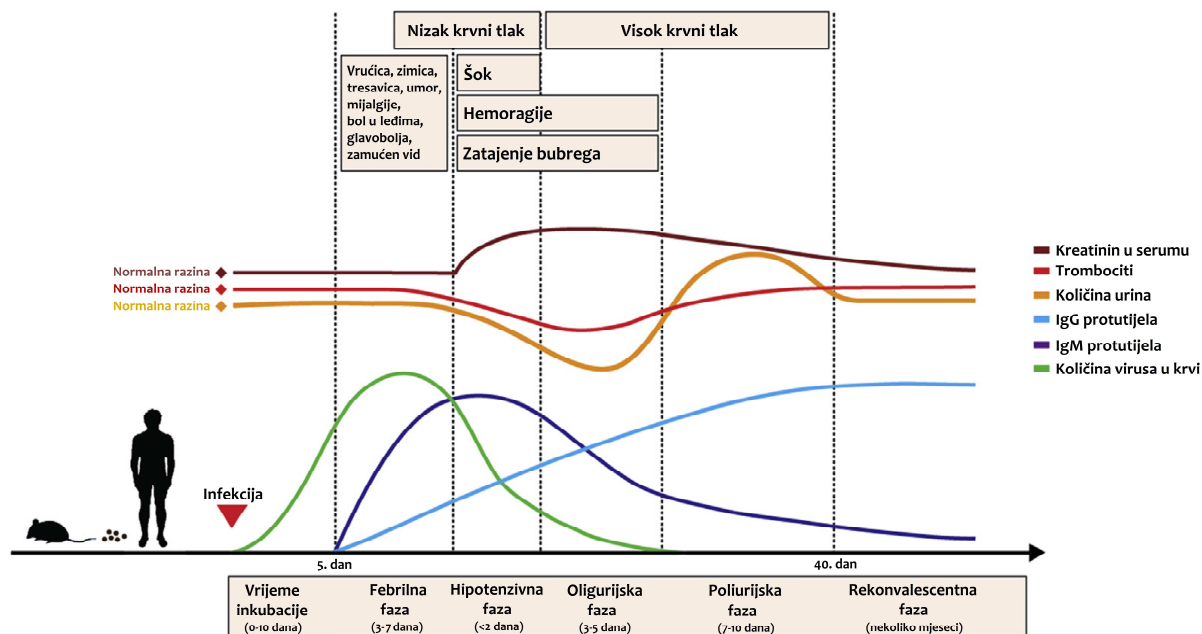
HVBS ima većinom bimodalnu pojavu u proljeće i jesen kada su najveće populacije zaraženih glodavaca, dok je tijekom ljeta smanjena učestalost bolesti uslijed povišenih temperatura te sunčevog zračenja koji utječu na vijabilnost virusa (Paul Heyman i ostali 2012). U Kini se HVBS javlja tokom cijele godine, ali najviše slučajeva je dokazano u studenom i prosincu (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). HVBS uzrokovan SEOV-om javlja se tijekom cijele godine, ali također ima tendenciju biti češći u jesen i zimi u umjerenom klimi (Clement i ostali 2019). HCPS slučajevi u Sjevernoj Americi se javljaju tijekom cijele godine, dok se u Južnoj Americi uglavnom pojavljuju u proljetnim i ljetnim mjesecima (rujan – siječanj) (Llah i ostali 2018). Dvije studije pokazale su kako pušači imaju povećan rizik od stjecanja infekcije te oboljevanja od HVBS-a (Medved i ostali 2002; K. Vapalahti i ostali 2010). Broj slučajeva varira i zemljopisno i godišnje od sporadičnih slučajeva u neepidemijskom razdoblju do pojave epidemija svakih nekoliko godina (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Čimbenici koji utječu na pojavu epidemija su dosta kompleksni te međusobno povezani (Paul Heyman i ostali 2012). Pojednostavljeno, na pojavu epidemija utječu abiotički i biotički uvjeti koji doprinose povećanju gustoće populacije glodavaca na lokalnom području, prevalencija

infekcije u populaciji glodavaca, količina izlučenog virusa u okoliš, preživljenje virusa u okolišu i ljudsko ponašanje kojim ljudi dolaze u bliski kontakt sa zaraženim izlučevinama glodavaca (Paul Heyman i ostali 2012).

### **2.2.2. Klinička slika, liječenje i profilaksa HVBS-a**

Nakon udisanja čestice virusa najprije putuju do epitela pluća. U alveolama na spoju epitela i endotela se događa zaustavljanje ili propuštanje virusa u organizam te pojava simptoma upale i mogući razvoj bolesti. Klinička prezentacija HVBS-a varira od asimptomatske, blage, srednje teške do teške hemoragijske bolesti sa zatajenjem organa (Avšič-Županc, Saksida, i Korva 2019). Težina HVBS-a djelomično ovisi o vrsti virusa (HTNV i DOBV uzrokuju teže oblike, SEOV srednje, a PUUV blaže), djelomično o genetskim čimbenicima bolesnika (učestalost pojedinih HLA haplotipova, polimorfizam imunskih i drugih gena) (Mustonen i ostali 1996; Mäkelä i ostali 2001; M. L. Wang i ostali 2009; Misa Korva i ostali 2011), a dio uzroka je još uvijek nepoznat. Prisutan je individualan odgovor na infekciju, tako neka osoba može imati tešku infekciju s virusom PUUV, dok druga pak blagu infekciju s virusom HTNV (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010).

HVBS se primarno smatra imunosno posredovanom bolešću zbog duge inkubacije od obično dva tjedna (od jednog do šest tjedana) (Kramski i ostali 2009; Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). HVBS je akutna bolest praćena općim simptomima (vrućica, zimica, tresavica, bolovi u mišićima i zglobovima, bolovi u leđima, umor, glavobolja, zamućen vid) (Markotic 2002, Kruger 2011, Avsic 2019). U bolesnika je vrlo često prisutna bol u očnim jabučicama, zamućenost vida te kratkotrajno sljepilo (C Schmaljohn i Hjelle 1997). Respiratorni simptomi (kašljanje, kihanje, patološki rentgen pluća) su česti te povezani s infekcijom virusom PUUV. Upala pluća s intersticijskim upalnim infiltratima i ponekad pleuralnim izljevima su prisutni kod otprilike polovice bolesnika (Avsic-Zupanc i ostali 1999; Alemka Markotić i ostali 2002). U bolesnika su česti i simptomi poremećaja centralnog živčanog sustava, kao glavobolja i mučnina, ali zabilježeni su i epileptički napadi popraćeni patološkim elektroencefalogramom ili intracerebralnim krvarenjem (Alexeyev i Morozov 1995; Avsic-Zupanc i ostali 1999; A Markotić i ostali 2002; Cerar i ostali 2007). U bolesnika oboljelih od DOBV su česte hemoragijske komplikacije, izražena trombocitopenija, šok, zatajenje bubrega i potreba za dijalizom, pleuralni ili abdominalni izljevi te poremećaji u radu srca (Avsic-Zupanc i ostali 1999).



**Slika 6.** Klinički tijek HVBS-a u ljudi. Uobičajeni tijek HVBS-a može se podijeliti u pet različitih faza: febrilna, hipotenzivna, oligurijska, poliurijska i rekonvalescentna. Kako virusno opterećenje doseže svoj vrhunac pojavljuju se prvi klinički simptomi te rastu protutijela. Specifične laboratorijske pretrage su smanjenje broja trombocita i smanjenje količina izlučenog urina te povećanje kreatinina u serumu. Modificirano prema Avšič-Županc et al. 2019.

HVBS zahvaća skoro sve organe i organske sustave (bubrege, pluća, kardiovaskularni sustav, središnji živčani sustav, gastrointestinalni sustav, endokrini sustav) (Avšič Županc, Korva, i Markotić 2014). HVBS utječe primarno na funkciju rada bubrega, dok HCPS utječe na rad pluća; ipak kod HVBS-a također susrećemo kardiopulmonalnu uključenost, a kod HCPS-a bubrežno zatajenje (Kanerva i ostali 1996; Passaro i ostali 2001; Rasmuson i ostali 2011; Clement, Maes, i Van Ranst 2014). Klinički tijek bolesti HVBS-a može se podijeliti u pet različitih faza: febrilna, hipotenzivna, oligurijska, poliurijska i rekonvalescentna. Febrilna faza traje 3-7 dana. Tijekom febrilne faze je u krvi bolesnika prisutna mjerljiva viremija, koja može biti prisutna čak do 30 dana od početka bolesti te duljina viremije ovisi o vrsti virusa (Saksida i ostali 2008; M. Korva i ostali 2013). Također, ovisno o vrsti virusa (HTNV, DOBV, SNV), u bolesnika s teškim oblikom bolesti detektirane su veće količine virusa u krvi nego u bolesnika s blažom infekcijom te je pokazano kako količine virusa u krvi koreliraju s

težinom bolesti (M. Terajima i ostali 1999; Xiao i ostali 2006; Saksida i ostali 2008; M. Korva i ostali 2013; Yi i ostali 2013). Ipak, kod infekcija s virusom PUUV nisu primijećene poveznice između količine virusa i težine bolesti (Cvetko Krajinović 2014; Pettersson et al. 2014). Pri kraju febrilne faze pojavljuju se imunoglobulini klase M (IgM) te hemoragije konjunktiva i fine petehije na nepcu (Avšič-Županc, Saksida, i Korva 2019). Sljedeća, hipotenzivna, faza može trajati nekoliko sati do 2 dana. Tijekom te faze razvija se hipotenzija, tahikardija, povećana je vaskularna propusnost, izražena trombocitopenija i leukocitoza, hemoragije u tkivima i šok te mogući smrtni ishod kod težih bolesnika (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). Tijekom oligurijske faza koja traje 3 – 5 dana stabilizira se krvni tlak, ali nastupa pogoršanje bubrežne funkcije koje dovodi do oligurije te anurije i povećanih razina uree i kreatinina u serumu (Avšič-Županc, Saksida, i Korva 2019). U toj fazi je zabilježena polovina svih smrtnih ishoda (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). U poliurijskoj fazi počinje faza oporavka bubrežne funkcije te povećanje izlučivanja urina od nekoliko litara u danu. Ta faza može trajati 7 – 10 dana. Rekonvalescentna faza traje od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Bolesnici se većinom potpuno oporave, ali zabilježene su i dugotrajne posljedice u vidu hipertenzije i proteinurije (Linderholm i Elgh 2001; Ledina 2011).

U Europi i Hrvatskoj trenutno ne postoje odobreni antivirusni lijekovi, cjepiva ili imunoterapija protiv ortohantavirusa. Liječenje je simptomatsko i suportivno s pažljivim održavanjem elektrolita, hidracije i iznosom diureze (Avšič-Županc, Saksida, i Korva 2019). Bolesnici s teškim bubrežnim zatajenjem liječe se hemodijalizom (Avšič-Županc, Saksida, i Korva 2019). U bolesnika oboljelih od HCPS-a primijenjuje se terapija kisikom i mehanička ventilacija (Jonsson, Hooper, i Mertz 2008). Ribavirin (analog nukleozida) ima antivirusnu aktivnost protiv virusa iz obitelji *Hantaviridae* i *Arenaviridae* (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010). U kliničkoj studiji u Kini su pokazali blagotvorno djelovanje ribavirina na smanjenje smrtnosti u HVBS-u ukoliko je primijenjen u početnoj fazi bolesti (Huggins i ostali 1991), dok kod HCPS bolesnika nije imao učinak (Moreli i ostali 2014). U istraživanju *in vitro* infekcije endotelnih stanica zaraženih ANDV-om ribavirin je bio jako učinkovit u sprečavanju virusne replikacije, ali je nedovoljno suprimirao obilnu proizvodnju citokina (Khaiboullina i ostali 2013). Drugo istraživanje je pokazalo kako vitronektin i fibronektin sprečavaju ulazak ortohantavirusa u stanice jer su ligandi receptora ( $\beta_3$  integrina) na endotelnim stanicama (I. N. Gavrilovskaya i ostali 1998). Također je provedena uspješna terapija bolesnika inficiranog virusom PUUV s ikatibantom, antagonistom bradikininškog receptora (Antonen i ostali 2013). Transfuzija trombocita daje se bolesnicima s izraženom

trombocitopenijom i krvarenjem (Linderholm i Elgh 2001; Jonsson, Hooper, i Mertz 2008). Transfuzija plazme od ljudi koji su preživjeli HCPS pokazala je smanjenje smrtnosti bolesnika u akutnoj fazi (Vial i ostali 2015). Razvoj cjepiva protiv ortohantavirusa otežan je nedostatkom odgovarajućih životinjskih modela bolesti (Kruger, Schonrich, i Klempa 2011). U Kini i Južnoj Koreji se preko 20 godina koriste klasična inaktivirana monovalentna i divalentna cjepiva (Park, Kim, i Moon 2004; Connie Schmaljohn 2009) koja imaju dobru efikasnost te izazivaju dobar imunski odgovor organizma (Lu, Zhu, i Weng 1996). U Južnoj Koreji se korištenjem cjepiva bilježi smanjenje broja oboljelih (Park, Kim, i Moon 2004). U SAD-u su rekombinantna vektorska i DNA cjepiva u fazi kliničkih ispitivanja (Connie Schmaljohn 2009; Kruger, Schonrich, i Klempa 2011; Connie S. Schmaljohn, Spik, i Hooper 2014). Ekspozicijska profilaksa je još uvijek najvažnija prevencija infekcije i bolesti (Kruger, Schonrich, i Klempa 2011). Preporuča se izbjegavanje kontakta s glodavcima te dizanje što manje prašine prilikom boravka u prirodi (Kruger, Schonrich, i Klempa 2011).

### **2.2.3. Patogeneza HVBS-a**

Još uvijek nisu u potpunosti poznati složeni imunopatogenetski mehanizmi kojima ortohantavirusi u ljudi uzrokuju bolest. Općenito je patogeneza povezana s poremećajem regulacije hemostaze, vaskularnom propusnošću zbog infekcije endotelnih stanica te imunskim odgovorom (Erich R. Mackow, Gorbunova, i Gavrilovskaya 2014). Ortohtantavirusi imaju tropizam za endotelne stanice, u kojima ne uzrokuju citopatski učinak (Masanori Terajima i ostali 2007). Povećana vaskularna propusnost inficiranog mikrovaskulturnog endotela te trombocitopenija glavne su značajke patogeneze razvoja HVBS-a i HCPS-a (Vaheri, Strandin, i ostali 2013; Clement, Maes, i Van Ranst 2014; Noack i ostali 2020).

Zdravi vaskularni endotel održava čvrstu barijeru u tkivima pomoću adhezijskih molekula (npr. vaskularni endotelni kadherin (VE-kadherin, od engl. *vascular endothelial cadherin*)) te solubilnih čimbenika (npr. bradikinin i vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF, od engl. *vascular endothelial growth factor*)) (Noack i ostali 2020). Sama ortohantavirusna infekcija endotelnih stanica ne remeti endotel (Niikura i ostali 2004), ali dovodi do kaskade reakcija i značajnih promjena u funkciji endotela kao barijere te funkciji inficiranih endotelnih stanica (Erich R. Mackow, Gorbunova, i Gavrilovskaya 2014). Endotelne stanice kao odgovor na infekciju izlučuju VEGF. Izlučeni VEGF veže se na endotelne receptore i odspaja adhezijske

molekule povećanjem izlučivanja dušikovih oksida (NO, od engl. *nitric oxide*) i internalizacijom VE-kadherina (Irina N. Gavrilovskaya i ostali 2008; Gorbunova i ostali 2011; Dalrymple i Mackow 2014; Noack i ostali 2020). U hipoksičnim uvjetima ti se učinci pojačavaju s više izlučenog VEGF-a uzrokujući povećanu vaskularnu propusnost (Noack i ostali 2020). Zatim, virusne čestice prisutne na endotelnim stanicama „pozivaju“ cirkulirajuće trombocite do površine endotela, čije nakupljanje pridonosi trombocitopeniji (Irina N. Gavrilovskaya, Gorbunova, i Mackow 2010; Schönrich, Krüger, i Raftery 2015; Noack i ostali 2020). Sinergija izlučenog VEGF-a i „novačenje“ trombocita dovode do internalizacije VE-kadherina, gubitka endotelne funkcije te posljedično do pojave edema i hemoragija (Irina N. Gavrilovskaya, Gorbunova, i Mackow 2010; Dalrymple i Mackow 2014; Noack i ostali 2020). Također, kod HVBS bolesnika je bubrežno zatajenje posredovano taloženjem imunokompleksa u glomerulima (Penttinen i ostali 1981; Erich R. Mackow i Gavrilovskaya 2009).

Smatra se kako je patogeneza HVBS-a dijelom posredovana imunosnim odgovorom organizma na virusnu infekciju jer je jačina imunosnog odgovora povezana s težinom bolesti (Rasmuson i ostali 2016). Prije se tzv. „citokinska oluja“ smatrala kao jedan od glavnih uzroka nastanka simptoma tijekom razvoja HVBS-a jer su u serumu, urinu i tkivima bolesnika pronađene povećane vrijednosti proinflamatornih citokina, prvenstveno IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  tijekom akutne faze bolesti (Krakauer, Leduc, i Krakauer 1995; Linderholm i ostali 1996).

Malo se zna o uključenosti pomoćničkih CD4<sup>+</sup> T-limfocita prilikom infekcije (Saavedra i ostali 2021). Aktivacija T-limfocita vjerojatno počinje s pojavom prvih simptoma bolesti. (A. Markotić i ostali 1999) pokazali su povećanje postotka naivnih i memorijskih CD4<sup>+</sup> T-limfocita dok su (Rasmuson i ostali 2016) pokazali smanjenje postotka CD4<sup>+</sup> T-limfocita u bolesnika s HVBS. Također, u bolesnika s virusom PUUV zabilježeno je povećanje regulacijskih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u usporedbi s bolesnicima s virusom DOBV, koje bi moglo ukazati kako regulatorni mehanizmi vjerojatno doprinose smanjenju štetnog imunosnog odgovora (Resman Rus i ostali 2020).

U prvim danima bolesti uslijed prisutnog virusa u endotelnim stanicama te raznim stanicama bubrega potaknuta je snažna aktivacija virusno-specifičnih citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita, koji imaju dugotrajnu memoriju (Van Epps i ostali 2002; Lindgren i ostali 2011). CD8<sup>+</sup> T-limfociti potiču vaskularnu propusnost izlučivanjem proupalnih citokina i aktivacijom ostalih stanica imunosnog sustava (Finsterbusch i ostali 2014). Primijećeno je kako su inficirane endotelne stanice zaštićene od citotoksičnog utjecaja visokih razina granzima B i perforina



koje izlučuju CD8<sup>+</sup> T-limfociti, ali susjedne neinficirane endotelne stanice su osjetljive na apoptozu (Gupta i ostali 2013).

Aktivacija i proliferacija B-limfocita se događa rano od početka simptoma. Specifični IgM prisutni su već od 1. – 3. dana bolesti (LeDuc i ostali 1990; Niklasson i ostali 1990). Specifični imunoglobulini klase G (IgG) razvijaju se sporije te se pojavljuju unutar prva dva tjedna od pojave simptoma (LeDuc i ostali 1990; Niklasson i ostali 1990). Povećanje prisutnosti protutijela je proporcionalno povezano sa smanjenjem količine virusa u krvi i tkivu (Y. Li i ostali 2020). U bolesnika s blažom bolesti ta je proliferacija puno brža i jača nego kod težih bolesnika te je kod blagih i srednje teških slučajeva zabilježena manja količina virusa s višim titrom specifičnih IgG i IgM protutijela, dok je kod teških bolesnika zabilježena veća količina virusa i niži titar specifičnih IgG i IgM protutijela (Pettersson i ostali 2014; Y. Li i ostali 2020).

Imunopatogenetska istraživanja su otežana zbog dugog razdoblja inkubacije te kasnog dolaska bolesnika na liječenje. Također su ograničena jer ne postoji adekvatni životinjski model za istraživanje HVBS-a (Schönrich i ostali 2008), kao što postoji za HCPS (model sirijskog hrčka (*Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839.)) (Safronetz i ostali 2012). Ipak, javanski makaki majmuni (*Macaca fascicularis* (Raffles, 1821.)) inficirani divljim sojem virusa PUUV su pokazivali simptome bolesti, povećane razine proupalnih citokina te su imali prisutne infiltrate T-limfocita i antigen u tkivima (J. Klingström i ostali 2002; Tarja Sironen i ostali 2008). Nedavni pokušaji HTNV infekcije miševa s ljudskim imunskim sustavom (hNSG/HLA-A2 miševi) koji imaju funkcionalne ljudske CD8<sup>+</sup> T-limfocite, pokazali su virusnu replikaciju u plućima te znakove bolesti u miševa, s ugibanjem životinja (Kobak i ostali 2015). Spomenuto istraživanje doprinijelo je spoznaji postojanja očite razlike u imunskom odgovoru te njegove uloge u patogenezi u ljudi i glodavaca (Kobak i ostali 2015).

### **2.3. Urođeni imunski sustav**

Urođeni imunski sustav je evolucijski starija obrambena strategija (od stečenog imunskog sustava) te je prisutan u svim višestaničnim organizmima (Murphy i ostali 2012). Urođeni imunski sustav uključuje: 1) fizičke barijere kao što su koža, gastrointestinalni sustav, respiratorni sustav, sluznice, cilije, nokti, trepavice i ostale dlake na tijelu; 2) kemijske barijere sluznica poput sluzi, žuči, želučane kiseline, sline, suza i znoja; 3) opće efektorske mehanizme kao što su upala, sustav komplementa i stanice urođenog imunskog sustava

(Murphy i ostali 2012). Upalni odgovor prvi je odgovor na infekciju ili iritaciju. Upala je stimulirana kemijskim čimbenicima koje oslobađaju oštećene stanice i služi za uspostavu fizičke barijere protiv širenja infekcije i za promicanje zacjeljivanja oštećenog tkiva nakon čišćenja patogena (Mccarty 2018). Sustav komplementa je biokemijska kaskada imunskog sustava koja pomaže protutijelima da očiste patogene, potiče „novačenje“ stanica urođenog imunskog sustava, obilježava patogene za uništavanje i stvara rupe na staničnoj membrani patogena, oslobađa tijelo neutraliziranih kompleksa antigen-protutijelo (R. Davis 2019). Kaskada se sastoji od 30 različitih proteina plazme koji se sintetiziraju u jetri u hepatocitima (Murphy i ostali 2012; R. Davis 2019). Stanice urođenog imunskog sustava uključuju: prirodno ubilačke stanice (NK, od engl. *natural killer cells*), mastocite, eozinofile, bazofile, monocite, makrofage, neutrofile i dendritičke stanice (DC, od engl. *dendritic cells*) (R. Davis 2019). Funkcija stanica urođenog imunskog sustava je identifikacija i uklanjanje patogena koji bi mogli uzrokovati infekciju (R. Davis 2019).

### 2.3.1. Monociti

Max Johann Sigismund Schultze (1825. – 1874.) je 1865. godine prvi opisao četiri različite vrste leukocita u krvi - limfocite, monocite, eozinofile i neutrofile te krvne pločice trombocite (Cavaillon 2011). Detaljno je opisao kretanje stanica, unutarstanične granule i fagocitozu raznih čestica i njihovo unutarstanično kretanje, što je za tadašnje mogućnosti mikroskopiranja bilo uistinu zapanjujuće (Brewer 1994). Elie Metchnikoff (1845. – 1916.) je 1882. godine primijetio fagocitozu i probavu stranog materijala (Cavaillon 2011). Elie Metchnikoff je definirao ulogu monocita/makrofaga i neutrofila tijekom upale i urođene imunosti (Cavaillon 2011). Elie Metchnikoff i Paul Ehrlich (1854. – 1915.) dobili su 1908. godine Nobelovu nagradu za njihov pionirski rad na imunosti. Taj događaj je doveo do začetka imunologije kao akademske discipline i početak razmišljanja u vezi humoralne i stanične imunosti (Kaufmann 2008).

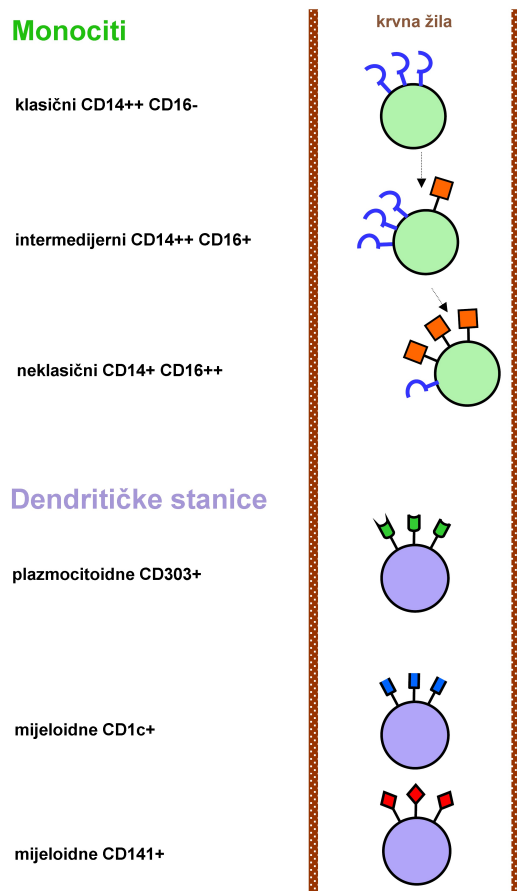
Monociti su mononuklearni leukociti koji nastaju u koštanoj srži iz pluripotentnih krvotvornih matičnih stanica stimulacijom čimbenikom stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF, od engl. *macrophage colony stimulating factor*), preko razvojnih oblika monoblasta i promonocita (Hettinger i ostali 2013). Nakon izlaska iz koštane srži, u krvotoku se zadržavaju oko jedan do četiri dana te dio njih prelazi u tkiva gdje se daljnjom diferencijacijom pretvaraju u heterogene efektorske stanice: monocitne makrofage (MDM, od engl. *monocyte-derived macrophages*) ili monocitne DC (MDDC, od engl. *monocyte-derived dendritic cells*)

(Ginhoux i Jung 2014). U prosjeku čine oko 8 – 10% populacije leukocita u ljudskoj perifernoj krvi (Das i ostali 2015). Monociti su najveće stanice normalne periferne krvi (promjera 14 – 20  $\mu\text{m}$ ). Imaju posebna morfološka obilježja koja uključuju nepravilan oblik stanice, jezgru ovalnog ili bubrežastog oblika, citoplazmatske vezikule i visok omjer jezgre prema citoplazmi (približno 3:1) (Qu i ostali 2014). Imaju primarnu ulogu u homeostazi i upali, u fagocitiranju svih čestica sa svojstvima antigena (npr. virusi, bakterije), uklanjanju apoptotičnih i nekrotičnih stanica te značajnu multifunkcionalnu ulogu u predočavanju antigena drugim stanicama urođene i stečene imunosti, što ih čini antigen prezentirajućim stanicama (Serbina i ostali 2008).

### 2.3.1.1. Monocitne subpopulacije

Monociti su u početku bili definirani na osnovi morfologije i citokemije (esteraza specifična za monocite), a kasnije protočnom citometrijom koja se temeljila na svojstvima raspršivanja svjetlosti i markerima na površini stanice kao što je CD14 (L. Ziegler-Heitbrock i ostali 2010b). CD14 je glavni biljeg ljudskih monocita, glikoprotein i mijelomonocitni diferencijacijski antigen koji djeluje kao pomoćni protein za receptor sličan Tollu 4 (TLR4, od engl. *toll-like receptor*) te je membranski receptor za lipopolisaharid (LPS, od engl. *lipopolysaccharide*) (Murphy i ostali 2012). Protočna citometrija omogućila je identifikaciju CD16 subpopulacije monocita, koju karakterizira veća ekspresija molekula razreda II glavnog sustava tkivne snošljivosti (MHC class II, od engl. *major histocompatibility complex class II*) i nakon stimulacije proizvodnja većih koncentracija TNF- $\alpha$  (Passlick, Flieger, i Ziegler-Heitbrock 1989; Belge i ostali 2002). CD16 (ili Fc $\gamma$  receptor III) je molekula obitelji Ig-a, koja je uključena u staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (ADCC, od engl. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) te je receptor IgG niskog afiniteta (Murphy i ostali 2012). CD16 je također prisutan na NK-stanicama, makrofagima i neutrofilima, gdje je uključen u uklanjanje patogena opsoniziranih protutijelima (Murphy i ostali 2012). Metode molekularne biologije – *microarray* i sekvenciranje nove generacije (NGS, od engl. *next generation sequencing*) omogućile su sve bolju karakterizaciju monocitnih subpopulacija. Od prije nekoliko godina, tehnološki razvoj doprinio je spajanju te dvije metode te su sortiranje stanica putem protočne citometrije sa sekvenciranjem pojedinačnih stanica (od engl. *single-cell RNA-seq*) unaprijedili naše razumijevanje heterogenosti monocitnih subpopulacija (Mair i Liechti 2020).

Godine 2010. međunarodni je konzorcij pod pokroviteljstvom međunarodne unije imunoloških društava (IUIS, od engl. *International Union of Immunological Societies*) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, od engl. *World Health Organization*) predložio nomenklaturu monocita i DC te njihovih subpopulacija jer pokazuju morfološku, antigensku i funkcionalnu heterogenost (Slika 7) (Gordon i Taylor 2005; L. Ziegler-Heitbrock i ostali 2010b).



**Slika 7.** Nomenklatura ljudskih monocita i dendritičkih stanica. Modificirano prema Ziegler-Heitbrock et al. 2010a.

Monociti su trenutno klasificirani u tri subpopulacije na temelju diferencijalne ekspresije molekula CD14 i CD16: „klasični” s visokim CD14, ali bez ekspresije CD16, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (također se nazivaju CD14<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> ili CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>); „intermedijerni“ s niskim CD16 i visokim CD14, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> (također nazvani CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ili CD14<sup>+</sup>CD16<sup>low</sup>) te „neklasični” s visokim CD16, ali s relativno nižom ekspresijom CD14, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> (također nazvani CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> ili CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) (Slika 7) (L. Ziegler-Heitbrock i ostali

2010b; Ginhoux i Jung 2014; Qu i ostali 2014; L. Ziegler-Heitbrock 2015). Od ukupnih monocita u ljudskoj krvi glavnu populaciju monocita čine klasični monociti 80 – 90%, dok intermedijerni čine 5% (3,5 – 7,3%), a neklasični 8 – 10% (4,8 – 13,6%) (Wong i ostali 2011; L. Ziegler-Heitbrock i Hofer 2013; Patel i ostali 2017; Cormican i Griffin 2020). Monocitne subpopulacije su jedna linija stanica u različitim fazama diferencijacije (Wong i ostali 2011). Intermedijerni monociti su izravna poveznica između klasičnih i neklasičnih monocita (L. Ziegler-Heitbrock i ostali 2010b). Najnovija istraživanja razjasnila su susljednu diferencijaciju i životni vijek subpopulacija monocita pokazavši kako klasični monociti izlaze iz koštane srži u krvotok gdje se 99% zadržava jedan dan, a potom odlazi u tkiva, dok se iz 1% njih razvijaju intermedijerni monociti, koji se u krvotoku zadržavaju četiri dana i koji se svi, 100%, diferenciraju u neklasične monocite koji se u krvotoku zadržavaju sedam dana (Patel i ostali 2017). Subpopulacije monocita se osim osnovnih fenotipskih razlika razlikuju i po svojim funkcijama i aktivnostima te pokazuju jedinstvene značajke (Weber i ostali 2000).

Klasični monociti vrlo su svestrani, sposobni reagirati na veliku raznolikost vanjskih podražaja kako bi posredovali u imunskim funkcijama ili popravku tkiva (Wong i ostali 2011). Klasični monociti imaju izražene gene koji ukazuju na antiapoptotsko, proliferativno stanje (Wong i ostali 2011). Specijalizirani su za fagocitozu, učinkoviti su „čistači“ (od engl. *scavenger*), proizvode visoke razine mijeloperoksidaze i reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) te imaju najširi raspon izlučenih citokina i kemokina (npr. G-CSF, IL-10, IL-6, CCL2, CCL5, CXCL8) (Ancuta i ostali 2009; Wong i ostali 2011; Qu i ostali 2014; Cormican i Griffin 2020). Klasični monociti pomoću TLR4 prepoznaju bakterijski proizvod LPS te počinju izlučivati visoke razine proupalnih citokina (P. Saha i Geissmann 2011). Također, većina receptora čistača/lipoproteina male gustoće i gena receptora za vezanje ugljikohidrata najjače su izražena u klasičnim monocitima. Ti receptori su odgovorni za prepoznavanje i unos raznih vlastitih i patogenih liganada (Peiser, Mukhopadhyay, i Gordon 2002; Robinson i ostali 2006). Receptore CCR2, CXCR1, CXCR2, CLEC4D i CD62L na površini stanica izražavali su samo klasični monociti (Wong i ostali 2011). CCR2 je glavni regulator izlaska monocita iz koštane srži (Weber i ostali 2000) te je kao receptor za CCL2 regulator regrutacije klasičnih monocita na mjesta infekcije (Serbina i ostali 2008). Klasični monociti eksprimiraju najviše razine CD1d, CD9, CD36, CD99, CD163 i CLEC5A na površini stanica (Wong i ostali 2011).

Intermedijarni monociti pokazuju karakteristike aktiviranih stanica te je pokazano kako izražavaju pregršt površinskih biljega s razinama između klasičnih i neklasičnih subpopulacija

(Ancuta i ostali 2009; Wong i ostali 2011). Intermedijarni monociti imaju najvišu ekspresiju gena MHC razreda II, CCR5, CD74, GFR $\alpha$ 2, CLEC10A, kostimulacijskih molekula CD40 i CD54 (ICAM-1) te povišenu intracitoplazmatsku razinu proupalnih citokina kao što je TNF- $\alpha$  (Belge i ostali 2002; Wong i ostali 2011). Visoka ekspresija MHC razreda II upućuje kako intermedijarni monociti imaju odlične funkcije stimulacije T-limfocita (Wong i ostali 2011). Intermedijarni monociti su povezani s različitim patološkim stanjima poput kardiovaskularnih bolesti, traume, sepse i autoimunosti te bi njihov povećan broj mogao biti povezan s popravkom i regeneracijom tkiva (Urta i ostali 2009; Rossol i ostali 2012; West i ostali 2012; Schauer i ostali 2014).

Nasuprot tome, neklasični monociti izlučuju najviše razine upalnih citokina (TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ), a slabi su fagociti i ne potiču sintezu molekula ROS (Belge i ostali 2002; Cros i ostali 2010). Neklasičnim monocitima nedostaje površinska ekspresija CCR2 i CCR5 (Weber i ostali 2000; Wong i ostali 2011). Receptor CX3CR1 je glavni regulator regrutacije neklasičnih monocita pomoću kojeg se vežu na CX3CL1 (fraktalkin) na endotelnim stanicama te prolaze do tkiva (Ancuta i ostali 2003; 2009; Wong i ostali 2011). Neklasični monociti imaju najvišu površinsku ekspresiju CD97, CD123, CD294, P2RX1, Siglec10 te dio njih izažava 6-sulfo LacNAc (SLAN) (Wong 2011). Neklasični monociti u krvi prisutni su uz same stijenke krvnih žila, imaju najizraženije gene za reorganizaciju citoskeleta za kretanje stanica (Wong i ostali 2011) te je predloženo kako djeluju kao čuvari vaskulature jer vrše „ophodnju“ integriteta endotelnih stanica te imaju visoko pokretljivo patrolirajuće ponašanje, ali također brzo ulaze u tkiva (Auffray i ostali 2007; Cros i ostali 2010; Wong i ostali 2011). Neklasični monociti snažno reagiraju na nukleinske kiseline i viruse te lako uklanjaju virusom zaražene ili ozlijeđene stanice putem FcR posredovane fagocitoze (Auffray i ostali 2007; Wong i ostali 2011). Neklasični monociti predstavljaju najzreliji stupanj diferencijacije monocita jer se kod njih očituje povlačenje gena staničnog ciklusa koje je obično povezano s visoko diferenciranim stanicama, također izražavaju neke gene tipične za makrofage i DC te imaju proapoptotsko, antiproliferativno stanje (H. W. Ziegler-Heitbrock i ostali 1993; Ancuta i ostali 2009; Wong i ostali 2011).

### **2.3.1.2. Aktivacija monocita**

Tijekom upale ili ozljede tkiva, monociti dolaze do ozlijeđenog mjesta u prvih satima nakon oštećenja istovremeno s infiltracijom neutrofila (Rodero i ostali 2014; Dal-Secco i ostali 2015; Patel i ostali 2017). Monocitne subpopulacije mogu djelovati proupalno ili protoupalno

ovisno o utjecaju raznih čimbenika upale iz mikrookoliša (L. Ziegler-Heitbrock i ostali 2010a). Npr. prilikom ozljede klasični monociti rano migriraju te izlučuju proupalne čimbenike, a kasnije se reprogramiraju u neklasične monocite kako bi se olakšalo pravilno zacjeljivanje rana (Dal-Secco i ostali 2015). Iako CD16+ monociti predstavljaju mali dio ukupne populacije monocita u zdravih osoba, ova je subpopulacija značajno povećana u krvi osoba tijekom upale, infekcije, intenzivnog vježbanja i stresa (Steppich i ostali 2000; Azeredo i ostali 2010; L. Ziegler-Heitbrock i ostali 2010b). Intermedijerni monociti značajno su povećani kod ortohantavirusne infekcije i teške astme, 20% čak do 50% (Moniuszko i ostali 2009; J. Wang i ostali 2014; X. Li i ostali 2018, 206). CD16+ monociti bili su mobilizirani nakon jedne minute intenzivnog vježbanja, najvjerojatnije iz „perifernih zaliha“ (od engl. *marginal pool*), koji se sastoji od mikrocirkulacije na sučelju kapilara i tkiva (Steppich i ostali 2000).

Tijekom stabilnog stanja organizma monociti mogu ući u ne-limfoidne organe i limfne čvorove bez diferencijacije u stanice MDM ili MDDC, tako nadopunjujući prijašnje dokaze kako monociti zadano postaju makrofagi ulaskom u tkiva (Jakubzick i ostali 2013). Ali, također klasični monociti mogu nadopuniti stanice MDM i MDDC tijekom stabilnog stanja organizma (Bain i ostali 2014; Guilliams i ostali 2014).

U uvjetima *in vitro* monociti se lijepe za plastiku te spontano polako diferenciraju, čak bez dodavanja M-CSF-a (Kaplan i Gaudernack 1982). M-CSF je važan kofaktor preživljenja i diferencijacije monocita. Još uvijek nisu potpuno okarakterizirani svi signali potrebni za diferencijaciju monocita u MDM, *in vivo* ni u uvjetima *in vitro* (Becker, Warren, i Haskill 1987; Brugger, Kreutz, i Andreesen 1991). Primarni monociti izolirani iz mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC, od engl. *peripheral blood mononuclear cells*) mogu u uvjetima *in vitro* biti diferencirani u CD14<sup>++</sup> MDM-ove, pomoću kultivacije M-CSF-om tijekom 5 – 7 dana (Italiani i Boraschi 2014). Doduše, takve stanice su nezrele te ih je potrebno aktivirati u željeni pro- ili protu-upalni oblik kultivacijom sa željenim citokinima tijekom dva dana (H. Liu i ostali 2008; Italiani i Boraschi 2014; Ginhoux i ostali 2016). Proces diferencijacije potpomaže pozitivna povratna sprega M-CSF-a i njegovog receptora CSF1R (H. Liu i ostali 2008). Također, rano u procesu diferencijacije povećava se ekspresija gena za kemokine, uključujući CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL24 i CXCL5, koji privlače druge imunosne stanice (Mantovani, Bonocchi, i Locati 2006; H. Liu i ostali 2008). Receptor CCR1 je također lagano povišen. Međutim, tijekom ranih sati smanjuje se ekspresija molekula MHC razreda II

što ukazuje kako se smanjuje sposobnost prezentacije antigena (H. Liu i ostali 2008). Monociti kultivirani u uvjetima *in vitro* diferenciraju i aktiviraju, ali ne proliferiraju (L. J. Zhou i Tedder 1996).

### **2.3.2. Monocitni makrofagi**

Monociti koji tijekom infekcije i ozljede pod utjecajem kemokina i komplementa iz cirkulacije prelaze u tkiva nazivamo MDM i MDCC (Ginhoux i Jung 2014). MDM su heterogena populacija značajne funkcionalne plastičnosti, koji predočuju antigene drugim stanicama urođene i stečene imunosti. Plastičnost stanica MDM nužna je za održavanje homeostaze u različitim tkivima (Ballinger i Christman 2016). Te se stanice u tkivu potpuno diferenciraju i aktiviraju. Sposobnost diferencijacije monocita u stanice MDM ili MDCC istraživana je u uvjetima *in vitro* već prije 30 godina. Još uvijek se koriste isti načini diferencijacije zbog nemogućnosti dobivanja dovoljnih količina primarnih stanica (Haniffa, Bigley, i Collin 2015).

S obzirom na to da su stanice MDM adherentne te zahtijevaju odvajanje od podloge koje ih može oštetiti i utjecati na ekspresiju površinskih markera (S. Chen i ostali 2015), rad sa stanicama MDM je zahtjevan u uvjetima *in vitro*.

#### **2.3.2.1. Aktivacija, vrste i funkcije monocitnih makrofaga**

Pod utjecajem signala iz mikrookoliša dolazi do funkcionalne aktivacije stanica MDM. Proupalna aktivacija stanica MDM javlja se pod utjecajem IFN- $\gamma$ , LPS-a te GM-CSF-a koji dalje potiču lučenje proupalnih citokina (npr. IL-1 $\beta$ , TNF, IL-12, IL-18). Fenotipski proupalni MDM-ovi ekspimiraju visoke razine molekula MHC razreda II, CD68 te kostimulacijskih molekula CD40, CD80 i CD86 (Chávez-Galán i ostali 2015). Protuupalna aktivacija stanica MDM javlja se u fazi rješavanja upale, a sudjeluju u popravku tkiva, angiogenezi i alergijskim bolestima (Chávez-Galán i ostali 2015). Aktivacija u protuupalnu subpopulaciju MDM je pod utjecajem M-CSF-a, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  i IL-13, proizvedeći IL-10 u velikim i IL-12 u malim količinama. Fenotipski ekspimiraju visoke razine molekula CD206, CD200R, CD301a/b te niske razine MHC II (Chávez-Galán i ostali 2015). Makrofagi te MDM početno su nazivani M1 (proupalni, klasični) i M2 (protuupalni, alternativni) makrofagi kako bi se slijedilo



diferencijaciju T-limfocita u Th1 ili Th2 stanja (Ginhoux i ostali 2016). Budući da su makrofagi te MDM izrazito plastične stanice, podjela u opisane subpopulacije M1 i M2 predstavlja krajnje točke pojedinog aktivacijskog stanja jer stanice *in vivo* i u uvjetima *in vitro* zadržavaju mogućnost promjene svojeg aktivacijskog stanja (Italiani i ostali 2014; Martinez i Gordon 2014).

Izazov predstavlja identifikacija raznih površinskih markera karakterističnih za subpopulacije MDM-ova (Ballinger i Christman 2016). Istraživanja su pokazala kako je CD206, manozni receptor, receptor stanične adhezije i prepoznavanja manoznih struktura patogena. Za CD206 smatralo se kako je indikator protuupalno aktiviranih makrofaga, međutim, sada postoji opći konsenzus kako CD206 izražavaju populacije tkivnih plućnih makrofaga, ali također stanice MDM i MDDC (Ballinger i Christman 2016; Lescoat i ostali 2018). CD163 je receptor „čistač“ (od engl. *scavenger receptor*) za hemoglobin/hem (J. Wang i ostali 2014). Prisutan je na površini stanica te unutarstanično pa se može izlučivati iz stanica (Backé i ostali 1991). Visoko je izražen na površini klasičnih i intermedijernih monocita (Wong i ostali 2011), marker je MDM-ova aktiviranih M-CSF-om (Lescoat i ostali 2018), ali nije prisutan na DC-ovima i Langerhans-ovim stanicama (Backé i ostali 1991). CD40 je kostimulacijska molekula izražena na površini antigen prezentirajućih stanica te B-limfocita (Elgueta i ostali 2009). Nakon aktivacije s CD40L potiče aktivaciju jezgrenog čimbenika  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) te povećanje upalnih citokina (Quezada i ostali 2004).

Postoje i tkivni makrofagi (od engl. *tissue-resident macrophages*) poput Kupffer-ovih stanica u jetri, Langerhans-ovih stanica u koži, mikroglija u mozgu, alveolarnih makrofaga u plućima, peritonealnih makrofaga u seroznim šupljinama te ostalim organima i tkivima, osteoklasta i ostealnih makrofaga u kostima (Andreis et al. 2009). Populacije tkivnih makrofaga nadopunjuju se kombinacijom lokalne proliferacije prekursora i regrutiranja monocita iz koštane srži te ovise o vrsti tkiva. Intestinalni makrofagi u sloju „*lamina propria*“ u potpunosti se nadopunjuju regrutacijom monocita, dok monociti nemaju utjecaj na stanice mikroglije u mozgu i epidermalne Langerhans-ove stanice (Italiani i Boraschi 2014). Tkivni makrofagi su podrijetlom makrofagi iz žumanjčane vreće (od engl. *yolk sac-derived macrophages*), a MDM su po podrijetlu iz dva izvora: makrofagi iz fetusne jetre (od engl. *fetal liver-derived macrophages*) i makrofagi dobiveni iz koštane srži (od engl. *bone marrow-derived macrophages*) (Italiani i Boraschi 2014). Na mehanizam nadoknađivanja tkivnih populacija uvelike utječe prisutnost upale ili ozljede jer je u tim uvjetima očita veća ovisnost o

prekursorima iz cirkulacije (Gordon i Taylor 2005). Monociti, MDM i makrofagi imaju ključne, ali različite uloge u homeostazi tkiva i imunitetu (Martinez i ostali 2006). Monociti su ključni igrači tijekom upale i infekcije, dok MDM i tkivni makrofagi igraju važne funkcije u razvoju i homeostazi tkiva te rješavanju upale (Ginhoux i Jung 2014).

### **2.3.3. Dendritičke stanice**

Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2011. godine dodijeljena je Ralphu Steinmanu za njegovo otkriće stanica koje je nazvao dendritičkim stanicama te opisu njihove uloge u stečenoj imunosti (Nussenzweig 2011). Pokazao je kako signali koji proizlaze iz urođenog imunskog odgovora, a koje opažaju dendritičke stanice, kontroliraju aktivaciju T-limfocita. To omogućava imunskom sustavu reakciju na patogene, a istovremeno izbjegava napad na vlastite molekule.

Dendritičke stanice su mononuklearni fagociti prisutni u krvi, limfnim organima i svim tkivima (Haniffa, Bigley, i Collin 2015; Schraml i Reis e Sousa 2015). DC su ključne za prezentaciju peptida i proteina T- i B-limfocitima te povezuju i reguliraju urođeni i stečeni imunski sustav (Guilliams i ostali 2014; Haniffa, Bigley, i Collin 2015). DC su heterogena skupina stanica s jedinstvenim funkcijama u imunskom odgovoru, a subpopulacije DC-ova su definirane kombinacijom morfologije, fizičkih svojstava, funkcije, lokalizacije i molekularnih markera (Stupin Polancec 2011; Haniffa, Bigley, i Collin 2015; Schraml i Reis e Sousa 2015).

#### **2.3.3.1. Vrste i funkcije dendritičkih stanica**

Prema važećoj nomenklaturi iz 2010. godine DC dijelimo u tri subpopulacije: plazmocitoidne (pDC)  $CD303^+/BDCA-2^+$  i mijeloidne/konvencionalne (cDC) koje se mogu podijeliti u 2 populacije ovisno o ekspresiji molekula  $CD141^+$  i  $CD1c^+$  na svojoj površini: cDC1 ( $CD141^+/BDCA-3^+$ ) te cDC2 ( $CD1c^+/BDCA-1^+Fc\epsilon RI\alpha^+$ ) (Slika 7) (L. Ziegler-Heitbrock i ostali 2010b). pDC su specijalizirane za proizvodnju IFN tipa I kao odgovora na virusnu infekciju, dok su cDC efikasne u antigen-specifičnoj stimulaciji  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T-limfocita (Haniffa, Bigley, i Collin 2015).

Koristeći RNA sekvenciranje pojedinačnih stanica autori su u nedavnom radu identificirali ukupno šest subpopulacija ljudskih DC-ova: pDC koje stvaraju interferon ( $CD123^+CD303^+$ );

cDC1 (CD141<sup>+</sup>CLEC9A<sup>+</sup>); cDC2A (CD1c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>++</sup>); cDC2B (CD1c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>S100A9<sup>+</sup>S100A8<sup>+</sup>); prijašnje slabo karakterizirana subpopulacija (CD11c<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup>CD141<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) te do sada potpuno nepoznata subpopulacija AS DC (AXL<sup>+</sup>SIGLEC6<sup>+</sup>CD123<sup>hi</sup>CD11c<sup>hi</sup>) za koje su ustanovili kako čine kontinuum iz transkripcijskog stanja pDC u transkripcijsko stanje cDC (Villani i ostali 2017). AS DC čine 2–3% ukupnih DC-ova te eksprimiraju kostimulacijsku molekulu CD86 i komponente prezentacije antigena, stimuliraju proliferaciju CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita (Villani i ostali 2017). AS DC eksprimiraju CLA i CD62L, ali ne i CCR7 što upućuje na potencijalno usmjeravanje iz cirkulacije u periferna tkiva poput kože i limfnih čvorova (Villani i ostali 2017).

### 2.3.3.2. Aktivacija dendritičkih stanica

DC se mogu aktivirati direktno preko antigena patogena i indirektno preko upalnih medijatora koje proizvode druge stanice koje prepoznaju takve antigene. DC se također aktiviraju staničnim stresom i poremećajem u međustaničnom prostoru (Reis e Sousa 2004). Mnoštvo urođenih signalnih puteva aktivacije DC-ova se, vjerojatno, razvilo kako bi rano detektiralo znakove upale, prije prekomjerne replikacije patogena (Reis e Sousa 2004).

Primarni monociti mogu u uvjetima *in vitro* pomoću kultivacije GM-CSF-om + IL-4 tijekom sedam dana biti diferencirani u MDDC-ove (CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>low/-</sup>) (Chapuis i ostali 1997). Takve stanice imaju morfološke i funkcionalne karakteristike nezrelih DC-ova jer ne eksprimiraju CD83 (Pickl i ostali 1996). Za ekspresiju CD83<sup>+</sup> potrebno je uvesti i TNF- $\alpha$  (stimulacija GM-CSF/IL-4/TNF- $\alpha$ ) (L. J. Zhou i Tedder 1996). Ekspresija CD1a<sup>+</sup> je povezana s polariziranim fenotipom cDC1 jer te stanice imaju sposobnost proizvodnje IL-12 i potentnu imunogenost. Također, tim MDDC-ovima nedostaju neki ključni DC markeri pa je moguće kako monociti nemaju mogućnost biti diferencirani u prave DC-ove pomoću kultivacije GM-CSF-om+IL-4 ili su jednostavno signalni putevi prerasnoliki (Ohradanova-Repic i ostali 2016). Kod monocita, MDM-ova te MDDC-ova nisu zabilježeni CD135 (Flt-3) koji ograničava razvoj DC-ova putem Flt3L gradijenta, CD370 (Clec9A) koji je specifičan za CD141<sup>+</sup> cDC1, Axl koji je specifičan za AXL<sup>+</sup>SIGLEC6<sup>+</sup> populaciju DC te pDC marker CD85g/ILT7 (Ohradanova-Repic i ostali 2016).

U uvjetima *in vitro* rad sa stanicama MDDC je tehnički manje zahtjevan s obzirom na to da su neadherentne stanice te ne zahtjevaju odvajanje od podloge.

## 2.4. Imunoreakcije urođene imunosti na infekcije ortohantavirusima

Interakcijama između stanica i virusa tijekom milijuna godina, oboje su razvili različite mehanizme prepoznavanja ili izbjegavanja odgovora na infekciju. Jedni od prvih antivirusnih proteina su IFN tipa I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$ ) koji aktiviraju i stanice urođene i stanice stečene imunosti (Seth, Sun, i Chen 2006; de Padilla i Niewold 2016). Tako prepoznavanje virusne RNA u stanicama vodi aktivaciji više signalnih puteva koji dovode do proizvodnje IFN tipa I (Seth, Sun, i Chen 2006; Matthys i Mackow 2012). Interferoni dalje aktiviraju različite gene (npr. IFN stimulirani geni (ISG, od engl. *interferon-stimulated genes*), MxA) vezane uz ograničavanje replikacije virusa. Sposobnost ortohantavirusa da inhibiraju urođenu imunost se ostvaruje u vidu njihovog različitog stupnja patogenosti (Vaheri, Strandin, i ostali 2013). Svi ortohantavirusi induciraju IFN tipa I u inficiranim stanicama, ali se razlikuju u jačini i trajanju lučenja izotipova IFN- $\alpha$  te u daljnjem imunom odgovoru (Geimonen i ostali 2002; Spiropoulou i ostali 2007; Handke i ostali 2009; Matthys i ostali 2011). Tako patogeni ortohantavirusi uspješno izbjegavaju ranu indukciju IFN tipa I pomoću svojih proteina te tako omogućuju početnu neprimjetnu replikaciju unutar stanica (Kraus i ostali 2004). Nepatogeni ortohantavirus Prospect Hill (PHV) ne uspijeva suprimirati sintezu IFN tipa I pa to dovodi do ranog sprečavanja replikacije virusa u stanicama (Matthys i Mackow 2012). Također, i patogeni i nepatogeni ortohantavirusi čiji su domaćini iz obitelji *Cricetidae* (npr. PUUV i TULV) imaju funkcionalni otvoreni okvir čitanja za proteine NSs, koji inhibiraju ekspresiju IFN- $\beta$  te doprinose preživljavanju virusa (Jääskeläinen i ostali 2007a). Nepatogeni virus TULV se uspješno replicira u ljudskim stanicama, što ukazuje kako osim izbjegavanja indukcije IFN-a tipa I postoje i drugi čimbenici koji utječu na sposobnost ortohantavirusa da budu patogeni (Matthys i ostali 2011; Matthys i Mackow 2012).

Cvetko Krajinović, 2014. pokazala je supresiju ranog imunološkog odgovora, perifernih mononuklearnih stanica u bolesnika inficiranih s virusom PUUV, na razini ekspresije gena važnih za sintezu receptora za prepoznavanje općih struktura (PRR-ova), kemokina i njihovih receptora, citokina, čimbenika transkripcije, kao i nekih signalnih molekula.

### 2.4.1. Imunoreakcije stanica urođene imunosti

Stanice urođene imunosti (monociti, makrofagi, DC, NK-stanice, neutrofili) pokreću adekvatan imunski odgovor te sudjeluju u regulaciji upale. Patogeni i apatogeni ortohantavirusi mogu uspješno zaraziti te se replicirati u stanicama MDM i MDCC glodavaca

i ljudi (Nagai i ostali 1985; P. W. Lee i ostali 1986; Temonen i ostali 1993; 1995; Raftery i ostali 2002b; Masanori Terajima i ostali 2004; Cebalo i Markotić 2007; Alemka Markotić i ostali 2007b; Marsac i ostali 2011; Scholz i ostali 2017). Također, Temonen i sur. 1995 su pokazali aktivnu infekciju i replikaciju monocitnih staničnih linija s virusom PUUV, iako je učinkovitost infekcije bila je vrlo niska, 5 – 10% u usporedbi s infekcijom endotela. Druge stanice urođene imunosti (NK-stanice, neutrofili, eozinofili, bazofili) te stanice stečene imunosti (T- i B-limfociti) nisu prijemčive na infekciju ortohantavirusima (Raftery i ostali 2020). Infekcija nema direktni citopatski učinak na stanice (Temonen i ostali 1993). Monocite subpopulacije su značajno promijenjene u bolesnika tijekom akutne faze infekcije s HTNV-om: intermedijarni monociti su značajno povišeni, a klasični te neklasični su značajno sniženi (J. Wang i ostali 2014). U bolesnika inficiranih s virusom PUUV značajno su snižene sve monocitne subpopulacije te sve DC subpopulacije, tijekom akutne faze bolesti (Scholz i ostali 2017). Sniženje populacija monocita i DC-ova u krvi je posljedica mobilizacije stanica te izlaska iz cirkulacije u tkiva, na mjesta upale (Scholz i ostali 2017). Također, alveolarni makrofagi su osjetljivi na infekciju hantavirusima (Khaiboullina i ostali 2000; Scholz i ostali 2017). S obzirom na to kako su ciljne stanice ortohantavirusa monociti te endotelne stanice, virus mora prolaziti iz pluća, plućnog epitela i endotela do vaskularnog i bubrežnog endotela (Alemka Markotić i Schmaljohn 2008; Scholz i ostali 2017). Pretpostavlja se kako ortohantavirusima zaraženi monociti i MDM/MDDC-ovi igraju ulogu u diseminaciji virusa u organizmu. Zreli MDM zaraženi s virusom PUUV u 6. danu diferencijacije bili su osjetljiviji na infekciju nego rani MDM jer su proizvodili više virusa (Temonen i ostali 1995). Zaražene DC te MDDC mogu sudjelovati u transportu virusa do regionalnih limfnih čvorova, gdje mogu dalje zaraziti druge stanice imunološkog sustava (Raftery i ostali 2002a). U većini biopsija bubrega ljudi oboljelih od HBVS-a pronađeni su intersticijski infiltrati proupalnih stanica (većinom CD8<sup>+</sup> T-limfociti, monociti/makrofagi, eozinofili, neutrofili, plazma stanice) (Mustonen i ostali 1994; Temonen i ostali 1996). Također, virusni antigen je u bolesnika s HCPS-om pronađen u limfoidnim folikulima slezene, posebno u folikularnim DC-ovima te u tkivnim makrofagima (Zaki i ostali 1995). Ortohantavirusi induciraju aktivaciju i sazrijevanje MDDC uz povećanu ekspresiju ko-stimulatornih, adhezijskih i MHC II molekula (Raftery i ostali 2002a; Alemka Markotić i ostali 2007a). Inficirane DC potiču aktivaciju ostalih stanica imunskog sustava, NK-stanica te T- i B- limfocita, koje počinju specifični imunski odgovor protiv ortohantavirusa (Schönrich i Raftery 2019).

NK-stanice su u krvi bolesnika na početku pojave simptoma HBVS-a značajno snižene (J. Klingström i ostali 2019), dok je tijekom kasnije akutne faze te u konvalescentnoj fazi bolesti

glavna populacija NK-stanica (CD56<sup>dim</sup>) značajno povišena te ostaje značajno povišena čak duže od dva mjeseca nakon oporavka bolesnika (Björkström i ostali 2011; J. Klingström i ostali 2019). CD56<sup>dim</sup> NK-stanice su snažno aktivirane jer eksprimiraju povišene razine aktivacijskih receptora (NKG2D, 2B4), citotoksičnih receptora (NKp30, NKp46) te granzim B i perforin (Braun i ostali 2014). Također, kod polovice CD56<sup>dim</sup> NK-stanica je zabilježen proliferacijski marker (Ki67) (Björkström i ostali 2011).

Tijekom HVBS-a je u bolesnika zabilježen povećan broj neutrofila koji je povezan s težim oblikom bolesti (Zaki i ostali 1995; Strandin i ostali 2018). U bolesnika s HVBS-om te u infekciji u uvjetima *in vitro* neutrofilu ispuštaju cirkulirajuće neutrofilne izvanstanične klopke (NETs, od engl. *neutrophil extracellular traps*) (Raftery i ostali 2014). Tijekom interakcije s aktiviranim endotelom neutrofilu ispuštaju NETs, histone, protein 3 srodan s pentaksinom (PTX3, od engl. *pentraxin-related protein 3*), TNF- $\alpha$  i VEGF koji povećavaju vaskularnu permeabilnost (T. K. Outinen i ostali 2012; Finsterbusch i ostali 2014; Schönrich, Krüger, i Raftery 2015).

#### **2.4.2. Imunoreakcije solubilnih komponenti urođene imunosti**

Solubilne komponente (citokine, kemokine, čimbenike i stimulatore rasta stanica) izlučuju sve stanice urođene te stečene imunosti kao odgovor na proupalne signale u mikrookolišu.

Citokini i kemokini jedan su od glavnih uzroka simptoma u bolesnika oboljelih od HVBS-a i HCPS-a (Vaheri, Strandin, i ostali 2013). Povišene vrijednosti ranih proupalnih citokina, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, pronađene su u plazmi, urinu i tkivima bolesnika (Linderholm i ostali 1996; Borges i ostali 2008; Tuula K. Outinen i ostali 2010). IL-6 se koristi kao marker težine bolesti jer su visoke vrijednosti povezane s težim bubrežnim oštećenjem i trombocitopenijom u HVBS bolesnika te sa smrtnim ishodom kod HCPS bolesnika (Linderholm i ostali 1996; Borges i ostali 2008; Tuula K. Outinen i ostali 2010). TNF- $\alpha$  i IL-6 induciraju proizvodnju dušikovih oksida (NO), a povišene razine NO su prisutne u bolesnika (Linderholm, Groeneveld, i Tärnvik 1996; I. C. Davis i ostali 2002). CXCL8 je značano povišen i pozitivno korelira s teškim oblikom bolesti (Kyriakidis i Papa 2013; Strandin i ostali 2018).

Sustav komplementa je također aktiviran u akutnoj fazi HVBS-a te je aktivacija komponenti komplementa povezana s težinom bolesti jer povećava vaskularnu permeabilnost (Paakkala i ostali 2000; Jussi Sane i ostali 2012). Na aktivaciju komplementa utječu proteini akutne faze upale, npr. C-reaktivni protein (CRP) i PTX3 koji su povišeni tijekom akutne faze bolesti (T. K. Outinen i ostali 2012; Jaillon i ostali 2014). Aktivirane komponente komplementa C3a and

C5a koje se proizvode tijekom aktivacije komplekta utječu na reorganizaciju citoskeleta u endotelnim stanicama te na izlučivanje CXCL8 (Monsinjon i ostali 2003).

Kao odgovor na infekciju ortohantavirusima, aktiviraju se monociti, makrofagi, DC te počinju izlučivati proupalne citokine (npr IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN tipa I) i kemokine (npr. CCL5, CXCL10) (Alemka Markotić i ostali 2007a). Citokini, kemokini te aktivirani komplement čine pozitivnu povratnu spregu te time privlače još više imunskih stanica prema inficiranom endotelu pogoršavajući upalu (Schönrich, Krüger, i Raftery 2015; Saavedra i ostali 2021).

IL-15 jedan je od citokina koji utječu na proliferaciju i perzistenciju NK-stanica (Braun i ostali 2014). Povišene koncentracije IL-15 su prisutne u bolesnika s virusom PUUV, čak duže od dva mjeseca nakon oporavka (Björkström i ostali 2011) upućujući kako je IL-15 uključen u proliferaciju CD56<sup>dim</sup> NK-stanica.

Pokazano je kako ljudski alveolarni makrofagi zaraženi visokopatogenim ortohantavirusima proizvode niske razine TNF- $\alpha$  i GM-CSF-a (Khaiboullina i ostali 2000; Alemka Markotić i ostali 2007a). MDCC-ovi inficirani u uvjetima *in vitro* proizvode visoke razine TNF- $\alpha$  i IFN- $\alpha$ , dok izlučivanje IL-12 izostaje (Raftery i ostali 2002a).

Infekcija *in vitro* s virusom PUUV u stanicama MDM inducira vrlo niske koncentracije IFN- $\alpha$  detektirane u kasnijoj fazi infekcije (5-7 dana nakon infekcije), ali potiče proizvodnju antivirusnog proteina MxA (Temonen i ostali 1995). Zrele stanice MDM osjetljivije su na infekciju s virusom PUUV te proizvode više virusa (Temonen i ostali 1995). Visokopatogeni ortohantavirusi induciraju sintezu  $\beta$ -kemokina (CCL3, CCL4, CCL5) u stanicama MDM te povećavaju gensku ekspresiju njihovih receptora (CCR1, CCR5) (Alemka Markotić i ostali 2007a). Nakon infekcije apatogenim virusom TULV stanice MDM proizvode većinom kemokine (CXCL8, CCL2, CCL4) bez značajne proizvodnje citokina (Cebalo i Markotić 2007). Moguće kako zbog ulaska virusa u stanice preko različitih receptora (integrin  $\alpha_V\beta_3$  za patogene i integrin  $\alpha_5\beta_1$  za apatogene HTV) dolazi do aktivacije različitih unutarstaničnih signalnih puteva (Cebalo i Markotić 2007).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Stanice

- Sva istraživanja su napravljena na primarnim stanicama ljudskih monocita u uvjetima *in vitro*. Kao izvor primarnih ljudskih monocita korišteni su uzorci periferne krvi dobrovoljnih darivatelja krvi prikupljeni u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM), Zagreb. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Klasa: 641-01/16-02/01, Ur. broj: 380-59-10106-16-20/27, od 19.1.2016. godine), Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (Ur. broj: 01-152-2-2016, od 4.2.2016. godine) te Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (Klasa: 003/06-15-04/12, Ur. broj: 251-541-06/6-16-2, od 1.3.2016. godine). U istraživanje je bilo uključeno ukupno 15 darivatelja. Eksperimentalni dio istraživanja izrađen u Odjelu za znanstvena istraživanja Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb.
- Za uzgoj virusa korištene su Vero E6 stanice, epitelne stanice bubrega afričkog zelenog majmuna *Chlorocebus aethiops* (Linnaeus, 1758.), klon E6, ATCC broj: CRL-1586 (ATCC, Manassas, Virginia, SAD)

##### 3.1.2. Virusni sojevi

- *Puumala orthohantavirus*, soj CG1820; kôd virusa u bazi podataka ICTV: 00.011.0.02.015.; vlastiti uzgoj
- *Tula orthohantavirus*, soj 00.011.0.02.023.01.001. Moravia/Ma5302V; kôd virusa u bazi podataka ICTV: 00.011.0.02.023.; vlastiti uzgoj

##### 3.1.3. Mediji i dodaci medijima

- Medij RPMI sa stabilnim glutaminom (Roswell Park Memorial Institute 1640 w stable-glutamin + 25mM HEPES + NaHCO<sub>3</sub>; PAN-Biotech, Aidenbach, Njemačka)
- Medij RPMI-HS0,5%: sadržavao medij RPMI sa stabilnim glutaminom s dodatkom 0,5 % humanog seruma (HS), 100 IU/ml penicilina i 100 µg/ml streptomcina
- Medij EMEM s L-glutaminom (Minimum Essential Medium Eagle with Earle's balanced salt solution and L-Glutamine; Lonza, Basel, Švicarska)



- Medij EMEM-FBS2%: sadržavao medij EMEM s L-glutaminom s dodatkom 2% toplinski inaktiviranog FBS-a, 100 IU/ml penicilina i 100 ug/ml streptomicina
- Medij EMEM-FBS10%: sadržavao medij EMEM s L-glutaminom s dodatkom 10% toplinski inaktiviranog FBS-a, 100 IU/ml penicilina i 100 ug/ml streptomicina
- Antibiotik Penicilin-streptomycin, 100x (Lonza, Basel, Švicarska), sadrži: 10,000 jedinica kalij penicilina i 10,000 µg streptomycin sulfata po mililitru (ml) u 0,85% fiziološkoj otopini
- Serum goveđeg fetusa, inaktiviran toplinom (FBS, od engl. *fetal bovine serum*, za EU odobrene regije; Gibco LifeTechnologies, Carlsbad, California, SAD)
- Ljudski AB+ serum, inaktiviran (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska)
- Ljudski rekombinantni protein GM-CSF (rh GM-CSF; ImmunoTools, Friesoythe, Njemačka)
- Ljudski rekombinantni protein IL-4 (rh IL-4; ImmunoTools, Friesoythe, Njemačka)
- Ljudski rekombinantni protein IFN- $\gamma$  (rh IFN- $\gamma$ ; ImmunoTools, Friesoythe, Njemačka)
- Ljudski rekombinantni protein M-CSF (rh M-CSF; ImmunoTools, Friesoythe, Njemačka)
- Ljudski rekombinantni protein IL-10 (rh IL-10; ImmunoTools, Friesoythe, Njemačka)
- Tripsin s 0,25% tripsina i 0,02% EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD)
- Otopina akutaze (Accutase, Innovative Cell Technologies, San Diego, California, SAD)

#### 3.1.4. Osnovne kemikalije

- Kloroform (CHCl<sub>3</sub>) (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Izopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) (Kemig, Sesvete-Soblinec, Hrvatska)
- Metanol (CH<sub>4</sub>O) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (NaOH), zrnca 2 – 5 mm (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (HCl), minimalno 36,5% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Borax (di-Sodium tetraborate decahydrate, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- HEPES pufer, 1M (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Voda za injekcije (Aqua pro injectione; Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska)
- DEMI voda (demineralizirana voda)
- Voda bez RNAza i DNAza (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)

- Dinatrij EDTA (di sodium ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- 4',6'-diaminidin-2'-fenilindol dihidroklorid (DAPI, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)

### 3.1.5. Otopine i puferi

- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, 75%, 80%, 100%) (Claro-prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hipoklorit, otopina s minimalno 4% aktivnog klora (Claro-prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Formaldehid, 4% (v/v) puferirana otopina (Claro-prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Paraformaldehid, 20% (v/v) puferirana vodena otopina (EM grade; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvanija, SAD)
- SBA pufer, 20x, sadrži: 20 g Borax u 1 l demineralizirane vode
- Fosfatni pufer bez Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> iona, 1x (PBS, od engl. *Phosphate Buffered Saline*)(Lonza, Basel, Švicarska)
- Otopina fikola (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare, Uppsala, Švedska)
- Permeabilizacijska otopina PBS-TritonX: sadržava pufer PBS s 0,3% Triton X-100
- Otopina za ispiranje PBS-Tween: sadržava pufer PBS s 0,1% Tween 20
- Otopina za blokiranje nespecifičnog vezanja PBS-Tween-HS5%: sadržava pufer PBS s 0,1% Tween 20 i 5% HS
- Otopina za inkubaciju PBS-Tween-HS2%: sadržava pufer PBS s 0,1% Tween 20 i 2% HS
- Otopina fenola i gvanidin tiocijanata za izolaciju nukleinskih kiselina i proteina (TriPure Isolation Reagent; Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka)
- Otopina za imunofenotipizaciju PBS-FBS2%: sadržava pufer PBS s dodatkom 2% toplinski inaktiviranog FBS-a
- Otopina za fiksaciju PBS-FBS2%-PFA2%: sadržava pufer PBS s dodatkom 2% toplinski inaktiviranog FBS-a i 2% paraformaldehida
- Otopina za istovremenu lizu eritrocita i fiksiranje stanica za pripremu uzoraka ljudske krvi za analizu protočnom citometru, 10x (BD FACSLysing Solution, BD, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, SAD)
- Tripansko modriilo, 0,4% otopina u 0,85% NaCl (Lonza, Basel, Švicarska)

- Boja za vijabilnost stanica u protočnoj citometriji (LIVE/DEAD Fixable Near InfraRed (IR) Dead Cell Stain Kit, Affymetrix, San Diego, California, SAD); sadrži: komponenta A (boja) i komponenta B (DMSO); 0,1 µl/test
- RNA ScreenTape Sample Buffer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD)
- Dezinficijensi, 3% radne otopine (Oxygenon S, Antiseptica, Pulheim, Njemačka; Incidin Active, Ecolab, Saint Paul, Minnesota, SAD)

### 3.1.6. Reagensi i kompleti

- Komplet za separaciju ukupnih monocita (Pan Monocyte isolation kit; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Njemačka); sadrži: FcR Blocking Reagent, Biotin-Antibody Cocktail; Anti-Biotin MicroBeads
- Komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit (Qiagen, Germantown, Maryland, SAD); sadrži: QIAamp MinElute spin kolonice; Qiagen proteazu, carrier RNA, epruvete za skupljanje tekućine; AL pufer; AW1 pufer; AW2 pufer; AVE pufer
- Komplet QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germantown, Maryland, SAD); sadrži: QIAamp Mini spin kolonice; Qiagen proteazu, epruvete za skupljanje tekućine; AL pufer; AW1 pufer; AW2 pufer; AE pufer
- Mješavina dNTP (Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs); Promega, Madison, Wisconsin, SAD), dATP, dCTP, dGTP i dTTP od 100mM u vodi, pH 7,5
- Inhibitor RNaze (Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor; Promega, Madison, Wisconsin, SAD), 40 U/µl
- Reverzna transkriptaza M-MLV (Promega, Madison, Wisconsin, SAD); sadrži: M-MLV reverzna transkriptaza, 200 U/µl; 5x M-MLV reakcijski pufer
- Komplet RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen Sciences, Germantown, Maryland, SAD,); sadrži: pufer GE, 5x pufer BC3, smjesa s reverznom transkriptazom RE3, kontrola P2, voda bez RNAza i DNAza
- Komplet RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen Sciences, Maryland, Germantown, SAD,); sadrži: 24 x 1,35 ml epruvete za 24 x 96-well RT<sup>2</sup> PCR Arrays
- Komplet RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (format C) s genima po želji (Qiagen Sciences, Germantown, Maryland, SAD); sadrži: 24 x 96-well RT<sup>2</sup> PCR Arrays s 24 odabrana gena (*CD68*, *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *IL1RN*, *CD40LG*, *CXCL10*, *CXCL8*, *CCL4*, *IL27*, *IL37*, *CCR2*, *CCR5*, *CXCR4*, *CCL13*, *STAT1*, *STAT3*, *MRC1*, *IFITM3*, *PPIA*, *TBP*, *OAZ1*, *HGDC*, *PPC*)

- Polimeraza Taq (Hot Start Pol, Jena Bioscience, Jena, Njemačka); sadrži: HotStart Taq polimeraza, 5 U/μl; 10x potpuni reakcijski pufer; 10x reakcijski pufer bez MgCl<sub>2</sub>; MgCl<sub>2</sub> otopina, 25 mM
- 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonija)
- Agarozna (SeaKem LE Agarose, Lonza, Basel, Švicarska)
- Boja za vizualizaciju DNA/RNA u agaroznom gelu (Roti-GelStain; Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka; SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, California, SAD)
- Boja za nanošenje na gel (DNA Gel Loading Dye (6x), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- DNA marker (GeneRuler DNA Ladder Mix; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); sadrži: DNA marker veličine fragmenata 100 do 10000 nukleotida, 0,5 μg/μl, 6x DNA Loading Dye
- Pojačivač signala Image-iT FX signal enhancer (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, SAD); sadrži 1x otopinu u PBS-u (pH 7,2) s 2 mM natrijevog azida kao konzervansa
- Osnovni komplet za imunološke testove pomoću magnetskih kuglica (ProcartaPlex Human Basic Kit, Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: streptavidin-PE (SA-PE); koncentrat pufera za ispiranje, 10x; pufer za razrjeđivanje detekcijskog protutijela; univerzalni pufer za analizu; pufer za očitavanje; epruvete za PCR u stripu; mikrotitarska pločica s 96 udubina ravnog dna; crni poklopac za mikrotitarsku pločicu; samoljepive pokrovne folije za mikrotitarsku pločicu
- Komplet CD40L (Soluble) Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za CD40L; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za CD40L; liofilizirani standard za CD40L
- Komplet IL-8 Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za IL-8; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IL-8; liofilizirani standard za IL-8
- Komplet IL-1RA Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih

monoklonskim protutijelom za IL-1RA; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IL-1RA; liofilizirani standard za IL-1RA

- Komplet IL-17F Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za IL-17F; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IL-17F; liofilizirani standard za IL-17F
- Komplet IL-27 Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija, katalogski broj); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za IL-27; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IL-27; liofilizirani standard za IL-27
- Komplet IL-37 Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za IL-37; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IL-37; liofilizirani standard za IL-37
- Komplet IP-10 Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za IP-10; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IP-10; liofilizirani standard za IP-10
- Komplet MIF Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za MIF; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv poliklonskog protutijela za MIF; liofilizirani standard za MIF
- Komplet MCP-1 Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za MCP-1; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za MCP-1; liofilizirani standard za MCP-1
- Komplet M-CSF Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za M-CSF; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za M-CSF; liofilizirani standard za M-CSF
- Komplet MDC Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih

monoklonskim protutijelom za MDC; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za MDC; liofilizirani standard za MDC

- Komplet MIP-1A (alfa) Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za MIP-1A; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za MIP-1A; liofilizirani standard za MIP-1A
- Komplet MIP-1B (beta) Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za MIP-1B; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za MIP-1B; liofilizirani standard za MIP-1B
- Komplet RANTES Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za CCL5; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za CCL5; liofilizirani standard za CCL5; 10x koncentrat univerzalnog pufera za analizu
- Komplet TGF beta-1 Human ProcartaPlex Simplex Kit (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za TGF beta-1; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za TGF beta-1; liofilizirani standard za TGF beta-1
- Osnovni komplet za imunološke testove visoke osjetljivosti pomoću magnetskih kuglica (ProcartaPlex Human High Sensitivity Basic Kit, Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: streptavidin-PE (SA-PE); amplifikacijski reagens 1; amplifikacijski reagens 2; koncentrat pufera za ispiranje, 10x; pufer za razrjeđivanje detekcijskog protutijela; univerzalni pufer za analizu; pufer za očitavanje; epruvete PCR u stripu; mikrotitarska pločica s 96 udubina ravnog dna; crni poklopac za mikrotitarsku pločicu; samoljepive pokrovne folije za mikrotitarsku pločicu
- Komplet GM-CSF Human ProcartaPlex Simplex Kit, high sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za GM-CSF; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za GM-CSF; liofilizirani standard za GM-CSF
- Komplet IFN gamma Human ProcartaPlex Simplex Kit, high sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica

obilježenih monoklonskim protutijelom za IFN gamma; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IFN gamma; liofilizirani standard za IFN gamma

- Komplet IL-1 beta Human ProcartaPlex Simplex Kit, high sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za IL-1 beta; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IL-1 beta; liofilizirani standard za IL-1 beta
- Komplet IL-6 Human ProcartaPlex Simplex Kit, high sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za IL-6; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IL-6; liofilizirani standard za IL-6
- Komplet IL-10 Human ProcartaPlex Simplex Kit, high sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za IL-10; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za IL-10; liofilizirani standard za IL-10
- Komplet TNF alpha Human ProcartaPlex Simplex Kit, high sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems, Beč, Austrija); sadrži: 50x koncentrat magnetskih kuglica obilježenih monoklonskim protutijelom za TNF alfa; 50x koncentrat biotinom obilježenog konjugata protiv monoklonskog protutijela za TNF alfa; liofilizirani standard za TNF alfa
- BD FACS Lysing Solution, 100 ml (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, New Jersey, SAD)
- RNA ScreenTape System (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD); sadrži: 7x gel kazeta
- RNA ScreenTape Ladder (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD); sadrži: 1x marker
- Flow-Check Pro Fluorospheres (Beckman Coulter, O'Callaghan's Mills, Irska)
- Flow-Set Pro Fluorospheres (Beckman Coulter, O'Callaghan's Mills, Irska)
- Kuglice za kompenzaciju na protočnom citometru (VersaComp Antibody Capture Bead Kit, Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, Francuska); sadrži: negativne kuglice koje ne vežu fluorokromom-konjugirana protutijela; pozitivne kuglice presvučene IgG-vezujućim agensom koje će vezati sve mišje i štakorske izotipove protutijela

### 3.1.7. Protutijela

- Mišje monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein CD14 obilježeno fluorokromom fluorescein izotiocijanatom (FITC), izotip IgG2a,  $\kappa$ , klon M5E2 (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, New Jersey, SAD)
- Mišje monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein CD16 obilježeno fluorokromom Alexa Fluor 700, izotip IgG1,  $\kappa$ , klon eBio CB16 (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Affymetrix, San Diego, California, SAD)
- Mišje monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein CD16 obilježeno fluorokromom fikoeritrinom (PE), izotip mišji IgG1,  $\kappa$ , klon 3G8 (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, New Jersey, SAD)
- Mišje monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein CD40 obilježeno fluorokromom peridinin klorofil protein s eFluor 710 (PerCP-eFluor 710), izotip IgG1,  $\kappa$ , klon 5C3 (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Affymetrix, San Diego, California, SAD)
- Mišje monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein CD45 obilježeno fluorokromom PE-cijanin 7 (PC7), izotip IgG1,  $\kappa$ , klon J33 (Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, Francuska)
- Mišje monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein CD163 obilježeno fluorokromom Alexa Fluor 647, izotip IgG1,  $\kappa$ , klon RM3/1 (Biolegend, San Diego, California, SAD)
- Mišje monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein CD206 obilježeno fluorokromom eFluor 450, izotip IgG1,  $\kappa$ , klon 19.2 (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Affymetrix, San Diego, California, SAD)
- Štakorsko monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein CD209 (DC-SIGN) obilježeno fluorokromom PE, izotip IgG2a,  $\kappa$ , klon eB-h209 (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Affymetrix, San Diego, California, SAD)
- Mišje monoklonsko protutijelo specifično za ljudski protein HLA-DR obilježeno fluorokromom Krome Orange, izotip IgG1, klon Imm-357 (Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, Francuska)
- Zečje neobilježeno poliklonsko protutijelo specifično za nukleokapsidni protein PUUV, izotip IgG (Reagens je dobiven putem BEI Resources, NIAID, NIH, SAD)



- Kozje poliklonsko protutijelo od F (ab')<sub>2</sub> fragmenata specifično za zečji IgG (H+L, od engl. *Heavy and Light chains*) obilježeno fluorokromom Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, SAD)

### 3.1.8. Početnice

Nasumične početnice (Promega, Madison, Wisconsin, SAD), 500 µg/ml

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzgoj virusnih štokova

Za uzgoj ortohantavirusa korišten je vlastiti uzgoj stanične linije Vero E6. Stanice su uzgojene u mediju EMEM-FBS10% pri 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub>. Konfluentni sloj stanica Vero E6 inokuliran je s virusom PUUV (soj CG1820) ili TULV (soj Moravia/Ma5302V) te su tijekom 10 dana propagirani u mediju EMEM-FBS2% na 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub> u inkubatoru HERAcell 150i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon 10 dana supernatanti u kojem se nalaze virusi su prikupljeni, alikvotirani te prije pohranjivanja pri -80°C testirani na prisutnost mikoplazmi testom PCR. Za eksperimente infekcije monocita korištene su virusne matične otopine bez dokazane kontaminacije mikoplazmama.

### 3.2.2. Prikupljanje uzoraka

U istraživanje su uključeni samo muški dobrovoljni darivatelji krvi radi smanjenja utjecaja ženskih hormona na istraživanje. Starost darivatelja krvi bila je između 25 i 50 godina kako bi odgovarali dobi HVBS bolesnika. Svi dobrovoljni darivatelji krvi su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. U istraživanje je uključeno ukupno 15 darivatelja, šest za mjerenje solubilnih čimbenika i gensku ekspresiju, dva za titraciju i optimizaciju protutijela te sedam za imunofenotipizaciju površinskih molekula.

Svakom dobrovoljnom darivatelju krvi se, između 7:30 i 9:00 sati ujutro, aseptičkom venepunkcijom iz antekubitalne vene uzelo 450 ml krvi te odvojilo u sustav plastičnih vrećica s antikoagulansom CPD (od engl. *citrate phosphate dextrose*).

### 3.2.3. Izolacija primarnih monocita

#### 3.2.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi na gradijentu gustoće

Izolaciji mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC, od engl. *peripheral blood mononuclear cells*) pristupilo se unutar 2 sata od uzimanja krvi dobrovoljnom darivatelju. Dobivena doza pune krvi sadržavala je cca 450 ml krvi s CPD antikoagulansom i obrađivana je unutar mikrobiološkog zaštitnog uređaja klase 2 (MZU), model KTB-NS-II (Klimaoprema d.d., Samobor, Hrvatska). Svi postupci bili su napravljeni u aseptičkim uvjetima. Prije započinjanja postupka izolacije uzet je alikvot od 1 ml krvi za određivanje kompletne krvne slike zbog procjene općeg zdravstvenog stanja darivatelja i otkrivanja eventualnih patoloških promjena koje ukazuju na prisutnost npr. akutne ili kronične infekcije, leukemije itd. Kompletna krvna slika analizirana je na hemocitometru (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, SAD) u Odjel za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. U daljnji postupak obrade ušli su samo uzorci krvi darivatelja koji su imali uredan nalaz diferencijalne krvne slike.

Iz pune krvi su metodom razdvajanja na gradijentu gustoće pomoću otopine fikola (Ficoll-Paque PLUS) izolirani PBMC-ovi. Puna krv je razrijeđena u omjeru 1:1 PBS-om. Razrijeđena krv je zatim polako naslojena na otopinu fikola u omjeru 3:1 te centrifugirana u stolnoj centrifugi s hlađenjem 5810 R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) pri  $400 \times g$  tijekom 30 minuta (min), pri sobnoj temperaturi, bez zaustavljanja uz pomoć kočnice. Krv se razdvojila u četiri sloja (od dna – sloj eritrocita i granulocita; sloj fikola; sloj PBMC-ova; sloj plazme s trombocitima i puferom PBS). Tanki sloj (prsten) PBMC-ova prisutnih iznad otopine fikola je pažljivo izvučen paster pipetom u novu epruvetu. Stanice su potom isprane u velikom volumenu PBS-a pri  $300 \times g$  tijekom 10 min. Talog stanica je resuspendiran te ispran još dva puta u velikom volumenu PBS-a na maloj brzini od  $200 \times g$  tijekom 10 min kako bi se dodatno uklonili zaostali trombociti. Talog PBMC-ova je resuspendiran u malo medija RPMI te spojen u jednu epruvetu u ukupno 45 ml medija RPMI. Iz alikvota otopine PBMC-ova utvrđen je broj i vijabilnost izoliranih stanica pomoću tripanskog modrila u komorici za brojanje stanica „Neubauer improved“ (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Njemačka) koristeći svjetlosni mikroskop CKX31 (Olympus, Tokio, Japan). Nakon utvrđenog ukupnog broja PBMC-ova uzet je alikvot s  $5 \times 10^5$  stanica za provjeru udjela CD16<sup>+</sup> monocita protočnom citometrijom, prema postupku pripreme uzoraka za imunofenotipizaciju koristeći protutijela CD14-FITC, CD16-PE i CD45-PC7. Samo darivatelji koji su imali udio CD16<sup>+</sup> proinflammatoryh monocita u ukupnim PBMC-ovima <13% odabrani su za istraživanje.

Preostale krvne stanice nastale kao nusprodukt izolacijskih postupaka nisu bile obuhvaćene istraživanjem i nisu bile korištene u druge svrhe. Te stanice su bile odmah uništene sukladno propisima o postupanju s potencijalno infektivnim medicinskim materijalom.

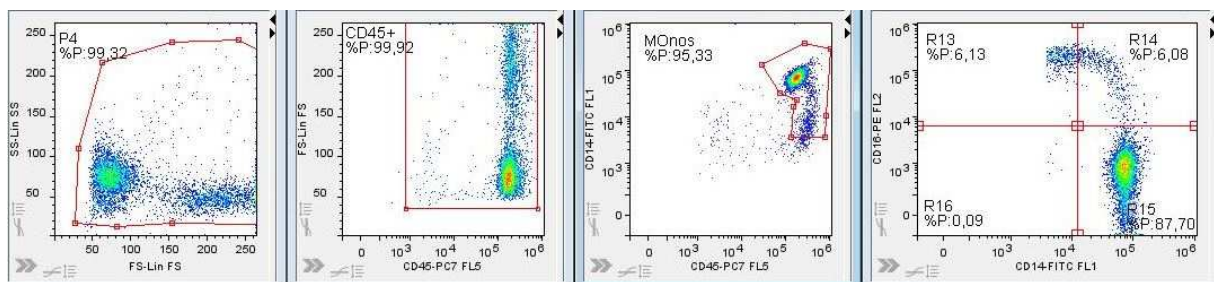
### **3.2.3.2. Magnetska separacija monocita iz mononuklearnih stanica periferne krvi**

Separaciji intaktnih ukupnih monocita iz stanica PBMC pristupilo se metodom negativne selekcije pomoću magnetske separacije koristeći komplet reagencija za izolaciju ukupnih monocita uz pripadajuće kolonice LS. Komplet reagencija za izolaciju ukupnih monocita omogućava istovremenu izolaciju sve tri subpopulacije monocita, klasične (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedijarne (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) i neklasične (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) monocite. Ukratko, pripremljen je pufer MACS (MACS, od engl. *magnetic-activated cell sorting*) koji je sadržavao PBS s 1% FBS-a i 2 mM EDTA (pH 7,2). Cijelo vrijeme postupka reagencije i stanice su držane na hladnom. Stanična suspenzija je propuštena kroz predseparacijski filter od 30 µm kako bi se uklonili agregati stanica. Stanična suspenzija je centrifugirana na 300 × g tijekom 10 min. Potpuno je uklonjen supernatant nakon čega je na stanični talog dodana adekvatna količina reagensa prilagođena ukupnom broju PBMC-ova. Za 1 × 10<sup>7</sup> stanica potrebno je redom 30 µl pufera MACS, 10 µl reagensa za blokiranje Fc receptora (radi spriječavanja neželjenog vezanja protutijela na stanice) i 10 µl koktela protutijela obilježenih biotinom (sadrži protutijela protiv antigena koji nisu izraženi na ljudskim monocitima). Dobro je promiješano (pipetiranjem) i inkubirano tijekom pet minuta u hladnjaku (2 – 8°C). U drugom koraku potrebno je dodati 30 µl pufera MACS i 20 µl magnetskih mikrokuglica usmjerenih protiv biotina. Dobro je promiješano (pipetiranjem) i inkubirano tijekom 10 minuta u hladnjaku (2 – 8 °C). Za magnetsku separaciju korišteni su snažni trajni magneti MidiMACS Separator ili QuadroMACS Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Njemačka) s umetnutom kolonicom LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Njemačka). Stanična suspenzija nanosena je na kolonicu LS te je željena neobilježena monocitna frakcija prikupljena u sterilnu epruvetu. Potom je kolonica isprana s ukupno 9 ml pufera MACS (3 × 3 ml) te također prikupljena u istu epruvetu. Maksimalan kapacitet pojedine kolonice LS je 10<sup>8</sup> obilježenih stanica te je postupak ponovljen s potrebnim brojem kolonica ovisno o ukupnom ulaznom broju PBMC-ova. Stanice su centrifugirane na 300 × g tijekom 10 min. Supernatant je odstranjen, a sve monocitne frakcije su potom objedinjene u jednu epruvetu i resuspendirane u ukupno 20 ml medija RPMI.

### 3.2.3.3. Određivanje čistoće izoliranih monocita

Iz alikvota monocitne frakcije utvrđen je broj stanica te vijabilnost pomoću tripanskog modrila u komorici za brojanje stanica „Neubauer improved“. Iz čiste monocitne frakcije uzet je alikvot s  $5 \times 10^5$  stanica za ponovnu provjeru udjela CD16<sup>+</sup> monocita protočnom citometrijom, prema postupku pripreme uzoraka za imunofenotipizaciju koristeći protutijela CD14-FITC, CD16-PE i CD45-PC7. Uzorci za provjeru udjela CD16<sup>+</sup> monocita protočnom citometrijom propuštani su na protočnom citometru Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, SAD) te su podaci prikupljeni koristeći program CXP software (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, SAD), u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“.

Eksperiment infekcije monocita ortohantavirusima postavljen je samo ukoliko su izolirani monociti sadržavali >95% monocita te <13% proinflamatornih CD16<sup>+</sup> monocita (Slika 8).



Slika 8. Prikaz strategije izdvajanja populacija za provjeru čistoće izoliranih monocita.

### 3.2.4. Infekcija monocita ortohantavirusima i uspostava dugotrajne kultivacije primarne kulture monocita

Infekcija monocita ortohantavirusima provedena je u laboratoriju 3. stupnja biosigurnosti (BSL-3, od engl. *biosafety level 3 laboratory*) unutar MZU u Odjelu za znanstvena istraživanja Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Ukupan broj monocita razdijeljen je u tri 50 ml samostojeće epruvete za infekciju s virusom PUUV ili TULV te za neinficirane stanice. Ukratko, stanice su centrifugirane u stolnoj centrifugi s hlađenjem 5810 R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na  $300 \times g$  tijekom 10 min. Na stanični talog dodana je virusna suspenzija u višestrukosti infekcije od 0,1 (MOI = 0,1, od engl. *multiplicity of infection*). Kao kontrola koristile su se neinficirane stanice u istim uvjetima kultivacije gdje je umjesto volumena virusne suspenzije dodan isti volumen medija EMEM-FBS2%. U suspenziju stanica i virusa dodan je pufer HEPES u finalnoj koncentraciji 25 mM, zbog

održavanja stabilnog pH tijekom inkubacije. Stanice su inkubirane s virusom pri 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub> tijekom jednog sata uz povremeno treskanje svakih 15 min tijekom pet sekundi (s). U idućem koraku stanice su centrifugirane na 300 × g tijekom 10 min te je zatim virus uklonjen sa stanica. Stanice su isprane u 13 ml čistog medija RPMI, uz centrifugiranje na 300 × g tijekom 10 min. Na talog stanica dodana je potrebna količina medija RPMI-HS0,5% kako bi se postigla željena koncentracija stanica ovisno o daljnjem postupku kultivacije. U svrhu analize genske ekspresije i proteomske analize monociti su kultivirani u netretiranim pločicama za uzgoj stanica s 24 jažice (Starlab, Hamburg, Njemačka) u koncentraciji  $9 \times 10^5$  stanica/jažici u jednom ml kompletnog medija u peteroplikatu. Stanice su inkubirane na 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub> u inkubatoru HERAcell 150i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) tijekom sedam dana, a uzorci su prikupljeni u šest vremenskih točaka nakon infekcije (1 sat, 6 sati, 24 sata, 48 sati, 5 dana, 7 dana). Nadalje, za imunofenotipizaciju stanica protočnom citometrijom monociti su kultivirani u pločicama za uzgoj stanica u suspenziji s Lumox folijom (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) u koncentraciji  $45 \times 10^5$  stanica/pločici u 2,5 ml medija RPMI-HS0,5%. Stanice su pod istim uvjetima inkubirane tijekom sedam dana, a uzorci su prikupljeni u tri vremenske točke (1 sat, 48 sati, 7 dana). Treći dan kultivacije u medij sa stanicama dodano je 0,5% HS po jažici kako bi se oplemenio hranjivi medij. Za određivanje površinskih markera istovremeno su od istog donora pripremljene pozitivne kontrole diferencijacijom monocita u MDM i MDCC. Za diferencijaciju u MDM monociti su u koncentraciji od  $1,5 \times 10^5$  po cm<sup>2</sup> uzgajani sedam dana u mediju RPMI-HS0,5% uz dodatak 50 ng/ml M-CSF-a na 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub> (uz promjenu medija 3. dan kultivacije) te su potom tijekom slijedeća dva dana polarizirani u M1 MDM dodatkom 20 ng/ml IFN- $\gamma$ , M2 MDM dodatkom 20 ng/ml IL-4 i M2c MDM dodatkom 20 ng/ml IL-10. Za diferencijaciju u MDCC monociti su u koncentraciji od  $1,5 \times 10^5$  po cm<sup>2</sup> uzgajani sedam dana u mediju RPMI-HS0,5% uz dodatak 50 ng/ml GM-CSF-a i 50 ng/ml IL-4 na 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub> (uz promjenu medija 3. dan kultivacije).

### **3.2.5. Indirektna imunofluorescencija za praćenje uspješnosti infekcije**

Uspješnost infekcije oba virusa potvrđena je koristeći specifično poliklonsko protutijelo protiv proteina N virusa PUUV (koje je također unakrsno reaktivno na protein N virusa TULV) metodom indirektna imunofluorescencije (IIFT) na invertnom fluorescentnom mikroskopu IX51 (Olympus, Tokio, Japan) koristeći digitalnu CMOS monokromatsku

kameru ORCA-spark (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) u programu cellSens (Olympus, Tokio, Japan).

Na stanice je drugi i sedmi dan nakon infekcije nakon uklanjanja supernatanta dodan 4% formaldehid kako bi se fiksiralo stanice i neutralizirao virus te su pločice ostavljene preko noći na sobnoj temperaturi i sljedećeg dana iznesene iz BSL-3 laboratorija. Formaldehid je nakon toga odstranjen i dodan je PBS te su pločice do analize pohranjene na 4 °C. Stanice su permeabilizirane u 200 µl permeabilizacijske otopine PBS-TritonX i inkubirane tijekom 20 min na horizontalnoj orbitalnoj tresilici za mikrotitarske pločice, RS-OS 20 (Phoenix Inturment, Garbsen, Njemačka) na sobnoj temperaturi (RT, od engl. *room temperature*). Odstranivši permeabilizacijsku otopinu stanice su potom tri puta isprane s po 500 µl pufera za ispiranje PBS-Tween te inkubirane tijekom 5 min na horizontalnoj orbitalnoj tresilici na RT. Na stanice je dodano po 150 µl pojačivača signala Image-iT FX signal enhancer (koji blokira pozadinsko obojanje od nespecifičnih interakcija fluorescentnih boja sa staničnim komponentama) te inkubirano tijekom 30 min na RT u vlažnoj atmosferi. Odstranivši pojačivač signala opisanim postupkom ispiranja, stanice su blokirane u 500 µl otopine za blokiranje nespecifičnog vezanja PBS-Tween-HS5% te inkubirane 2 sata na horizontalnoj orbitalnoj tresilici na RT. Potom je odstranjena otopina za blokiranje nespecifičnog vezanja, isprana opisanim postupkom ispiranja te je dodano po 200 µl primarnog protutijela (poliklonsko zečje anti-PUUV-N IgG protutijelo) pripremljeno u otopini za inkubaciju PBS-Tween-HS2% u razrjeđenju 1:1000 te su pločice inkubirane tijekom 90 min na horizontalnoj orbitalnoj tresilici na RT. Pločice su potom tri puta isprane postupkom ispiranja uz dulju inkubaciju od 10 min na horizontalnoj orbitalnoj tresilici na RT. Na stanice je potom dodano po 200 µl sekundarnog kozjeg poliklonskog protutijela od F (ab')<sub>2</sub> fragmenata protiv zečjih IgG obilježenog fluorokromom Alexa Fluor 594, pripremljenog u PBS-Tween-HS2% u koncentraciji 4 µg/ml te inkubirano tijekom 45 min na horizontalnoj orbitalnoj tresilici na RT, zaštićeno od svjetlosti. Uslijedila su tri koraka ispiranja pločice s duljom inkubacijom. Na stanice je potom dodano po 100 µl otopine DAPI u PBS-u u razrjeđenju 1:2000 te inkubirano tijekom 5 min na horizontalnoj orbitalnoj tresilici na RT, zaštićeno od svjetlosti. Posljednje trostruko ispiranje pločice napravljeno je s 400 µl PBS-a po jažici uz inkubaciju od 10 min na horizontalnoj orbitalnoj tresilici i RT, zaštićeno od svjetlosti. Na kraju je u pločice dodano po 400 µl PBS-a te je signal fluorescencije analiziran na fluorescentnom mikroskopu i dokumentiran digitalnom kamerom. Sekundarno kozje poliklonsko protutijelo od F (ab')<sub>2</sub> fragmenata protiv zečjih IgG obilježeno fluorokromom Alexa Fluor 594 ima ekscitacijski maksimum na 594 nm te emisijski maksimum na 620 nm, u crvenom dijelu vidljivog spektra.

Boja DAPI ima ekscitacijski maksimum na 350 nm te emisijski maksimum na 470 nm, u plavom dijelu vidljivog spektra. Jačina signala i uzorak fluorescencije analizirani su u programu cellSens, dok je analiza fotografija napravljena u programu ImageJ verzija 1.53k.

### **3.2.6. Praćenje kinetike infekcije monocita i određivanje razine ortohantavirusne RNA**

#### **3.2.6.1. Izolacija ukupne RNA iz supernatanta i stanica**

Iz 200  $\mu$ l inficiranog staničnog supernatanta izolirana je RNA pomoću kompleta QIAamp DSP Virus Spin Kit i stolne mikrocentrifuge s hlađenjem Mikro 200 R (Hettich Holding, Kirchleingern, Njemačka). Prvi korak, do dodavanja pufera za lizu, izvođen je u MZU u BSL-3 laboratoriju, a nakon toga je izolacija nastavljena u BSL-2 laboratoriju. Ukratko, 25  $\mu$ l enzima proteaze stavljeno je na dno epruvete od 1,5 ml te dodano 200  $\mu$ l uzorka i 200  $\mu$ l pufera AL (koji sadrži 5,6  $\mu$ g/ $\mu$ l nosača RNA). Sadržaj je pomiješan mućkanjem tijekom 15 s te inkubiran na 56°C tijekom 15 min. Dodano je 250  $\mu$ l apsolutnog etanola. Pomiješano je mućkanjem tijekom 15 s i inkubirano tijekom pet min na sobnoj temperaturi. Otopina je nanesa na QIAamp MinElute kolonicu bez diranja ruba kolonice. Centrifugirano je na 6000  $\times$  g tijekom dvije minute. Nakon centrifugiranja QIAamp MinElute kolonica je stavljena u čistu 2 ml epruvetu za prikupljanje filtrata. Na kolonicu je dodano 500  $\mu$ l pufera AW1 te centrifugirano na 6000  $\times$  g tijekom dvije minute. Nakon centrifugiranja QIAamp MinElute kolonica je stavljena u čistu 2 ml epruvetu za prikupljanje filtrata. Na kolonicu je dodano 500  $\mu$ l pufera AW2 te centrifugirano na punoj brzini (20 000  $\times$  g) tijekom tri minute. Nakon centrifugiranja QIAamp MinElute kolonica je stavljena u čistu 2 ml epruvetu za prikupljanje filtrata. Centrifugirana je na punoj brzini (20 000  $\times$  g) tijekom jedne minute. Nakon centrifugiranja QIAamp MinElute kolonica je stavljena u čistu 1,5 ml epruvetu te je na membranu kolonice dodano 20  $\mu$ l pufera AVE i inkubirano na sobnoj temperaturi tijekom pet minuta. RNA je eluirana centrifugiranjem na 20 000  $\times$  g tijekom dvije minute i pospremljena na -80°C do daljnje upotrebe. Izolacija RNA iz stanica je provedena po postupku opisanom u 3.2.7.2.

#### **3.2.6.2. Reverzna transkripcija**

Za prevođenje RNA u cDNA napravljena je reverzna transkripcija. cDNA je sintetizirana pomoću 500 ng/ $\mu$ l nasumičnih početnica i 1  $\mu$ g RNA u ukupnom volumenu smjese vezivanja od 10  $\mu$ l. Smjesa nasumičnih početnica i uzorka RNA je zagrijana na 70°C tijekom tri min pa na 37°C tijekom 10 min u uređaju ProFlex PCR System (Applied Biosystems by Life

Technologies, Singapur). Reakcijska smjesa ukupnog volumena od 20  $\mu$ l dalje je pripremljena dodavanjem 10 mM mješavine dNTP-ova, 40 U/ $\mu$ l inhibitora RNAze, 4  $\mu$ l 5x reakcijskog pufera te 200 U/ $\mu$ l reverzne transkriptaze M-MLV i odgovarajuće količine vode bez RNAza i DNAza u smjesu vezivanja. Reakcija se odvijala pod slijedećim temperaturnim uvjetima: 60 min pri 37°C i 5 min pri 95°C u uređaju ProFlex PCR System. Uzorak cDNA pospremljen je na -20°C do daljnje upotrebe.

### **3.2.6.3. Dizajn specifičnih početnica i standarada za virus PUUV i TULV**

Za detekciju ortohantavirusne RNA (virusa PUUV i TULV) metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, od engl. *quantitative real-time PCR*) pomoću interkalirajuće boje bilo je potrebno konstruirati specifične početnice te specifične sintetske standarde u obliku dvolančane molekule DNA za viruse PUUV i TULV za kvantifikaciju količine virusne RNA u reakciji (Tablica 1).

Koristeći program primer-BLAST (NCBI), služeći se pravilima oko dizajna i svojstava početnica (specifičnost za željenu regiju uzorka, duljina početnica, omjer G/C nukleotida, početak i kraj od 1 – 2 G/C nukleotida, temperatura taljenja 50 – 60°C, jedinstvenost, bez internih sekundarnih struktura) konstruirana su dva seta specifičnih početnica za virus PUUV i jedan set za virus TULV. Nakon komercijalne sinteze početnica (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka), optimizirana je koncentracija svake početnice i temperatura prijanjanja u reakciji. Za virus PUUV je odabran set početnica boljih svojstava nakon čega se pristupilo dizajnu specifičnog sintetskog standarda. Napravljen set početnica za virus TULV bio je odgovarajućih svojstava. Dizajn sintetskog standarda u obliku dvolančane molekule DNA, proveden je na isti način. Nakon komercijalne sinteze standarda (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka, standardu je utvrđen ukupan broj molekula te je razrijeđen na koncentraciju  $10^8$  molekula/ $\mu$ l. Napravljen je standardna krivulja u triplikatu s visokom točnošću od  $R=0,99$ .



**Tablica 1.** Konstruirane nukleotidne sekvence početnica i standarda korištenih za detekciju ortohantavirusne RNA.

Početnica / standard	Nukleotidni slijed (5'-3')	Pozicija u S segmentu	Veličina	Ref.
Pf PS-Cg501	5'-AGGAACACGGATCAGGTTCAAGG-3'	501-523	23 nt	novo
Pr PS-Cg604R	5'-TGGTGGACTGGGCAGTAGGC-3'	585-604	20 nt	novo
PUUV duplex DNA standard	5'-CAATGGCATCAGGAGACCAAAACACCT AGACTGTGTCAGCAGTGCCTGACTGACCC AGTCCACCATGAAAGCTGAAGAAC-3'	/	80 nt	novo
TS-Fin128F	5'-AAAAGACGGTGAAGCCGACCC-3'	128-149	22 nt	novo
TS-Fin200R	5'-GCTGACACAGCTGCCCCGTCTA-3'	180-200	21 nt	novo
TULV duplex DNA standard	5'-CTAAAAGACGGTGAAGCCGACCCGGATC GATGTCCTAGGACAGCGAGCACACGTACAGA GTAGACGGGCAGCTGTGTCAGCTC-3'	/	84 nt	novo

#### 3.2.6.4. Kvantitativni PCR (qPCR)

Detekcija ortohantavirusne RNA (PUUV i TULV) u supernatantu i stanicama provedena je metodom qPCR pomoću interkalirajuće boje koristeći prethodno konstruirane specifične početnice i specifične sintetske standarde u obliku dvolančane molekule DNA za viruse PUUV ili TULV.

Ukratko, za virus PUUV je postupak bio sljedeći: 0,018 µg RNA prevedene u cDNA kalup pomiješano je s 4 µl 5x reakcijske mješavine HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix, 250 nM uzvodne početnice Pf PS-Cg501, 250 nM nizvodne početnice Pr PS-Cg604R te odgovarajućom količinom vode bez RNAza i DNAza do ukupnog volumena od 20 µl. Reakcijska smjesa inkubirana je u uređaju StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) na sljedećim ciklusima: aktivacija na 95 °C tijekom 12 min; tijekom 40 ciklusa – denaturacija na 95 °C tijekom 15 s, prijanjanje početnica na 63 °C tijekom 20 s te elongacija na 72 °C tijekom 20 s; denaturacija na 95 °C tijekom 15 s. Uzorci su testirani u duplikatu.

Za virus TULV je postupak bio sljedeći: uzorak 1 µl cDNA kalupa pomiješan je s 4 µl 5x reakcijske mješavine HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix, 200 nM uzvodne početnice TS-Fin128F, 200 nM nizvodne početnice TS-Fin200R te odgovarajućom količinom vode bez RNAza i DNAza do ukupnog volumena od 20 µl. Reakcijska smjesa inkubirana je u uređaju StepOnePlus Real-Time PCR System na sljedećim ciklusima: u 1 ciklusu – aktivacija na 95

°C tijekom 12 min; tijekom 40 ciklusa – denaturacija na 95 °C tijekom 15 sek, prianjanje početnica na 64 °C tijekom 15 s te elongacija na 72 °C tijekom 20 s; denaturacija na 95 °C tijekom 15 s. Uzorci su testirani u duplikatu.

Za prikupljanje podataka i analizu rezultata korišten je program StepOne software, verzija 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD). Na temelju poznate količine unesenog uzorka u reakciju i standardne krivulje izračunat je broj molekula virusne RNA u reakciji odnosno u uzorku.

### **3.2.7. Određivanje relativne ekspresije gena urođenog imunskog odgovora**

#### **3.2.7.1. Prikupljanje stanica nakon infekcije za analizu genske ekspresije**

U šest vremenskih točaka nakon infekcije 1 sat, 6 sati, 24 sati, 48 sati, 5 dana, 7 dana) sakupljen je sav supernatant sa stanica, a adherirane stanice u jažicama svih plikata su lizirane s ukupno 1 ml reagensa TriPure Isolation Reagent. Dio stanica koji je plutao u staničnom supernatantu je nakon centrifugiranja na  $300 \times g$  tijekom 10 min također liziran i pridružen ostatku staničnog lizata, a preostali supernatant je alikvotiran. Supernatant te lizat stanica su pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljnje upotrebe.

#### **3.2.7.2. Izolacija ukupne RNA iz stanica**

Ukupna RNA iz stanica izolirana je prema modificiranom protokolu za izolaciju putem gvanidin tiocijanat-fenol-kloroforma. Uzorak lizata stanica u reagensu Tripure Isolation Reagent je otopljen i dodano je 200  $\mu\text{l}$  kloroforma, protreseno vorteksiranjem tijekom 15 s te inkubirano 15 min na sobnoj temperaturi. Smjesa je centrifugirana na  $12\ 000 \times g$  tijekom 15 min na  $4^{\circ}\text{C}$ . Uzorak se razdijelio u tri sloja. Gornji bezbojni vodeni sloj u kojem je RNA odvojen je u novu 1,5 ml epruvetu, dodano je 620  $\mu\text{l}$  izopropanola te nakon miješanja pažljivim izvrtanjem epruvete nekoliko puta inkubiran 10 min pri sobnoj temperaturi. U slijedećem koraku centrifugiranjem na  $12\ 000 \times g$  tijekom 30 min na  $4^{\circ}\text{C}$  precipitirana je RNA. Supernatant je odstranjen i RNA je isprana u 1 ml 75% etanola uz centrifugiranje na  $7\ 500 \times g$  tijekom 10 min na  $4^{\circ}\text{C}$ . Talog RNA sušen je na zraku tijekom 15 min kako bi se uklonio suvišak etanola. Talog RNA otopljen je u 20  $\mu\text{l}$  vode bez RNAza i DNAza i potom pohranjen na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljnje upotrebe.

### 3.2.7.3. Određivanje kvalitete RNA

Određivanje kvalitete RNA provedeno je koristeći reagens RNA ScreenTape System za uređaj TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD). Očitavanje uzoraka i prikupljanje podataka na uređaju TapeStation 2200 napravljeno je u Odjelu za translacijsku medicinu, Dječja Bolnica Srebrnjak, Zagreb.

Ukratko, 1  $\mu$ l RNA ili RNA markera pomiješano je s 5  $\mu$ l pufera. Nakon što su uzorci kratko vorteksirani, inkubirani su tri min pri 72°C te potom stavljeni na led tijekom 2 min. Uzorci RNA odnosno markera, naneseni su na gel kazetu i vrijednosti RIN<sup>e</sup>-a (RIN<sup>e</sup>, broj integriteta RNA, od engl. *RNA integrity number*) su očitane prema uputama proizvođača u programu 2200 TapeStation Controller Software (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD). Kvaliteta uzoraka je interpretirana u programu 2200 TapeStation Software (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD). Svi uzorci bili su visoke kvalitete RIN<sup>e</sup> = 9,1-10.

### 3.2.7.4. Uklanjanje genomske DNA i sinteza prvog lanca cDNA

Iz ukupne RNA pripremljena je cDNA reverznom transkripcijom koristeći komplet RT<sup>2</sup> First Strand Kit te je napravljena cDNA korištena kao kalup za qPCR. Prije postupka reverzne transkripcije bilo je potrebno ukloniti svu prisutnu genomsku DNA. U 1  $\mu$ g RNA dodano je 2  $\mu$ l pufera GE te odgovarajuća količina vode bez RNAza i DNAza do volumena od 10  $\mu$ l. Smjesa je inkubirana na 42°C tijekom 5 min te odmah stavljena na led tijekom 1 min. Potom je pripremljena reakcijska smjesa za prevođenje RNA u cDNA dodatkom 4  $\mu$ l 5x pufer BC3, 1  $\mu$ l kontrole P2, 2  $\mu$ l smjese s reverznom transkriptazom RE3, 3  $\mu$ l vode bez RNAza i DNAza. U svaku epruvetu tretiranog RNA uzorka dodano je 10  $\mu$ l reakcijske smjese do ukupnog volumena od 20  $\mu$ l. Reakcija reverzne transkripcije odijala se na 42 °C tijekom 15 min uz inaktivaciju na 95 °C tijekom 5 min u uređaju ProFlex PCR. Uzorak cDNA razrijeđen je s 35,5  $\mu$ l vode bez RNAza i DNAza te pospremljen na -20°C do daljnje upotrebe.

### 3.2.7.5. qPCR array

Za analizu genske ekspresije korišten je komplet RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (format C) s genima po želji uz komplet RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix. Komplet RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array s genima po želji sadržavao je 19 gena koji su uključeni u urođeni imunosni odgovor te pet kontrola: tri referentna gena (za normalizaciju dobivenih rezultata), jedna kontrola za genomsku DNA (za detekciju kontaminacije genomskom DNA) i jedna pozitivna kontrola PCR-a (za testiranje učinkovitosti PCR reakcije). Reakcijska smjesa sastojala se od: 675  $\mu$ l 2x

RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix, 624 µl vode bez RNAza i DNAza te 51 µl uzorka cDNA. U svaku jažicu PCR Array pločice stavljeno je po 25 µl reakcijske smjese. Uzorci su testirani u duplikatu. Pločica je centrifugirana na 1000 × g tijekom 1 min te postavljena u uređaj StepOnePlus Real-Time PCR System na sljedećim uvjetima: denaturacija na 95 °C tijekom 10 min; tijekom 40 ciklusa: denaturacija na 95 °C tijekom 15 s pa prijanjanje početnica i elongacija na 60 °C tijekom 1 min. Nakon toga pokrenut je program analize krivulje taljenja (engl. *dissociation (melting) curve analysis*) određen uređajem, radi provjere specifičnosti PCR produkata. Po završetku reakcija rezultati C<sub>q</sub> vrijednosti (C<sub>q</sub>, od engl. *quantification cycle*) (Bustin i ostali 2009) su obrađeni i analizirani u programu StepOne software, verzija 2.3 uz samostalno postavljanje praga (engl. *threshold*) identičnog na svim analiziranim pločicama.

### **3.2.8. Multiparametrijska imunofenotipizacija monocita/makrofaga pri određivanju ekspresije staničnih površinskih molekula**

#### **3.2.8.1. Sastavljanje višebojnog panela protutijela**

Sastavljen je vlastiti višebojni panel koji se sastojao od osam fluorokromom obilježenih mišjih ili štakorskih protutijela specifičnih za ljudske površinske molekule te jedne boje za određivanje vijabilnosti stanica. Kriteriji prema kojima su se odabirala protutijela obilježena određenim fluorokromom za višebojni panel uključivali su traženje najpogodnije kombinacije površinskih markera (s obzirom na njihovu učestalost na stanicama), dostupnost markera prema klonu i prema fluorokromu, vrsti fluorokroma ovisno o jačini fluorescencije te konfiguraciju protočnog citometra korištenog za analizu. Osmišljen devetobojni panel sastojao se od slijedećih monoklonskih protutijela CD14-FITC, CD16-AF700, CD40-PerCP-eF710, CD45-PC7, CD163-AF647, CD206-eF450, CD209-PE, HLA-DR-KO te boje za vijabilnost Live/Dead Near IR (Tablica 2).

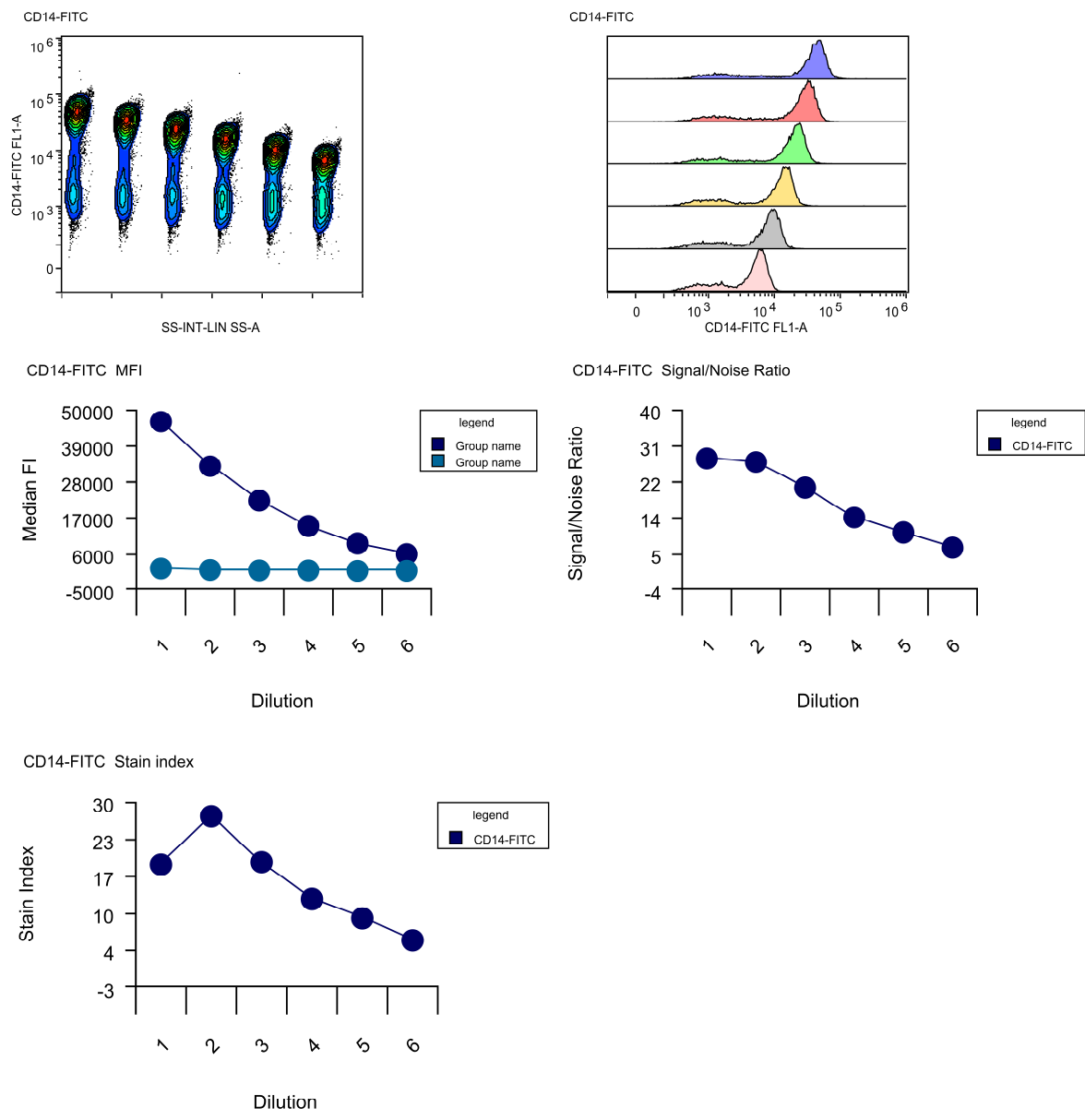
#### **3.2.8.2. Titracija protutijela i boje za vijabilnost**

Sva protutijela te boja za vijabilnost bili su titrirani prije korištenja kako bi se odredila optimalna koncentracija koja će se koristiti u daljnjim eksperimentima. Svako protutijelo titrirano je na populaciji stanicama za koje je poznato da imaju najveću ekspresiju tog antigena na svojoj površini. Tako su protutijela CD14 i CD16 titrirana na monocitima, protutijela CD40 i HLA-DR na M1 MDM-ovima, protutijela CD163 i CD206 na M2 MDM-ovima te protutijelo CD209 na MDCC-ovima. Ukratko, uzeta je količina protutijela

preporučena od strane proizvođača te su napravljena 2-struka serijska razrijeđenja svakog protutijela u PBS-FBS2%. U svako razrijeđenje dodano je po  $5 \times 10^5$  stanica u 150  $\mu$ l ukupnog volumena. Nakon svakog koraka uzorci su 3 – 4 s protreseni na tresilici pri maloj brzini. Uzorci su inkubirani tijekom 20 min na RT, zaštićeni od svjetla. Nakon toga dodan je 1 ml radne otopine FACSLysing, inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla te potom centrifugirano na  $500 \times g$  tijekom 5 min. Nakon ispiranja uzoraka s 2 ml PBS-FBS2% i centrifugiranja tijekom 5 min na  $500 \times g$  na RT, uzorci su fiksirani dodatkom 500  $\mu$ l PBS-FBS2%-PFA2%. U svaku epruvetu je nakon obilježavanja protutijelima dodano po  $1,5 \times 10^5$  neobilježenih stanica.

Za titraciju boje za vijabilnost pripremljena su dva alikvota stanica, jedan je nakon dodatka boje zagrijavan na 65°C tijekom 15 min (kako bi se umrtvile stanice), a drugi isto vrijeme inkubiran na 4°C (kako bi stanice ostale žive). Po završetku inkubacija stanice su spojene u istu epruvetu. Ostali dio postupka je bio identičan kao u protokolu za titraciju protutijela.

Uzorci su analizirani na protočnom citometru Navios (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, SAD) te su podaci prikupljeni koristeći program Navios system software (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, SAD). Kasnija analiza titracije napravljena je pomoću računalnog programa FlowLogic (Inivai, Mentone, Victoria, Australija). Za obilježavanje stanica u eksperimentima korištena je optimalna koncentracija s najboljim razdvajanjem pozitivne i negativne populacije stanica (Slika 9).



**Slika 9.** Shematski prikaz titracije protutijela CD14-FITC na monocitima radi određivanja optimalne koncentracije protutijela koja će se koristiti u daljnjim eksperimentima. Napravljeno je pet 2-strukih serijskih razrijeđenja protutijela kojima su obilježene stanice te spojene s neobilježenim stanicama. Analiza titracije napravljena je pomoću računalnog programa FlowLogic koji na točkastom prikazu pokazuje razdvojenost stanica obilježenih protutijelom te neobilježenih stanica, analizira medijan intenziteta fluorescencije (Median FI), izračuna omjer očitanoog signala prema pozadinskom signalu (od engl. *Signal/Noise Ratio*) te izračuna stupanj promjene (od engl. *Stain Index*) s grafičkim prikazom optimalne koncentracije protutijela (koja postiže najbolje razdvajanje pozitivne od negativne populacije stanica).

### 3.2.8.3. Postupak odvajanja stanica od površine na kojoj rastu nakon infekcije

Metode odvajanja adherentnih stanica od površine na kojoj rastu utječu na fenotip i funkciju stanica. U svrhu odabira optimalne otopine za odvajanje stanica od površine napravljena je usporedba nekoliko metoda odvajanja stanica s više različitih enzima i otopina: tripsinom, akutazom, otopinom dinatrij EDTA (2 mM, 5 mM, 10 mM; pH 7,4) te PBS-om (pH 7,4), prema radu Chen i sur., 2015. Dokazala sam kako metoda odvajanja stanica pomoću otopine dinatrij EDTA (pH 7,4) najmanje negativno utječe na ekspresiju staničnih površinskih molekula vlastitog višebojnog panela te je 10 mM otopina dinatrij EDTA (pH 7,4) korištena za eksperimente metodom protočne citometrije.

Postupak odvajanja monocita/MDM/MDDC proveden je u BSL-3 laboratoriju, unutar MZU. Sa stanica je uklonjen medij nakon čega su pet puta isprane s po 2 ml hladnog PBS-a. Supernatant i ispirak PBS-a su sakupljeni u posebnu epruvetu s medijem RPMI zbog prikupljanja plutajućih stanica iz supernatanta. Na adherirane stanice u pločici Lumox dodano je po 2 ml 10 mM EDTA (pH 7,4) te su inkubirane 10 – 15 min pri 37°C ili pri sobnoj temperaturi ovisno o brzini odvajanja stanica od podloge. Nakon inkubacije stanice su resuspendirane pipetom i objedinjene sa stanicama iz supernatanta. Centrifugiranjem na 300 × g tijekom 10 min dobiveni talog stanica je ispran i konačno resuspendiran u 1,1 ml hladnom PBS-FBS2%.

### 3.2.8.4. Priprema uzoraka za imunofenotipizaciju

U epruvetama od 1,5 ml napravljeno je devet radnih otopina protutijela dodajući odgovarajuću količinu pojedinačnih protutijela i boje za vijabilnost Live/Dead Near IR te odgovarajuće količine pufera do ukupnog volumena od 50 µl. Uzorci su obilježeni prema shemi u Tablici 2. Radne otopine uključivale su i kontrolne radne otopine koje su sadržavale kombinaciju protutijela u kojoj nedostaje jedno protutijelo iz panela (FMO, od engl. *fluorescence minus one controls*) kako bi se usporedbom s uzorkom koji sadrži potpuni panel sa svim protutijelima i bojom mogla odrediti razina intenziteta fluorescencije. Radne otopine su pripremljene u BSL-2 laboratoriju, prije ulaska u BSL-3 laboratorij. Otprilike po  $3 \times 10^5$  stanične suspenzije raspoređeno je u epruvete s određenom radnom otopinom. Sve epruvete su dobro zatvorene te lagano protresene na plastičnom stalku tijekom 4 – 5 sek. Uzorci su inkubirani tijekom 30 min pri 4°C, zaštićeni od svjetlosti. Uzorci su potom protreseni na plastičnom stalku. Dodano je 1 ml radne otopine FACSLysing te inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetlosti. Centrifugirano je na 500 × g tijekom 5 min. Supernatant je odstranjen, a svaki uzorak protresen na plastičnom stalku. Za ispiranje je dodano po 3 ml

PBS-FBS2% te centrifugirano na  $500 \times g$  tijekom 5 min. Supernatant je odstranjen, a svaki uzorak protresen na plastičnom stalku. Za inaktivaciju virusa dodano je po 500  $\mu$ l PBS-FBS2%-PFA2%. Taj postotak paraformaldehida dovoljan je za daljnje analize i manipulacije uzorcima izvan BSL-3 laboratorija. Uzorci su pohranjeni u hladnjak na 4°C na nekoliko sati, do analize na protočnom citometru.

**Tablica 2.** Shema obilježavanja uzoraka za imunofenotipizaciju.

	Uzorak	CD14-FITC	CD16-AF700	CD40-PerCP-eF710	CD45-PC7	CD163-AF647	CD206-eF450	CD209-PE	HLA-DR-KO	Live/Dead Near IR
	Koncentracija protutijela i boje	ND* (5 $\mu$ l / test)	0,0375 $\mu$ g / test	0,015 $\mu$ g / test	ND (0,5 $\mu$ l / test)	0,5 $\mu$ g / test	0,125 $\mu$ g / test	0,03 $\mu$ g / test	ND (2 $\mu$ l / test)	ND (0,1 $\mu$ l / test)
	Kataloški broj	555397	56-0168-42	46-0409	IM3548	326508	48-2069	12-2099	B00070	L34959
1	Neobjavljani									
2	Live/Dead Near IR									x
3	Potpuno obojani	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	Potpuno obojani	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	FMO CD14-FITC		x	x	x	x	x	x	x	x
6	FMO CD16-AF700	x		x	x	x	x	x	x	x
7	FMO CD40-PerCP-eF710	x	x		x	x	x	x	x	x
8	FMO CD163-AF647	x	x	x	x		x	x	x	x
9	FMO CD206-eF450	x	x	x	x	x		x	x	x
10	FMO CD209-PE	x	x	x	x	x	x		x	x
11	FMO HLA-DR-KO	x	x	x	x	x	x	x		x

\*ND – podatak nije dostupan od strane proizvođača

### 3.2.8.5. Analiza na protočnom citometru

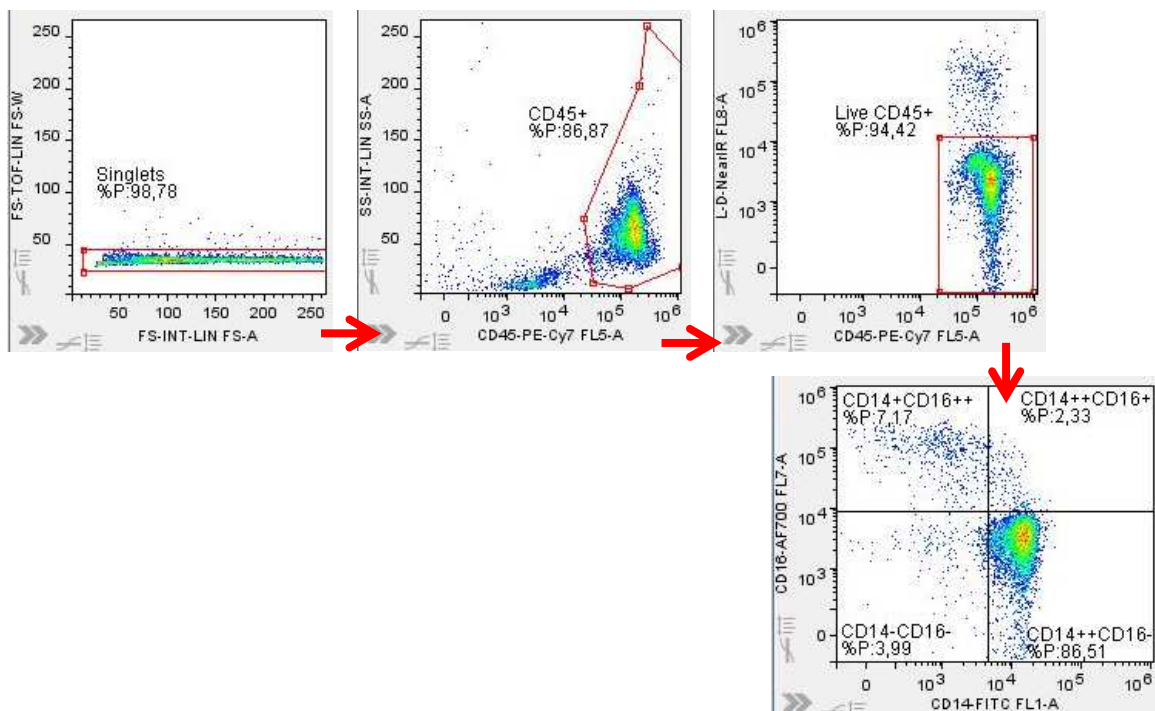
Očitavanje uzoraka i prikupljanje podataka na uređaju za protočnu citometriju napravljeno je u Odjelu za translacijsku medicinu, Dječje Bolnice Srebrnjak, Zagreb. Propuštanje uzoraka za



imunofenotipizaciju provedeno je na protočnom citometru Navios koji ima tri lasera i deset fluorescentnih kanala uz računalni program Navios System Software. Prije same eksperimentalne analize na protočnom citometru je provedena optimizacija i podešavanje svih uvjeta i parametara za detekciju monocita/MDM/MDDC kao što su pojačanje (od engl. *gain*) i veličina impulsa napona (V). Analiza ekspresije površinskih molekula napravljena je u sedam neovisnih eksperimenata odnosno na sedam darivatelja u tri vremenske točke nakon infekcije (1 sat, 48 sat, 7 dan) uz pripadne pozitivne kontrole (M1/M2/M2c MDM, MDDC), pripremljene na stanicama svakog pojedinog darivatelja. Svi eksperimenti analizirani su na istim postavkama citometra. Prije svakog početka analize napravljena je provjera optike protočnog citometra pomoću Flow Check Pro fluorosfera te provjera protočnog sustava uređaja pomoću Flow-Set Pro fluorosfera. Rasap svjetlosti prema naprijed (FSC, od engl. *Forward Scatter*) s bočnim rasapom svjetlosti (SSC, od engl. *Side Scatter*) detektirali su populacije stanica s obzirom na veličinu i granuliranost stanica. Na FSC sa SSC prikazu odabrana je populacija monocita/makrofaga. Iz tog prikaza izdvojeni su događaji na prikazu Live Dead Near IR s CD45-PC7 te je odabrana populacija živih CD45<sup>+</sup> stanica na kojoj je sakupljano do 11 000 događaja. Kompenzacije preklapanja fluorescencije između kanala citometra napravljene su za svakog darivatelja pomoću kuglica za kompenzaciju na protočnom citometru.

### **3.2.8.6. Analiza podataka u računalnom programu FlowJo**

Podaci svih eksperimenata i kompenzacija su analizirani pomoću računalnog programa FlowJo, verzija 10.7.1 (FlowJo po Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Na točkastom prikazu FSC-INT-LIN (FS-A) s FSC-TOF-LIN (FS-W) odabrana je populacija „pojedinačnih čestica“ (od engl. *singlets*). Iz tog prikaza dalje je izdvojena (od engl. *gating*) populacija CD45<sup>+</sup> stanica na prikazu SSC-INT-LIN (SS-A) s CD45-PC7 (FL5-A). Iz tog prikaza izdvojena je daljnja populacija živih CD45<sup>+</sup> stanica na prikazu Live Dead Near IR (FL8-A) s CD45-PC7 (FL5-A). Način strategije izdvajanja prikazan je na Slici 10. Na toj populaciji živih CD45<sup>+</sup> stanica su napravljene sve daljnje analize i izdvajanja subpopulacija.



**Slika 10.** Prikaz strategije izdvajanja populacija stanica (od engl. *gating strategy*).

Razlike između inficiranih i neinficiranih stanica izražene su kao stupanj promjene (od engl. *fold change, stain index*) medijana intenziteta fluorescencije (MFI, od engl. *median fluorescence intensity*), svih sedam derivatelja. Stupanj promjene je normalizirani signal prema pozadini koji se izračunava kao omjer razdvojenosti medijana intenziteta fluorescencije pozitivne populacije (obojenje s potpunim panelom protutijela) i negativne populacije tog antigena (FMO kontrola), podijeljeno s dvije standardne devijacije negativne populacije tog antigena (FMO kontrole).

Stupanj promjene izračunat je prema formuli:

$$\text{MFI stupnja promjene} = \frac{\text{Prosjek MFI „potpuni panel“} - \text{MFI „FMO antigen“}}{2 * \text{Std.Dev. „FMO antigen“}}$$

### **3.2.9. Određivanje koncentracije solubilnih komponenti nespecifične imunosti u supernatantu**

#### **3.2.9.1. Pojedinačni i multipleks imunotestovi na bazi magnetskih mikrokuglica**

Uzorci i standardi testirani su u duplikatu. Mnogostruki test bio je sastavljen od 13 analita: IL-1RA, IL-17F, IL-27, IL-37, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL22 (MDC), MIF, M-CSF, CD40L, CXCL10. Analit TGF- $\beta$ 1 je zbog specifičnosti protokola testiran kao pojedinačni test. Mnogostruki test visoke osjetljivosti bio je sastavljen od sedam analita: CXCL8, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ .

Za detekciju TGF- $\beta$ 1 bilo je potrebno napraviti bioaktivnu formu analita u uzorcima te je stoga morao biti testiran posebno. Za aktivaciju uzoraka bilo je potrebno napraviti 1 N HCl-a, 1,2 N NaOH s 0,5 M HEPES-om. U 100  $\mu$ l supernatanta dodano je 20  $\mu$ l 1N HCl. Dobro izmiješano. Inkubirano tijekom 10 min na RT. Zakiseljeni uzorak neutraliziran je dodavanjem 13  $\mu$ l 1,2 N NaOH s 0,5 M HEPES-om te dobro izmiješan. Izmjeren je pH kako bi se osiguralo kako je pH uzorka unutar bioloških vrijednosti (pH 7,2 – 7,6).

Standardi su rekonstituirani te su pripremljena 4-struka serijska razrijeđenja mješavine standardâ. Kod korištenja mnogostrukih testova visoke osjetljivosti cijeli postupak je bio identičan, samo s dodatnim korakom kod rekonstitucije standarda. Radne otopine pufera i standardâ pripremljene su u BSL-2 laboratoriju, prije ulaska u BSL-3 laboratorij. Mikrotitarska pločica je umetnuta u ručnu magnetsku pločicu za ispiranje mikrotitarskih pločica (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Magnetske kuglice su vorteksirane tijekom 30 s. Po 50  $\mu$ l radne mješavine magnetskih mikrokuglica je stavljeno u svaku jažicu pločice te pričekano 2 min kako bi se magnetske mikrokuglice akumulirale na dnu jažica. Tekućina iz jažica uklonjena je brzim okretanjem ručne magnetske pločice za ispiranje. Postupak ispiranja se sastojao od dodavanja po 150  $\mu$ l radne otopine pufera za ispiranje u svaku jažicu te čekanjem od 30 s kako bi se magnetske mikrokuglice akumulirale na dnu jažica, zatim je tekućina iz jažica uklonjena brzim okretanjem ručne magnetske pločice za ispiranje s umetnutom mikrotitarskom pločicom. U željene jažice dodano je po 50  $\mu$ l standarda ili uzorka supernatanta. Pločica je inkubirana 30 min na tresilici za pločice pri 500 rpm na RT. Potom je inkubirana preko noći na 4°C. Nakon inkubacije preko noći, pločica je ponovno inkubirana 30 min pri 500 rpm na RT. Pločica je zatim dva puta isprana opisanim postupkom ispiranja. Dodano je po 25  $\mu$ l pripremljene radne smjese detekcijskih protutijela u svaku jažicu. Pločica je potom inkubirana 30 min pri 500 rpm na RT. Pločica je zatim dva puta isprana opisanim postupkom ispiranja. U svaku jažicu je dodano po 50  $\mu$ l streptavidin-PE (od engl.

*streptavidin-phycoerythrin*) te inkubirano 30 min pri 500 rpm na RT. Kod korištenja mnogostrukih testova visoke osjetljivosti, dodatni korak se sastojao od dodavanja po 50 µl amplifikacijskog reagensa 1 i inkubacije 30 min pri 500 rpm na RT te zatim bez koraka ispiranja dodavanja po 50 µl amplifikacijskog reagensa 2 i identične inkubacije. Pločica je zatim dva puta isprana opisanim postupkom ispiranja. Dodano je po 120 µl pufera za očitavanje u svaku jažicu. Pločica je inkubirana 5 min pri 500 rpm na RT. Na lokaciji uz uređaj Luminex 200 System (Luminex Corporation, Austin, Texas, SAD) pločica je još jednom inkubirana 5 min pri 500 rpm na RT. Za to vrijeme su u program Luminex Acquisition software (Luminex Corporation, Austin, Texas, SAD) uneseni opći podaci o veličini uzorka (50 µl), „DD gate“ (5 000-25 000), trajanju očitavanja svake jažice (45 sek), broju kuglica po regiji kuglica (50-100) te specifični podaci za svaki analit (ime, broj i regija kuglica, vrijednosti analita). Očitavanje uzoraka i prikupljanje podataka na uređaju Luminex 200 napravljeno je u Odjelu za translacijska istraživanja i povezivanje, Fidelta d.o.o., Zagreb.

### **3.2.10. Testiranje na mikoplazme**

Virusni štokovi te supernatant inficiranih monocita bili su testirani na mikoplazme vrlo osjetljivim PCR-om prema Uphoff and Drexler 2013 te su utvrđeni kako su bez prisutnosti mikoplazmi.

### **3.2.11. Statistička i bioinformatička analiza podataka**

Statistička analiza podataka napravljena je u više računalnih programa, koristeći specijalizirane programe, ovisno o vrsti podataka.

Za testiranje normalnosti svih setova uzoraka korišten je Shapiro-Wilk test. Uzorci nisu imali normalnu distribuciju. Za testiranje razlika između dvaju nezavisnih uzoraka, tj. među skupinama (npr. stanice inficirane s virusom PUUV prema stanicama inficiranim s virusom TULV odnosno prema neinficiranim stanicama; broj kopija virusne RNA kod stanica inficiranih s virusom PUUV prema stanicama inficiranim s virusom TULV) korišten je neparametrijski test koji podnosi analizu malog uzorka, Wilcoxon-ov test rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću (od engl. *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*), u statističkom programu GraphPad Prism, verzija 8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD).

S obzirom na malu veličinu setova podataka, od po šest neovisnih eksperimenata (donora), na grafičkim prikazima rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, od engl. *standard error of mean*). Srednja vrijednost je bolji izbor za prikaz

rezultata jer medijan kod malih setova podataka ima tendenciju precijeniti stvarnu sredinu za čak 10%. Vrijednosti SEM uzima u obzir vrijednosti standardne devijacije i veličinu uzorka. U svim statističkim analizama razina od  $p \leq 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

Za analizu rezultata koncentracije solubilnih citokina i kemokina korišten je program Luminex xPotent software, verzija 3.1 (Luminex, Austin, Texas, SAD). Kvantitativna koncentracija solubilnih citokina i kemokina izračunata je pomoću logističke jednadžbe s 5 parametara (od engl. *Logistic 5P Weighted*), koristeći standardnu krivulju.

Za analizu rezultata genske ekspresije korišten je internetski portal *GeneGlobe Data Analysis Center* (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>), omogućen od strane proizvođača (Qiagen Sciences, Germantown, Maryland, SAD). Relativne razine genske ekspresije izračunate su metodom relativne kvantifikacije  $2^{-\Delta Ct}$ . Student-ov t-test korišten je za izračunavanje značajnosti između skupina. Relevantnim su smatrani stupnjevi promjene genske ekspresije  $\geq 2$  sa ili bez statističke značajnosti od  $p \leq 0,05$  kao i stupnjevi promjene  $\geq 1 < 2$  sa statističkom značajnošću od  $p \leq 0,05$ .

Za funkcionalnu analizu podataka genske ekspresije (karakterizacija mreže interakcija između molekula) korištena je platforma QIAGEN IPA za interpretaciju podataka (od engl. *QIAGEN's data interpretation platform Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*, Qiagen Sciences, Germantown, Maryland, SAD). Za funkcionalnu analizu bioloških procesa i izraženih staničnih signalnih puteva korišten je internetski portal klasifikacijskog sustava PANTHER, verzija 17.0 (od engl. *PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System*, [www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)).

Za analizu rezultata relativne ekspresije površinskih markera na stanicama putem protočne citometrije korišten je program FlowJo, verzija 10.7.1. Relativna količina površinskih markera na stanicama određena je mjerenjem medijana intenziteta fluorescencije specifičnih protutijela (MFI) te izražena kao indeks obojenja (od engl. *stain index*). Na grafičkim prikazima rezultati su stoga izraženi kao medijan s kvartilima sedam neovisnih eksperimenata (donora)  $\pm$  standardna pogreška.

Za analizu fotografija snimljenih digitalnom monokromatskom kamerom na fluorescentom mikroskopu korišten je program ImageJ verzija 1.53k (Wayne Rasband i suradnici, National Institutes of Health i University of Wisconsin, SAD). Monokromatske fotografije su preklapljene (od engl. *overlay*) u jednu fotografiju.

## 4. REZULTATI

Svrha ovog istraživanja bila je istražiti interakciju ortohantavirusa i primarnih ljudskih monocita/makrofaga te posljedični urođeni imunosni odgovor monocita/makrofaga na infekciju. Također, željela sam dokazati da kvalitativni i kvantitativni imunosni odgovor monocita/makrofaga ovisi o stupnju patogeničnosti virusa. Nadalje, željela sam istražiti potiču li ortohantavirusi diferencijaciju monocita nakon infekcije prema monocitnim makrofagima (MDM, od engl. *monocyte-derived macrophages*) ili monocitnim dendritičkim stanicama (MDDC, od engl. *monocyte-derived dendritic cells*) i eventualnu polarizaciju prema stanicama MDM sličnih tipu M1 ili M2.

Spomenute ciljeve sam provjerila na razini sinteze 21 solubilnog modulatora biološkog odgovora, ekspresije 19 gena te ekspresije 8 površinskih molekula primarnih monocita, stanica MDM i MDDC.

### 4.1. Uspostava dugotrajne infekcije monocita ortohantavirusima

Kako bismo analizirali uspješnost infekcije ortohantavirusima i njezin karakter, u stanicama monocita kao i u supernatantima (STNT) inficiranih stanica praćena je kinetika sinteze ortohantavirusne RNA pomoću RT-qPCR-a nakon što su monociti inficirani istim brojem viriona virusa PUUV ili TULV (MOI=0,1). Također, metodom indirektno imunofluorescencije koristeći specifična protutijela protiv proteina N ortohantavirusa praćena je kinetika sinteze proteina N u monocitima.

#### 4.1.1. Kinetika infekcije primarnih monocita ortohantavirusima

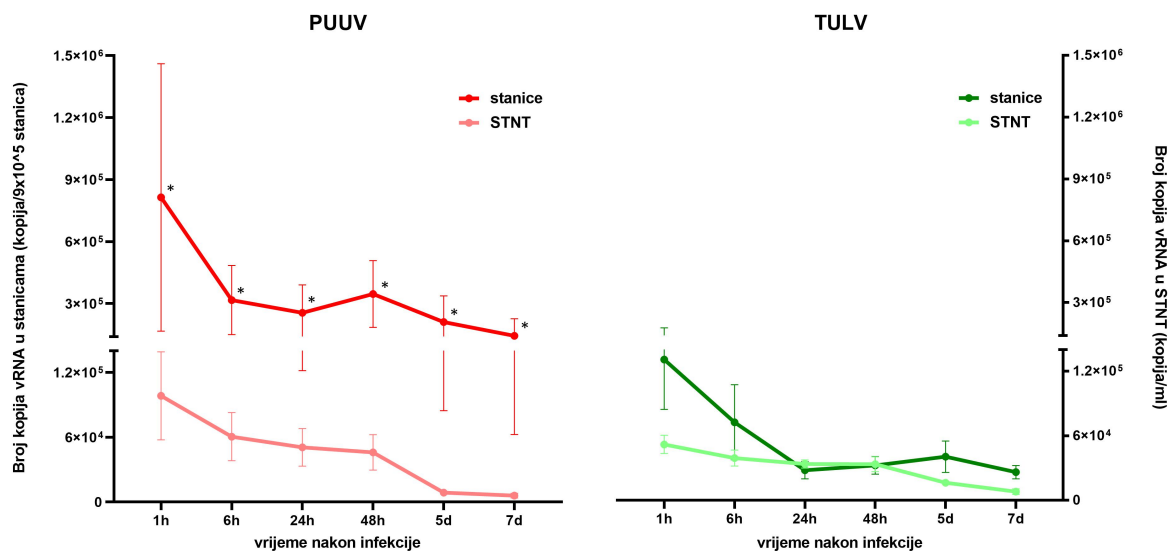
Mjerila sam količinu ortohantavirusne RNA segmenta S u supernatantu i u stanicama kroz sedam dana, u šest vremenskih točaka nakon infekcije (1 sat, 6 sati, 24 sata, 48 sati, 5 dana, 7 dana), u šest donora odnosno neovisnih eksperimenata.

Kod infekcije monocita virusom PUUV rezultati su pokazali kako je najveći broj kopija virusne RNA izmjeren u stanicama u 1. satu nakon infekcije (n.i.) iznoseći približno  $8,1 \times 10^5$  kopija RNA/ $9 \times 10^5$  stanica nakon čega se razina transkripcije smanjivala do 24 sata n.i. U 48 sati n.i. uočen je porast sinteze virusne RNA (kod 5 od 6 donora) nakon čega je ponovno uslijedio pad broja kopija virusne RNA u 5. i 7. danu n.i. (Slika 11). Paralelno s tim analizirala sam i količinu virusne RNA u STNT inficiranih stanica kako bih indirektno pratila sekreciju viriona u stanični medij. U STNT su do drugog dana nakon infekcije detektirane

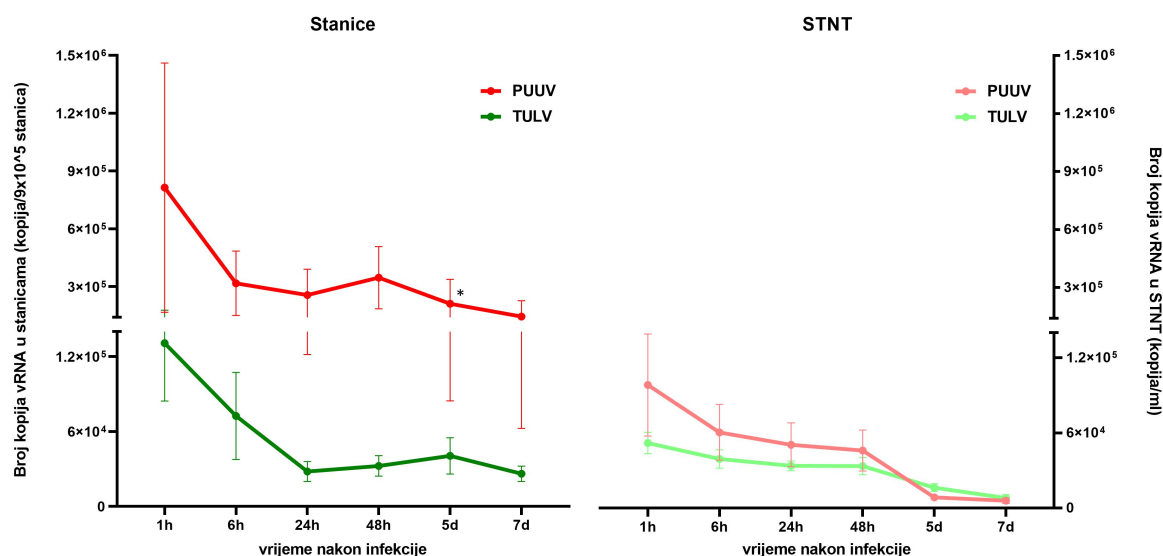
stabilne, no vrlo niske količine virusne RNA (cca  $9,8 \times 10^4$  kopija/ml). U stanicama je, očekivano, bila prisutna statistički značajno viša količina virusnih kopija nego u STNT kroz cijelo vrijeme trajanja infekcije ( $p=0,0313$ ) (Slika 11).

Kod infekcije monocita virusom TULV maksimum transkripcije genomskeg segmenta S sam također detektirala sat vremena nakon infekcije (u stanicama  $1,3 \times 10^5$  kopija RNA/ $9 \times 10^5$  stanica; u STNT  $5,1 \times 10^4$  kopija RNA/ml) nakon čega se sinteza virusne RNA smanjivala. U stanicama je u 5 dana n.i. uočen blagi porast broja kopija transkripata (Slika 11). U stanicama je u prvih 6 sati te u 5. i 7. danu nakon infekcije bila prisutna veća količina virusnih kopija nego u STNT, ali bez statističke značajnosti.

Monociti inficirani virusom PUUV sintetizirali su tijekom cijelog trajanja kultivacije prosječno  $9 \times (0,22 - 68 \times)$  više količine virusne RNA u odnosu na monocite inficirane virusom TULV, a dobivene razlike su bile statistički značajne u 5. danu n.i. ( $p=0,0313$ ) (Slika 12). Trend transkripcijske kinetike virusne RNA bio je sličan kod oba virusa, s padom broja virusnih transkripata nakon čega je u 48 sati n.i. kod infekcije virusom PUUV te u 5 dana n.i. kod infekcije virusom TULV prisutno povećanje broja kopija virusne RNA (Slika 12).



**Slika 11.** Kinetika sinteze ortohantavirusne RNA (vRNA) segmenta S u primarnim monocitima inficiranim virusom PUUV ili TULV te u supernatantu (STNT) inficiranih stanica praćena kroz sedam dana nakon infekcije. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, od engl. *standard error of mean*) u šest donora odnosno neovisnih eksperimenata. Statistička značajnost između broja kopija virusne RNA u stanicama i supernatantu izračunata je pomoću Wilcoxon-ovog testa rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću od  $<0,05$  (\*).



**Slika 12.** Usporedba kinetike sinteze ortohantavirusne RNA (vRNA) segmenta S u primarnim monocitima inficiranim virusom PUUV ili TULV te u supernatantu (STNT) inficiranih stanica, praćena kroz sedam dana nakon infekcije. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, od engl. *standard error of mean*) u šest donora odnosno neovisnih eksperimenata. Statistička značajnost između broja kopija virusne RNA kod virusa PUUV i TULV izračunata je pomoću Wilcoxon-ovog testa rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću od  $<0,05$  (\*).

#### 4.1.2. Uspješnost infekcije primarnih monocita ortohantavirusima

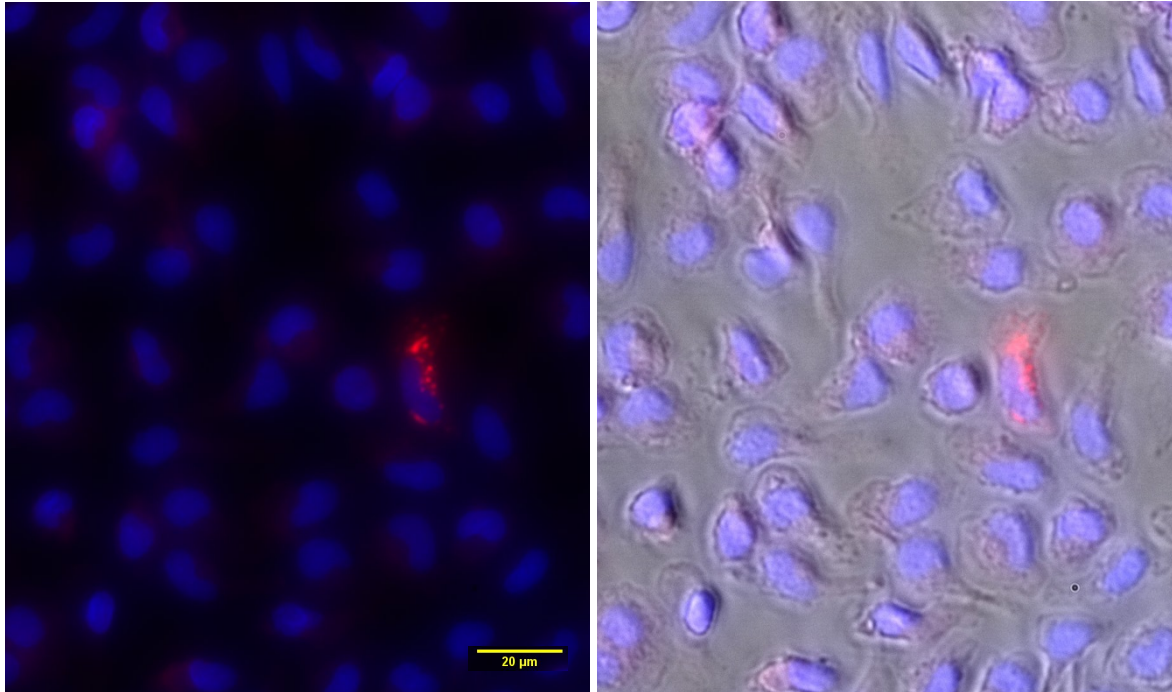
Infekciju monocita ortohantavirusima željela sam potvrditi dodatnom metodom kao i odrediti uspješnost same infekcije monocita ortohantavirusima. U tu svrhu sam metodom indirektno imunofluorescencije pratila sintezu proteina N virusa PUUV ili TULV u stanicama koristeći specifična protutijela protiv proteina N (Slike 13 i 14).

Prisutnost ortohantavirusnog proteina N detektirana je u stanicama u 48 sati n.i. U inficiranim stanicama bilo je vidljivo specifično točkasto perinuklearno crveno obojenje kao dokaz prisutnosti proteina N u njima (Slika 13). Jednaki obrazac obojenja bio je prisutan nakon infekcije oboma virusima. Do sedmog dana nakon infekcije uzorak obojenja se promijenio, formirajući veće točkaste perinuklearne tvorbe (Slika 14).

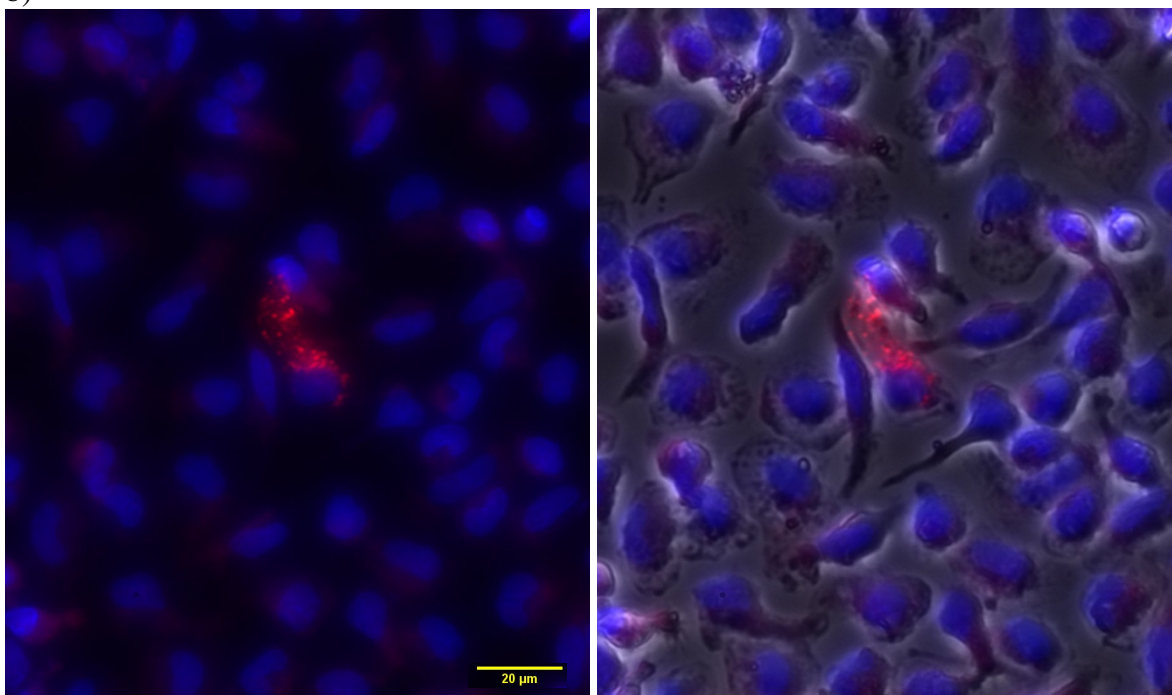
Efikasnost infekcije monocita orthantavirusima računala sam kao omjer pozitivnih (inficiranih) stanica i ukupnog broja stanica u vidnom polju. Prosječno više pozitivnih stanica bilo je prisutno u 48 sati n.i. nego u 7 dana n.i. i kod infekcije virusom PUUV i TULV no ukupan broj pozitivnih stanica bio je nizak i iznosio je manje od 1%.



a)



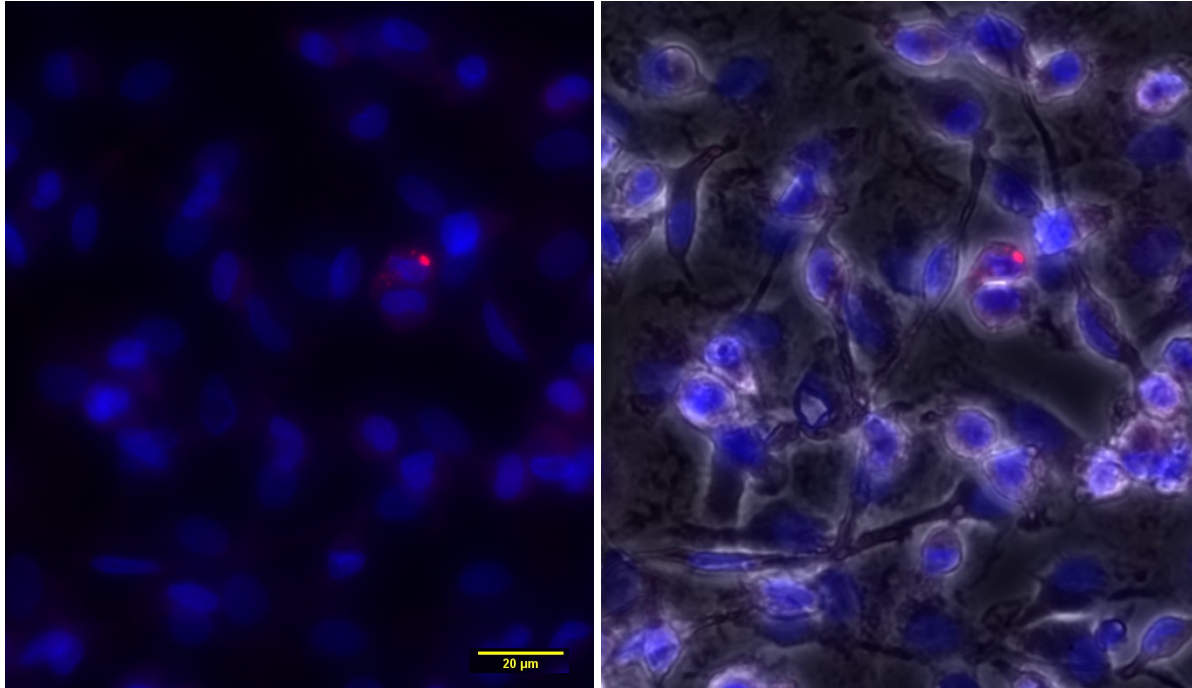
b)



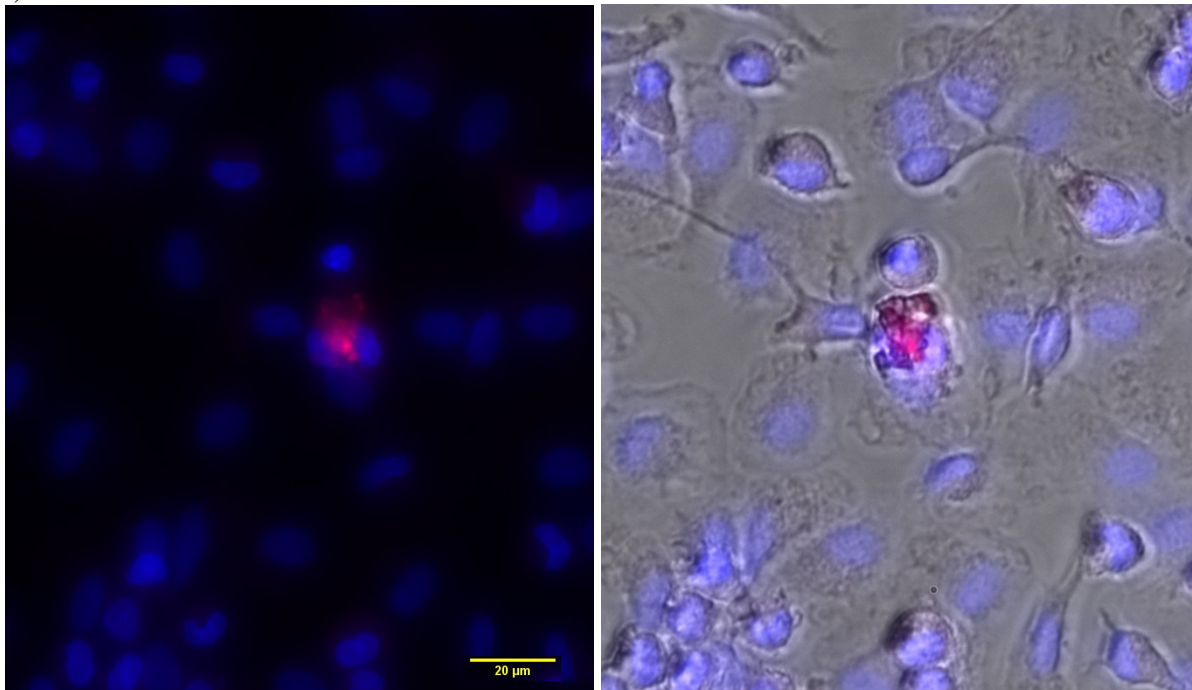
**Slika 13.** Prisutnost proteina N virusa PUUV (a) i TULV (b) u inficiranim monocitima u 48. satu n.i. dokazana metodom indirektne imunofluorescencije koristeći fluorescentni mikroskopom s digitalnom monokromatskom kamerom. Protein N ortohantavirusa vidljiv je kao specifično točkasto perinuklearno crveno obojenje (AF594) dok su jezgre obojane plavo (DAPI). Za analizu fotografija korišten je program ImageJ verzija 1.53k. Monokromatske fotografije su preklapljene (od engl. *overlay*) u jednu fotografiju. Lijeva slika je spojena iz

dva monokromatska kanala (AF594 + DAPI). Desna slika je spojena iz tri monokromatska kanala (fazni kontrast + AF594 + DAPI). Povećanje 40 ×. Prikaz reprezentativnog uzorka.

a)



b)



**Slika 14.** Prisutnost proteina N virusa PUUV (a) i TULV (b) u inficiranim monocitima u 7. danu n.i. dokazana metodom indirektne imunofluorescencije koristeći fluorescentni mikroskopom s digitalnom monokromatskom kamerom. Protein N ortohantavirusa vidljiv je kao specifično točkasto perinuklearno crveno obojenje (AF594) dok su jezgre obojane plavo

(DAPI). Za analizu fotografija korišten je program ImageJ verzija 1.53k. Monokromatske fotografije su preklapljene (od engl. *overlay*) u jednu fotografiju. Lijeva slika je spojena iz dva monokromatska kanala (AF594 + DAPI). Desna slika je spojena iz tri monokromatska kanala (fazni kontrast + AF594 + DAPI). Povećanje 40 ×. Prikaz reprezentativnog uzorka.

## **4.2. Imunosni odgovor primarnih monocita na infekciju patogenim ili apatogenim ortohantavirusom**

Kako bih istražila utjecaj ortohantavirusa na monocite i posljedični urođeni imunosni odgovor monocita u interakciji s virusima PUUV i TULV analizirala sam koncentracije izlučenih citokina i kemokina kao i promjene koje se događaju na razini genske.

### **4.2.1. Rani imunosni odgovor primarnih monocita na infekciju**

Dugotrajnom kultivacijom primarnih monocita nakon infekcije patogenim ili apatogenim ortohantavirusom (virusom PUUV ili TULV), kroz sedam dana, željela sam proučiti rani i kasni odgovor monocita potaknut infekcijom. Rani imunosni odgovor monocita na infekciju pratila sam kroz tri vremenske točke, od 1 do 24 sata n.i.

#### **4.2.1.1. Koncentracija citokina i kemokina u supernatantu tijekom faze ranog urođenog imunosnog odgovora primarnih monocita**

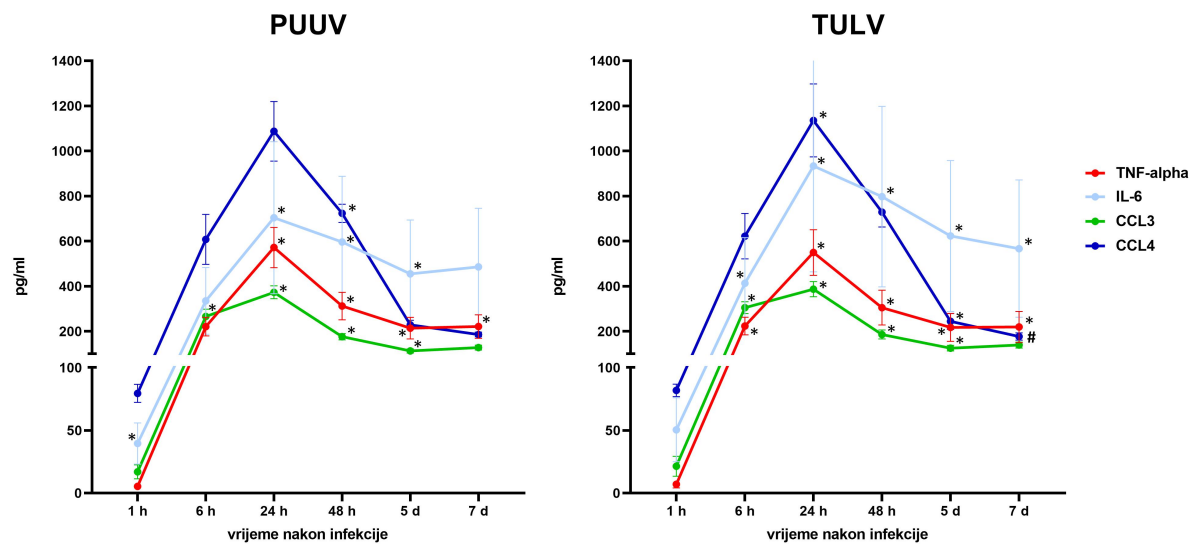
Odabrala sam panel od 21 molekule citokina i kemokina koje su uključene u procese nespecifične imunosti čiju sam koncentraciju željela mjeriti u supernatantu virusom stimuliranih stanica. Redom su to: IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-6, IL-10, IL-17F, IL-27, IL-37, IFN- $\gamma$ , CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL22 (MDC), CD40L, CXCL8, CXCL10 (IP-10), GM-CSF, MIF, M-CSF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1. Analiza sekrecijskog profila inficiranih stanica provedena je u šest neovisnih eksperimenata odnosno na šest darivatelja u šest vremenskih točaka nakon infekcije (1 sat, 6 sati, 24 sata, 48 sati, 5 dana, 7 dana) koristeći imunotestove s magnetskim mikrokuglicama koji su detektirani na uređaju Luminex 200.

Tijekom prva 24 sata n.i. u supernatantu stanica inficiranih virusom PUUV izmjerila sam značajan porast koncentracija TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL3 i CCL4 u odnosu na neinficirane stanice.

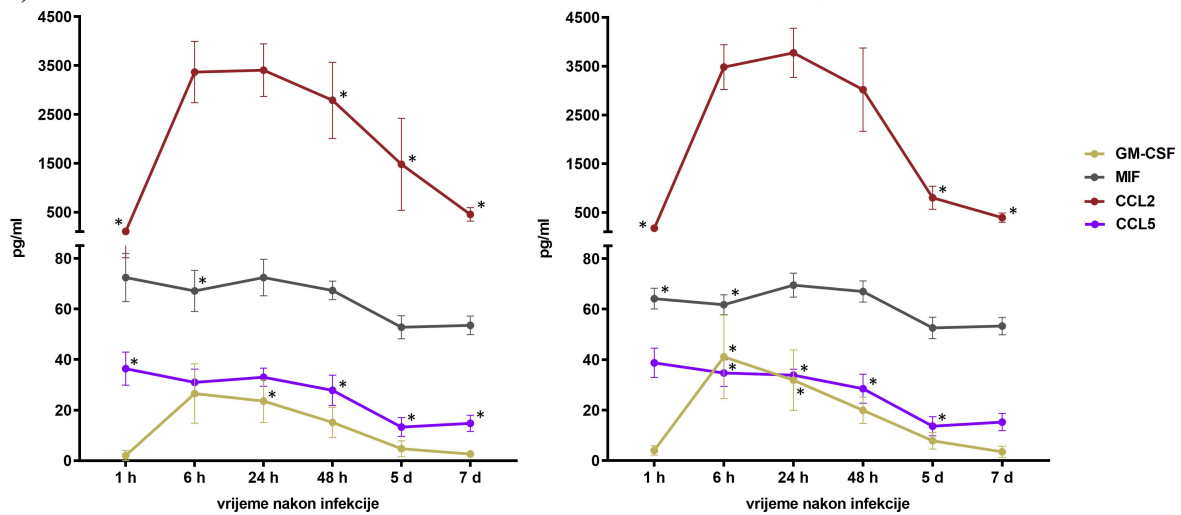
Koncentracije sva četiri analita su svoj maksimum dosegle u 24 sati n.i. nakon čega se njihove koncentracije smanjuju, ali su u 48 sati n.i. još uvijek značajno veće u odnosu na neinficirane stanice (Slika 15 a). Također, u prvim satima infekcije monociti izlučuju CCL2 također značajno veće koncentracije u odnosu na neinficirane stanice kao i povećane koncentracije GM-CSF. Nakon platoa kojeg dosežu između 6 i 24 sata n.i. njihove koncentracije su se do 7. dana kultivacije smanjile na početne koncentracije (Slika 15 b). Konstitutivnu sintezu MIF i CCL5 izmjerila sam tijekom cijele rane faze infekcije (prva 24 sata) nakon čega se njihova koncentracija kontinuirano i postepeno smanjivala (Slika 15 b). U ranoj fazi infekcije monociti također luče značajno povećane koncentracije IL-1 $\beta$ , IL-1RA i CXCL8, ali su samo koncentracije IL-1 $\beta$  bile značajno povećane tijekom cijelog vremena praćenja infekcije u usporedbi s neinficiranim stanicama. Visoke koncentracije IL-1RA i CXCL8 u supernatantu bile su prisutne do kraja kultivacije (Slika 15 c).

Kod infekcije monocita virusom TULV kinetika sinteze svih mjerenih citokina i kemokina kao i vrijeme dosezanja maksimalnih izmjerenih vrijednosti bila je jednaka kao pri infekciji virusom PUUV (Slika 15). Međutim, pri infekciji virusom TULV pojedini solubilni modulatori biološkog odgovora ranije su dostizali značajno veće koncentracije u odnosu na neinficirane stanice nego pri infekciji virusom PUUV. Monociti inficirani virusom TULV lučili su značajno veće koncentracije TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL3, CCL4 i GM-CSF-a već u 6 sati n.i. za razliku od monocita inficiranih virusom PUUV gdje se razlika u odnosu na neinficirane stanice očitovala tek u 24 sata n.i. (Slika 15 a i b). Značajno veće koncentracije IL-1RA u 1 – 24 sata n.i. pokazale su se pri infekciji virusom TULV u odnosu na neinficirane stanice (Slika 15 c). Također, pri infekciji virusom TULV koncentracije MIF i CCL4 značajno su se razlikovale od koncentracija u neinficiranim stanicama redom u 1 sat n.i. i u 24 sata n.i. u usporedbi s infekcijom virusom PUUV gdje su se razlike očitovale redom u 6 sati n.i. i u 48 sati n.i. od koncentracija u neinficiranim stanicama (Slika 15 b).

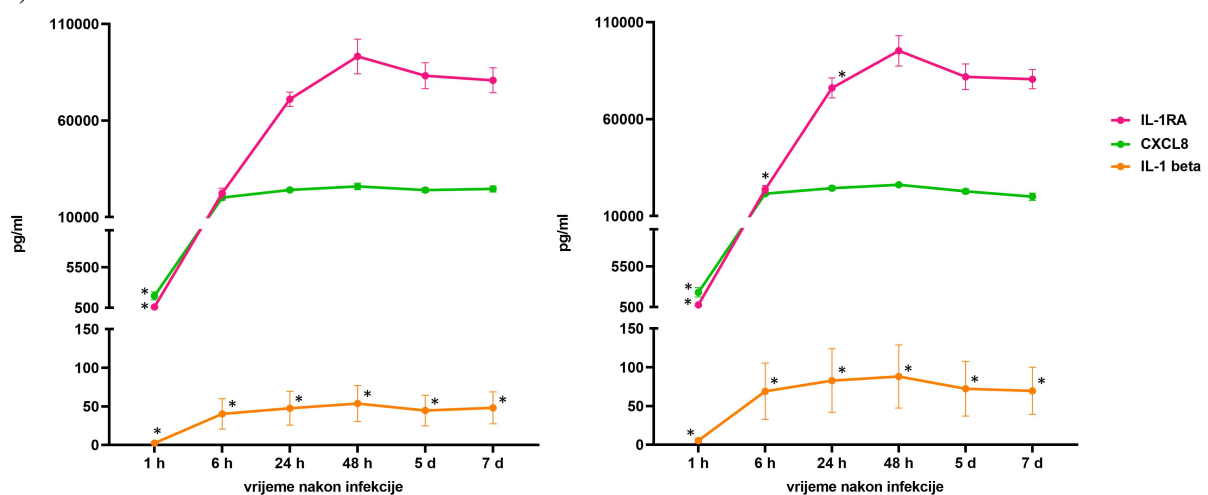
a)



b)



c)

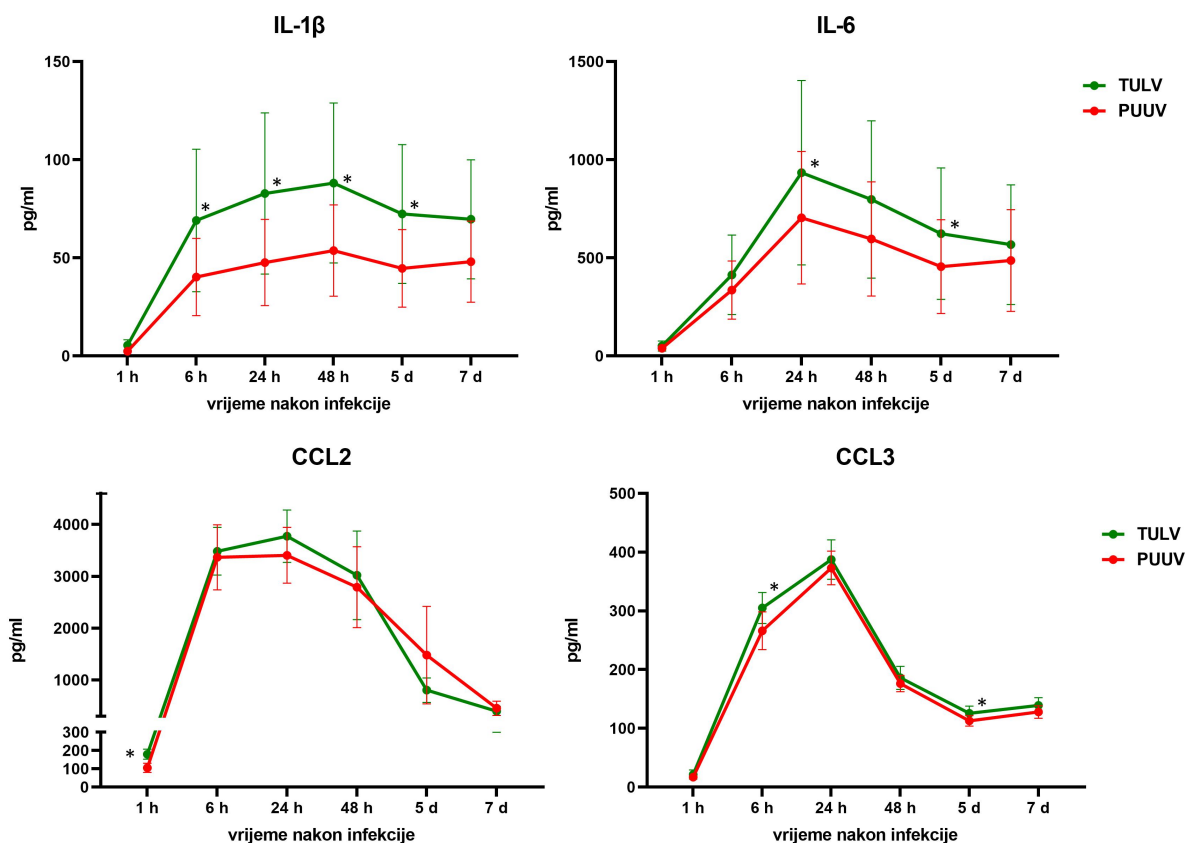


**Slika 15.** Dinamika izlučivanja solubilnih citokina i kemokina u supernatantu tijekom faze ranog urođenog imunskog odgovora monocita inficiranih virusima PUUV i TULV.

Koncentracije solubilnih citokina i kemokina u supernatantima monocita zaraženih virusima PUUV i TULV, u naznačenim vremenskim točkama, mjereni su korištenjem pojedinačnih ili višestrukih imunoloških testova pomoću magnetskih mikrokuglica na analizatoru Luminex 200 System. Za analizu rezultata korišten je program Luminex xPotent software, verzija 3.1. Kvantitativna koncentracija solubilnih citokina i kemokina izračunata je pomoću logističke jednadžbe s 5 parametara (od engl. *Logistic 5P Weighted*), koristeći standardnu krivulju. Rezultati su za svaku vremensku točku izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, od engl. *standard error of mean*) od šest donora odnosno neovisnih eksperimenata mjenjenih u duplikatu. Statistička značajnost kod stanica inficiranih virusima PUUV ili TULV u odnosu na neinficirane stanice izračunata je pomoću Wilcoxon-ovog testa rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću od  $<0,05$  (\* $p<0,05$ ).

Nadalje sam željela vidjeti postoje li razlike u sintezi odnosno izlučivanju solubilnih citokina i kemokina s obzirom na virulentnost virusa (Slika 16). Utvrđene su statistički značajne razlike između infekcije s patogenim virusom PUUV u usporedbi s apatogenim virusom TULV u koncentraciji četiri solubilna medijatora (IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 i CCL3) tijekom rane faze infekcije. Stanice inficirane virusom TULV lučice su statistički značajno veće koncentracije navedenih medijatora unutar prvih 24 sata u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom PUUV. Koncentracije IL-1 $\beta$  značajno su se razlikovale u 6 sati n.i. – 5 dana n.i., a za IL-6 u 24 sata n.i. i 5 dana n.i. U koncentracijama CCL2 su kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV bile prisutne statistički značajne razlike samo u 1 sat n.i., dok su se koncentracije CCL3 značajno razlikovale u 6 sati te u 5 dana n.i. (Slika 16).

Izmjerene koncentracije IL-10 kod inficiranih i neinficiranih stanica bile su vrlo niske, na granici detektabilnosti te nije bilo značajnih razlika između njih (rezultati nisu prikazani). U supernatantima inficiranih monocita nije detektirana prisutnost IFN- $\gamma$  (rezultati nisu prikazani) dok je niska koncentracija IL-17F detektirana samo kod dva donora 48 h nakon infekcije i jednim i drugim virusom te bez statističke značajnosti u odnosu prema neinficiranim stanicama (rezultati nisu prikazani).



**Slika 16.** Usporedba kinetike četiri analita u ranoj fazi infekcije koji su statistički značajno različiti kod stanica inficiranih virusom PUUV u odnosu na stanice inficirane virusom TULV, u naznačenim vremenskim točkama, mjereni su korištenjem pojedinačnih ili višestrukih imunoloških testova pomoću magnetskih mikrokuglica na analizatoru Luminex 200 System. Za analizu rezultata korišten je program Luminex xPotent software, verzija 3.1. Kvantitativna koncentracija solubilnih citokina i kemokina izračunata je pomoću logističke jednadžbe s 5 parametara (od engl. *Logistic 5P Weighted*), koristeći standardnu krivulju. Rezultati su za svaku vremensku točku izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, od engl. *standard error of mean*) od šest donora odnosno neovisnih eksperimenata mjenjenih u duplikatu. Statistička značajnost između stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV izračunata je pomoću Wilcoxon-ovog testa rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću od  $<0,05$  (\*).

#### 4.2.1.2. Promjene u genskoj ekspresiji tijekom faze ranog urođenog imunskog odgovora primarnih monocita

Razinu genske ekspresije željela sam testirati za 19 gena koji su uključeni u urođeni imunski odgovor: receptora (*CD40LG*, *CD68*, *CD206*, *CCR2*, *CCR5*, *CXCR4*), citokina (*TNF*, *IL-1 $\beta$* , *IL-1RN*, *IL-6*, *IL-27*, *IL-37*), kemokina (*CCL4*, *CCL13*, *CXCL8*, *CXCL10*) i gena induciranih virusom (*IFITM3*, *STAT1*, *STAT3*). Za analizu su odabrana i tri referentna gena (*PPIA*, *TBP*, *OAZ1*) koji su se na temelju istraživanja literature pokazali kao najstabilniji u monocitima i stanicama MDM/MDDC. Analiza razine genske ekspresije napravljena je u šest neovisnih eksperimenata od šest darivatelja u šest vremenskih točaka nakon infekcije (1 sat, 6 sati, 24 sata, 48 sati, 5 dana, 7 dana).

Rezultati su pokazali kako u ranim fazama infekcije ortohantavirusi potiču gensku ekspresiju nekih proupalnih gena citokina i kemokina u odnosu na neinficirane stanice (Tablice 3 i 4). Razine genske ekspresije za mjerene citokine i kemokine dosegle su svoj maksimum u 6 sati n.i., nakon čega se njihova ekspresija smanjivala ispod razina početne ekspresije.

Kod kemokinskih gena postoje u ranim satima (1 – 24 sata n.i.) očite razlike u ekspresiji između inficiranih i neinficiranih stanica (Tablice 3 i 4, Slika 17). Ekspresija gena za *CCL13* bila je statistički značajno povećana skoro cijelo vrijeme mjerenja kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u odnosu na neinficirane stanice, dok je pak u 7 dana n.i. kod virusa TULV bila statistički značajno smanjena u odnosu na neinficirane stanice (Slika 17 b). Ekspresija gena za rani proupalni kemokin *CXCL8* bila je kod infekcije virusom PUUV povećana, ali bez statističke značajnosti u odnosu na neinficirane stanice, dok je kod infekcije virusom TULV bila statistički značajno povećana u 1 i 24 sata n.i. (Slika 17 b).

Ekspresija gena *TNF*, koji se u stanicama najranije eksprimira od svih citokinskih gena, bila je kod infekcije virusom TULV statistički značajno povećana u 1. satu n.i., dok je u 5. i 7. danu n.i. bila statistički značajno smanjena u usporedbi s neinficiranim stanicama (Slika 17 b). Kod infekcije virusom PUUV, ekspresija gena *TNF* nije bila značajno različita u usporedbi s neinficiranim stanicama ( $p=0,189729$ ). Zanimljivo je kako je ekspresija *IL1RN* za protuupalni citokin *IL-1RA* kod stanica inficiranih virusom PUUV bila u 1 i 6 sati n.i. statistički značajno povećana u odnosu na neinficirane stanice, dok je kod stanica inficiranih virusom TULV bila statistički značajno povećana samo u 1. satu n.i. u odnosu na neinficirane stanice (Slika 17 b).



Također, kod stanica inficiranih virusom PUUV ekspresija gena *IL1β* i *IL6* bila je povećana, ali bez statističke značajnosti, dok je kod stanica inficiranih virusom TULV prisutna statistički značajno povećana ekspresija gena *IL1β* u 24 sati n.i. u odnosu na neinficirane stanice (Tablice 3 i 4, Slika 17 b).

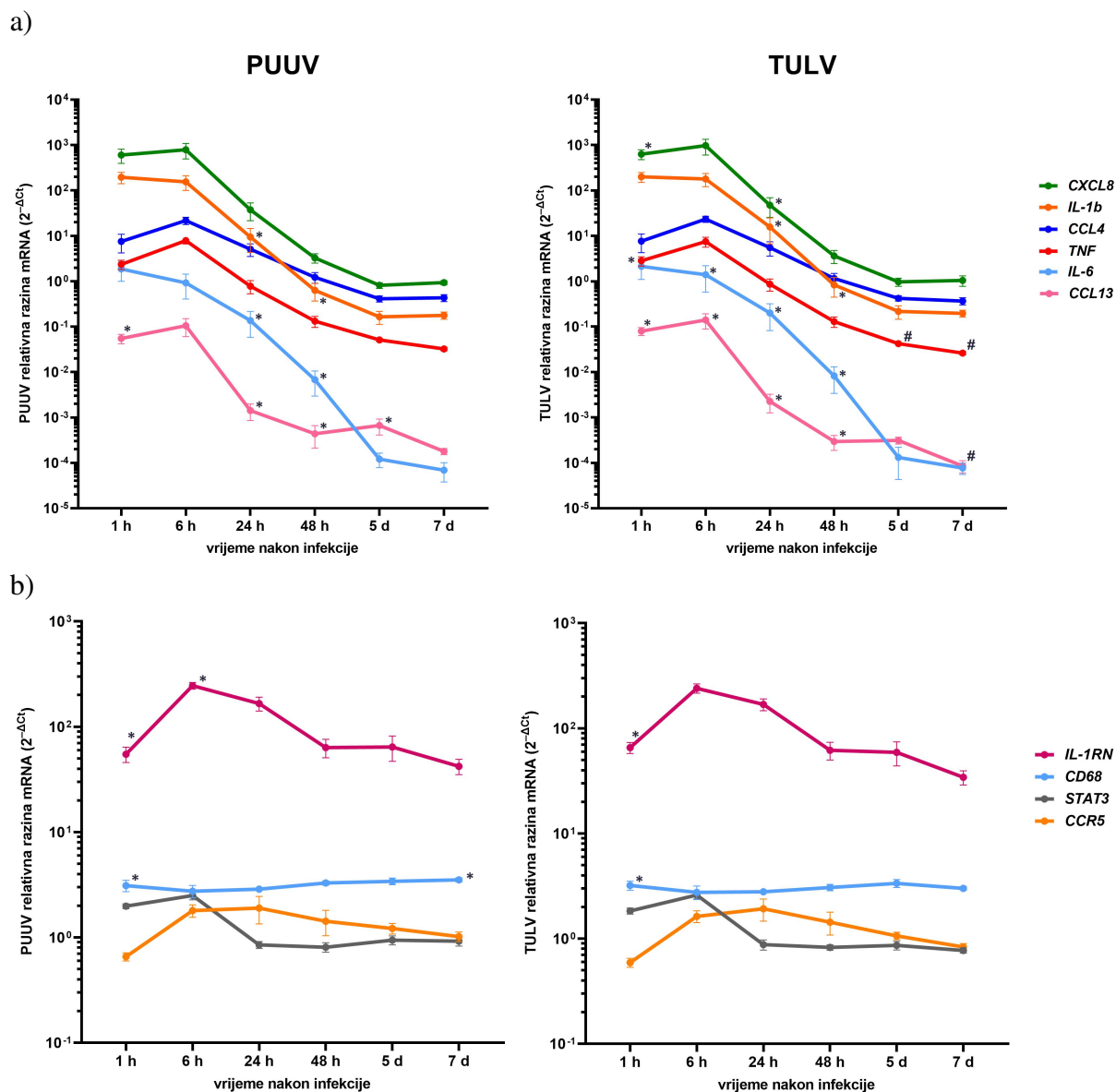
Kod monocita inficiranih virusom PUUV u ranim satima (1 – 24 sata n.i.) je genska ekspresija za receptore *CCR2* i *CXCR4* bila statistički značajno smanjena u odnosu na neinficirane stanice (Tablica 3, Slika 17 d). Genska ekspresija ostalih receptora bila je povećana u odnosu na neinficirane stanice. *MRC1(CD206)* imao je statistički značajno povećanu ekspresiju u 1 – 24 sata n.i., koja se kasnije održavala na stabilnoj razini i u kasnoj fazi praćenja infekcije (Slika 17 c). *CD68* je imao u 1. satu n.i. (Slika 17 a), a *CD40LG* u 6 sati n.i. (Slika 17 d) statistički značajno povećanu ekspresiju u odnosu na neinficirane stanice.

Razine genske ekspresije za receptore *CD40LG*, *CCR2* i *CXCR4* dosegle su svoj minimum u 6 sati n.i., odnosno u 24 sata n.i. nakon čega se njihova razina povećavala.

Kod monocita inficiranih virusom TULV prisutno je u ranim satima (1 – 24 sata n.i.) veće smanjenje genske ekspresije za receptore *CCR2* i *CXCR4* u odnosu na neinficirane stanice nego vrijednosti zabilježene kod monocita inficiranih virusom PUUV (*CCR2* u 1 i 6 h n.i., *CXCR4* u 24 h n.i. i u 48 h n.i.) (Tablica 4, Slika 17 d). Ekspresije gena *MRC1(CD206)* i *CD68* bile su statistički značajno veće nego ekspresije analizirane kod monocita inficiranih virusom PUUV u usporedbi s neinficiranim stanicama (Slika 17 a i c).

Genske ekspresije ostalih receptora (*CD40LG*, *CCR5*) nisu bile značajno različite u odnosu na neinficirane stanice (Slika 17 a i d).

Dinamika genske ekspresije svih proučavanih gena bila je jednaka kod stanica inficiranih virusom PUUV i TULV. U ranim satima nakon infekcije (1 – 24 sati n.i.) prisutne su minimalne razlike s obzirom na virulentnost virusa, s razlikom u ekspresiji gena *CCR2* koja je bila statistički značajno niža u stanicama inficiranim virusom TULV u odnosu na stanice inficirane virusom PUUV (Tablica 5).



**Slika 17.** Dinamika promjena u genskoj ekspresiji u ranoj fazi infekcije kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV (*TNF*, *IL1 $\beta$* , *IL6*, *IL1RN*, *CCL4*, *CCL13*, *CXCL8*, *STAT3*, *CCR5*, *CD68*). Za analizu genske ekspresije korišten je qPCR *array*, a za analizu rezultata korišten je internetski portal *GeneGlobe Data Analysis Center*. Za normalizaciju dobivenih rezultata korištena su tri referentna gena. Relativne razine genske ekspresije izračunate su metodom relativne kvantifikacije  $2^{-\Delta C_t}$ . Student-ov t-test korišten je za izračunavanje značajnosti između dvije skupine. (\*) Različito kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u odnosu na neinficirane stanice pri stupnju promjene  $\geq 2$  sa statističkom značajnošću od  $p \leq 0,05$ , različito pri stupnju promjene  $\geq 1 < 2$  sa statističkom značajnošću od  $p \leq 0,05$  i različito pri stupnju promjene  $\geq 2$  bez statističke značajnosti.

**Tablica 3.** Promjene ekspresije gena u primarnim monocitima inficiranim s virusom PUUV u odnosu na neinficirane stanice tijekom vremena

<b>Geni s povećanom ekspresijom</b>												
Kratica gena	1 sat n.i.		6 sati n.i.		24 sata n.i.		48 sati n.i.		5 dana n.i.		7 dana n.i.	
	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*
<i>MRC1</i>	4,23	0,000000	1,52	0,071489	1,99	0,042000	1,84	0,015196			1,27	0,020188
<i>CCL13</i>	2,69	0,001490			2,08	0,036293	3,24	0,037805	2,10	0,023728		
<i>IL1RN</i>	2,60	0,000024	1,22	0,023386								
<i>CXCL8</i>	1,80	0,069511			1,72	0,059008						
<i>CD68</i>	1,23	0,049549									1,19	0,023068
<i>CD40LG</i>			1,34	0,040413								
<i>IL6</i>					4,11	0,102280	3,65	0,071549				
<i>IL1β</i>					2,32	0,076640	2,04	0,077949				
<i>CXCL10</i>							22,68	0,014432	5,68	0,014404	8,37	0,002185
<i>IFITM3</i>							1,99	0,061710	4,94	0,030202	4,23	0,029143
<i>IL27</i>							1,55	0,034696	2,44	0,007005	2,01	0,056706
<i>STAT1</i>							1,49	0,000920	2,11	0,008100	2,10	0,005992
<i>IL37</i>									2,01	0,001262	2,11	0,008239
<b>Geni sa smanjenom ekspresijom</b>												
Kratica gena	1 sat n.i.		6 sati n.i.		24 sata n.i.		48 sati n.i.		5 dana n.i.		7 dana n.i.	
	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*
<i>CCR2</i>	-1,72	0,014078	-1,80	0,058472								
<i>CXCL10</i>	-1,70	0,005537	-2,48	0,040090	-1,92	0,176985						
<i>CXCR4</i>					-1,30	0,013979	-1,18	0,058733	-1,18	0,058733		
<i>CD40LG</i>							-1,24	0,017364				

**Popis kratica:** *CD40LG* = CD40 Ligand; *CD68* = CD68 Molecule; *CCL13* = C-C motif chemokine ligand 13; *CCR2* = C-C Motif Chemokine receptor 2; *CXCL8* = C-X-C motif chemokine ligand 8; *CXCL10* = C-X-C motif chemokine ligand 10; *CXCR4* = C-X-C motif chemokine receptor 4; *IFITM3* = Interferon induced transmembrane protein 3; *IL1β* = Interleukin 1 beta; *IL1RN* = Interleukin 1 receptor antagonist; *IL6* = Interleukin 6; *IL27* = Interleukin 27; *IL37* = Interleukin 37; *MRC1* = Mannose receptor C-type 1; *STAT1* = Signal transducer and activator of transcription 1; **n.i.** = nakon infekcije; **p\*** = statistička značajnost ≤ 0,05

**Tablica 4.** Promjene ekspresije gena u primarnim monocitima inficiranim s virusom TULV u odnosu na neinficirane stanice tijekom vremena

<b>Geni s povećanom ekspresijom</b>												
Kratica gena	1 sat n.i.		6 sati n.i.		24 sata n.i.		48 sati n.i.		5 dana n.i.		7 dana n.i.	
	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*
<i>MRC1</i>	4,76	0,000000	1,34	0,107087	2,66	0,003018	2,76	0,000670			1,43	0,000317
<i>CCL13</i>	4,19	0,000028	2,19	0,025161	3,05	0,019428	2,47	0,013219				
<i>IL1RN</i>	3,20	0,000000										
<i>CXCL8</i>	2,16	0,010115			2,18	0,043353						
<i>TNF</i>	1,39	0,046106										
<i>CD68</i>	1,28	0,011803										
<i>IL6</i>			2,04	0,185080	6,34	0,064657	4,36	0,064049				
<i>IL1β</i>					3,71	0,048215	2,47	0,051779	1,78	0,094029		
<i>IL37</i>					1,81	0,092209			3,13	0,000500	3,34	0,002317
<i>STAT1</i>							1,08	0,030518				
<i>IL27</i>									1,66	0,024944		
<b>Geni sa smanjenom ekspresijom</b>												
Kratica gena	1 sat n.i.		6 sati n.i.		24 sata n.i.		48 sati n.i.		5 dana n.i.		7 dana n.i.	
	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*
<i>CCR2</i>	-2,74	0,000080	-2,42	0,041102								
<i>CXCL10</i>	-1,68	0,006168	-1,89	0,071034	-1,83	0,141305					-4,37	0,030108
<i>CXCR4</i>					-1,38	0,002463	-1,23	0,035963				
<i>CD40LG</i>							-1,23	0,004727				
<i>CCL13</i>											-1,79	0,026010
<i>TNF</i>									-1,17	0,007382	-1,45	0,001810

**Popis kratica:** *CD40LG* = CD40 Ligand; *CD68* = CD68 Molecule; *CCL13* = C-C motif chemokine ligand 13; *CCR2* = C-C motif chemokine receptor 2; *CXCL8* = C-X-C motif chemokine ligand 8; *CXCL10* = C-X-C motif chemokine ligand 10; *CXCR4* = C-X-C motif chemokine receptor 4; *IL1β* = Interleukin 1 beta; *IL1RN* = Interleukin 1 receptor antagonist; *IL6* = Interleukin 6; *IL27* = Interleukin 27; *IL37* = Interleukin 37; *MRC1* = Mannose receptor C-type 1; *STAT1* = Signal transducer and activator of transcription 1; *TNF* = Tumor Necrosis Factor; **n.i.** = nakon infekcije; **p\*** = statistička značajnost ≤ 0,05

**Tablica 5.** Promjene ekspresije gena u primarnim monocitima inficiranim s virusom PUUV u odnosu na primarne monocite inficirane s virusom TULV tijekom vremena

<b>Geni s povećanom ekspresijom</b>												
Kratica gena	1 sat n.i.		6 sati n.i.		24 sata n.i.		48 sati n.i.		5 dana n.i.		7 dana n.i.	
	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*
<i>CCR2</i>	1,59	0,021272										
<i>CXCL10</i>							16,55	0,014571	7,58	0,013277	36,54	0,000256
<i>IFITM3</i>							2,20	0,042718	4,73	0,029626	4,33	0,028065
<i>STAT1</i>							1,38	0,003795	1,98	0,011218	2,44	0,002166
<i>TNF</i>									1,20	0,007858	1,23	0,023210
<i>CCL13</i>											2,13	0,001736
<i>CD68</i>											1,17	0,006915
<i>CCR5</i>											1,21	0,035471
<i>STAT3</i>											1,17	0,049476
<b>Geni sa smanjenom ekspresijom</b>												
Kratica gena	1 sat n.i.		6 sati n.i.		24 sata n.i.		48 sati n.i.		5 dana n.i.		7 dana n.i.	
	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*	Stupanj promjene	p*
<i>IL37</i>									-1,55	0,041056		

**Popis kratica:** **CD68** = CD68 Molecule; **CCL13** = C-C motif chemokine ligand 13; **CCR2** = C-C motif chemokine receptor 2; **CCR5** = C-C motif chemokine receptor 5; **CXCL10** = C-X-C motif chemokine ligand 10; **IFITM3** = Interferon induced transmembrane protein 3; **IL37** = Interleukin 37; **STAT1** = Signal transducer and activator of transcription 1; **STAT3** = Signal transducer and activator of transcription 3; **TNF** = Tumor Necrosis Factor; **n.i.** = nakon infekcije; **p\*** = statistička značajnost  $\leq 0,05$

#### **4.2.2. Kasni imunski odgovor primarnih monocita na infekciju**

U kasnim fazama infekcije (48 sati n.i. – 7 dana n.i.) ortohantavirusi potiču gensku ekspresiju protuupalnih gena citokina, kemokina i gena induciranih virusom te sintezu njihovih solubilnih komponenti u supernatantu u odnosu na neinficirane stanice. Također, u kasnijim fazama infekcije postaju jasno vidljive razlike u ekspresiji gena induciranih virusom, citokina te kemokina u stanicama inficiranih virusom PUUV u odnosu na infekciju virusom TULV, dok su razlike u solubilnim modulatorima biološkog odgovora u supernatantu bile prisutne samo u pojedinim analizama.

##### **4.2.2.1. Koncentracija citokina i kemokina u supernatantu tijekom faze kasnog urođenog imunskog odgovora primarnih monocita**

U kasnim je satima nakon infekcije (48 sati n.i. – 7 dana n.i.) kod stanica inficiranih s virusom PUUV ili TULV prisutan protuupalni fenotip gdje stanice u supernatantu izlučuju visoke koncentracije protuupalnih citokina IL-27, IL-37, CD40L, M-CSF, TGF- $\beta$ 1 i kemokina CXCL10, CCL22 u usporedbi s neinficiranim stanicama (Slika 18). Većina protuupalnih citokina i kemokina dosegla je svoj vrhunac u 48 sati n.i. (TGF- $\beta$ 1 u 7 dana n.i.).

Kod infekcije virusima PUUV i TULV je koncentracija solubilnog protuupalnog liganda CD40L bila statistički značajno povećana u 24, 48 sati n.i. i 5 dana n.i. u odnosu na neinficirane stanice, s vrhuncem u 48 sati n.i. Koncentracije protuupalnih citokina IL-27 i IL-37 su bile statistički značajno povećane većinu vremena od 48 sati n.i. do 7 dana n.i. u odnosu na neinficirane stanice, s vrhuncem u 48 sati n.i., i izraženijom sintezom kod PUUV inficiranih stanica.

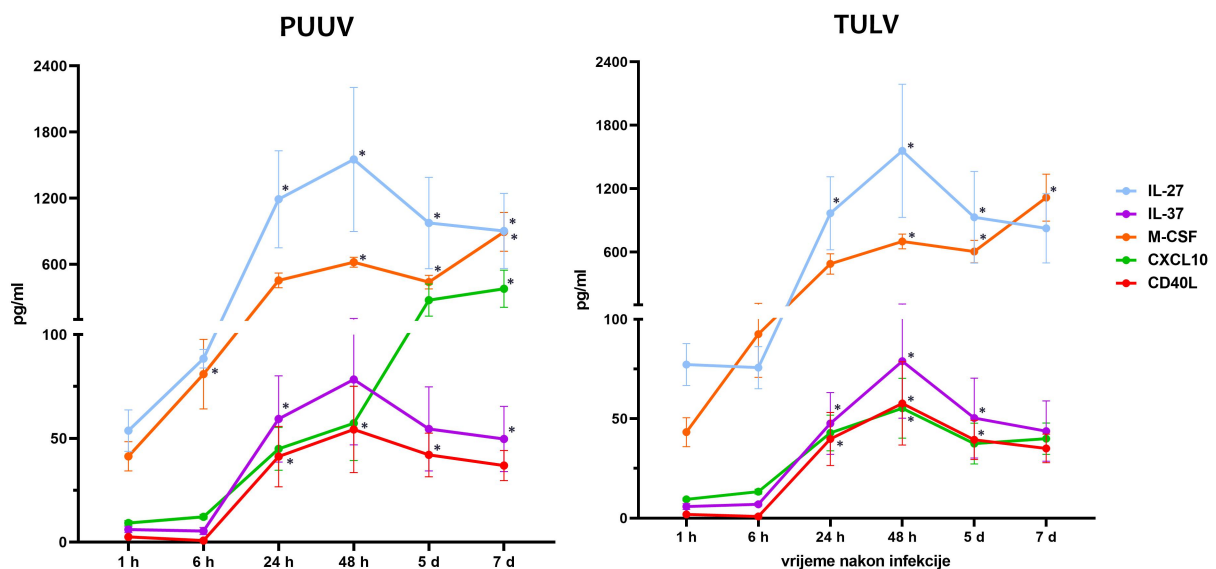
Koncentracija M-CSF pokazala je zanimljivu dvofaznu dinamiku, sa statistički značajnim povećanjem u 6 sati n.i. (samo kod infekcije virusom PUUV) pa onda sa statistički značajnim dosezanjem platoa u 48 sati n.i. i 7 dana n.i. (kod infekcije virusima PUUV i TULV) u odnosu na neinficirane stanice. Koncentracija TGF- $\beta$ 1 bila je tijekom vremena infekcije bez značajnosti prema neinficiranim stanicama, ipak je u 7 dana n.i. dosegla vrhunac sa statistički značajnim povećanjem u odnosu na neinficirane stanice.

Koncentracija CXCL10 je kod infekcije virusom PUUV bila povećana, ali je tek u 7. danu n.i. bio statistički značajno povećane koncentracije u odnosu na neinficirane stanice. Koncentracija CXCL10 je kod infekcije virusom TULV bila statistički značajno povećana samo u 48 sati n.i., s kasnijim smanjenjem u odnosu na neinficirane stanice. Zanimljivo je

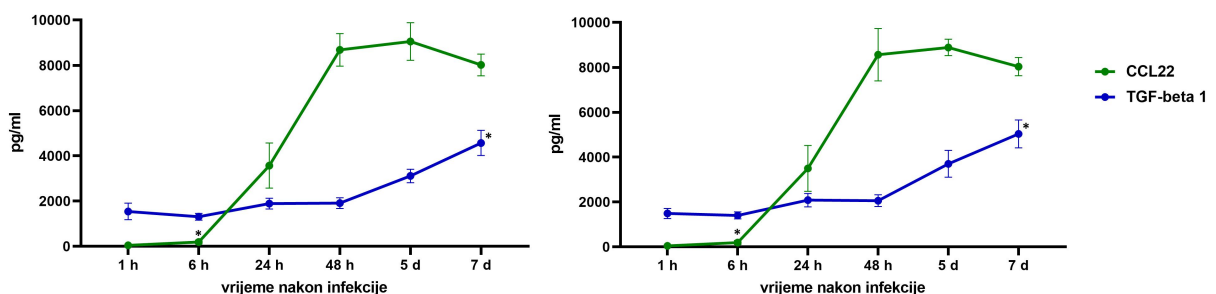
kako je u oba virusa koncentracija CCL22 bila u 6 sati n.i. statistički značajno povećana u odnosu na neinficirane stanice, dok je tek od 48 sati n.i. do 7 dana n.i. postigao maksimum izlučivanja u supernatant, ali tada bez statističke značajnosti.

Kod infekcije monocita virusom TULV kinetika izlučivanja mjerenih citokina i kemokina kao i vrijeme doseganja maksimalnih izmjerenih vrijednosti bila je jednaka kao pri infekciji virusom PUUV (Slika 18), osim kod CXCL10 u 5 i 7 dana n.i. Pri infekciji virusom TULV M-CSF i TGF- $\beta$ 1 su dostizali značajno više koncentracije u odnosu na neinficirane stanice nego što su bilo izmjerene kod infekcije virusom PUUV. Međutim, izlučivanje IL-27 i IL-37 je uvijek bilo izraženije kod stanica zaraženih virusom PUUV.

a)



b)

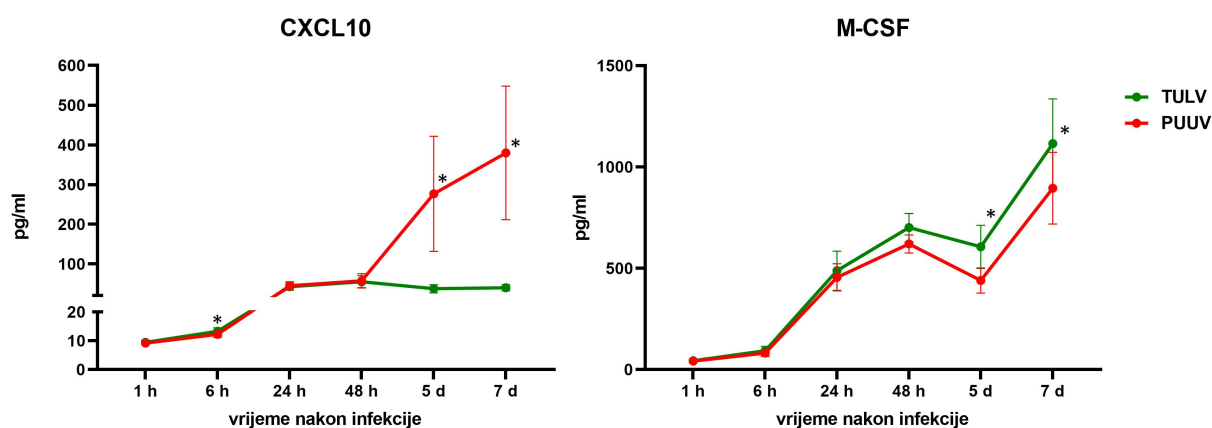


**Slika 18.** Dinamika izlučivanja solubilnih citokina IL-27, IL-37, CD40L, M-CSF, TGF- $\beta$ 1 i kemokina CXCL10, CCL22 u supernatantu u kasnoj fazi infekcije kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV, u naznačenim vremenskim točkama, mjereni su korištenjem pojedinačnih ili višestrukih imunoloških testova pomoću magnetskih mikrokuglica na

analizatoru Luminex 200 System. Za analizu rezultata korišten je program Luminex xPotent software, verzija 3.1. Kvantitativna koncentracija solubilnih citokina i kemokina izračunata je pomoću logističke jednadžbe s 5 parametara (od engl. *Logistic 5P Weighted*), koristeći standardnu krivulju. Rezultati su za svaku vremensku točku izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, od engl. *standard error of mean*) od šest donora odnosno neovisnih eksperimenata mjerenih u duplikatu. Statistička značajnost kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u usporedbi s neinficiranim stanicama izračunata je pomoću Wilcoxon-ovog testa rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću od  $<0,05$  (\*).

U kasnim satima praćenja infekcije u koncentraciji analita u supernatantu nije bilo puno dokazanih razlika između infekcija virusom PUUV i TULV.

Razlike su bile prisutne kod CXCL10 koji je u 6 sati n.i. te u 5 i 7 dana n.i. imao statistički značajno povećanu koncentraciju kod infekcija virusom PUUV u odnosu na infekciju virusom TULV, dok je koncentracija M-CSF bila statistički značajno povećana u 5 i 7 dana n.i. u stanica inficiranih virusom TULV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom PUUV (Slika 19).



**Slika 19.** Dinamika koncentracije proteina CXCL10 i M-CSF u supernatantu u kasnoj fazi infekcije kod stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV, u naznačenim vremenskim točkama, mjereni su korištenjem pojedinačnih ili višestrukih imunoloških testova pomoću magnetskih mikrokuglica na analizatoru Luminex 200 System. Za analizu rezultata korišten je program Luminex xPotent software, verzija 3.1. Kvantitativna koncentracija solubilnih citokina i kemokina izračunata je pomoću logističke jednadžbe s 5 parametara (od engl. *Logistic 5P Weighted*), koristeći standardnu krivulju.



Rezultati su za svaku vremensku točku izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, od engl. *standard error of mean*) od šest donora odnosno neovisnih eksperimenata mjerenih u duplikatu. Statistička značajnost između stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV izračunata je pomoću Wilcoxon-ovog testa rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću od  $<0,05$  (\*).

#### **4.2.2.2. Promjene u genskoj ekspresiji tijekom faze kasnog urođenog imunskog odgovora primarnih monocita**

Rezultati su pokazali kako u kasnim fazama infekcije ortohantavirusi potiču ekspresiju nekih protuupalnih gena citokina, kemokina i gena induciranih virusom u odnosu na neinficirane stanice, dok je ekspresija proupalnih gena značajno smanjena (Tablice 3 i 4).

U kasnim satima (48 sati n.i. – 7 dana n.i.) praćenja infekcije virusom PUUV promjene u ekspresiji pokazalo je ukupno sedam gena od kojih su *IL27*, *IL37*, *CXCL10*, *CD68*, *IFITM3*, *STAT1* imali statistički značajno povećanu ekspresiju u odnosu na neinficirane stanice, dok je *CD40LG* u 48 sati n.i. imao statistički značajno smanjenu ekspresiju u odnosu na neinficirane stanice (Tablica 3, Slika 20).

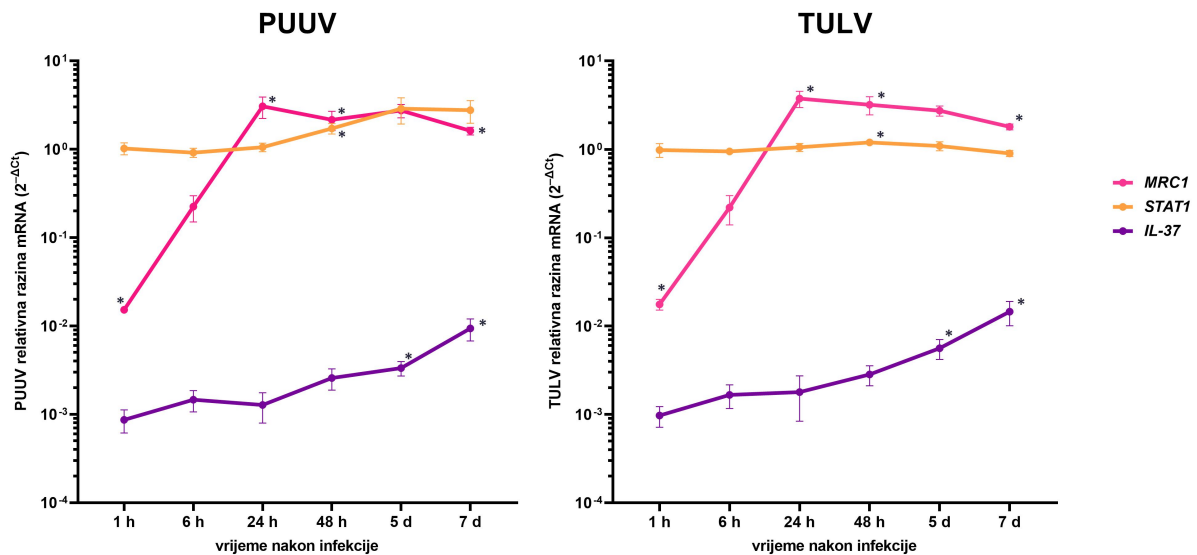
Gen *CXCL10* imao je najjače izražene promjene u ekspresiji sa zanimljivom dvofaznom dinamikom. Ekspresija je u 1 i 6 sati n.i. bila statistički značajno smanjena u odnosu na neinficirane stanice s minimumom ekspresije u 24 sata n.i., dok je od 48 sati n.i. do 7 dana n.i. bila prisutna statistički značajno povećana ekspresija u odnosu na neinficirane stanice.

Geni induciranih virusom *STAT1* i *IFITM3* koji se inače, potaknuti interferonom, javljaju rano nakon ulaska virusa u stanice su kod infekcije virusom PUUV imali statistički značajno povećanu ekspresiju tek u 48 sati do 7 dana n.i. odnosno u 5 i 7 dana n.i. Pretpostavljamo kako infekcija virusom PUUV u monocitima suprimira put interferona, dok je u stanicama MDM taj signalni put ipak induciran. Za gen *STAT3* nije bilo razlike u genskoj ekspresiji u odnosu na neinficirane stanice.

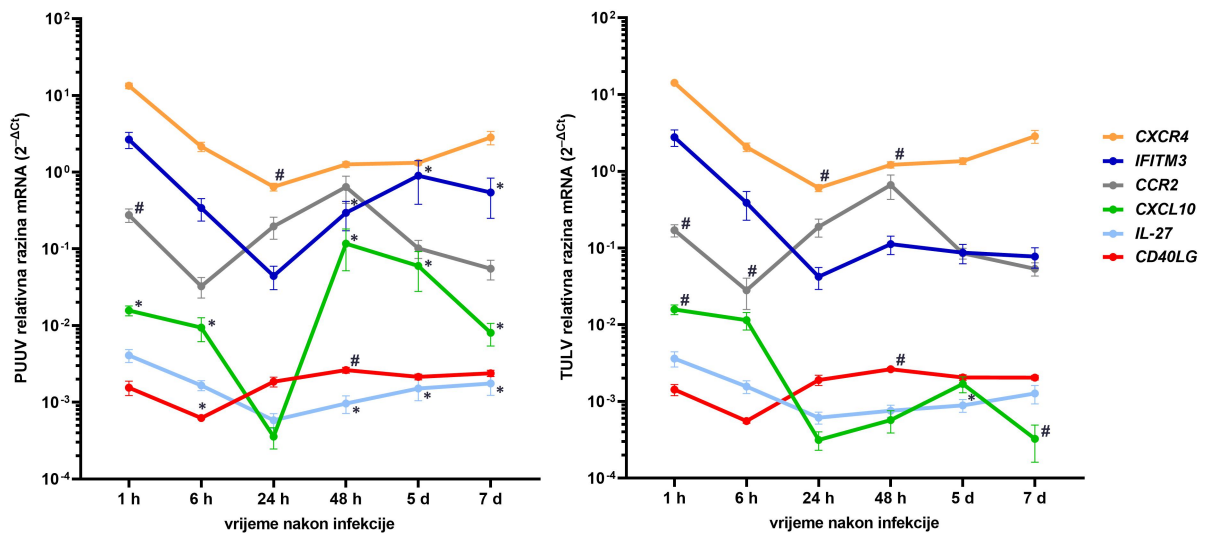
U kasnim satima nakon infekcije virusom TULV samo su geni *IL27*, *IL37* i *STAT1* imali statistički značajno povećanu ekspresiju u odnosu na neinficirane stanice, dok su proupalni geni *TNF*, *CCL13*, *CXCL10* i *CD40LG* imali statistički značajno smanjenu ekspresiju u odnosu na neinficirane stanice (Tablica 4, Slika 20). Kod stanica inficiranih virusom TULV

su geni za *IFITM3* i *STAT3* bili cijelo vrijeme bez promjene u ekspresiji u odnosu na neinficirane stanice.

a)



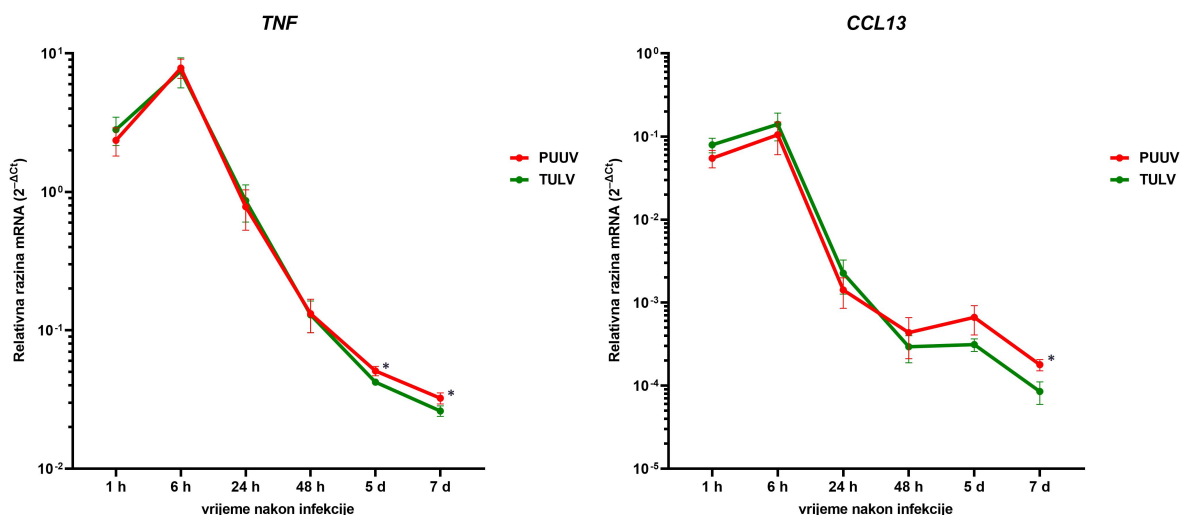
b)



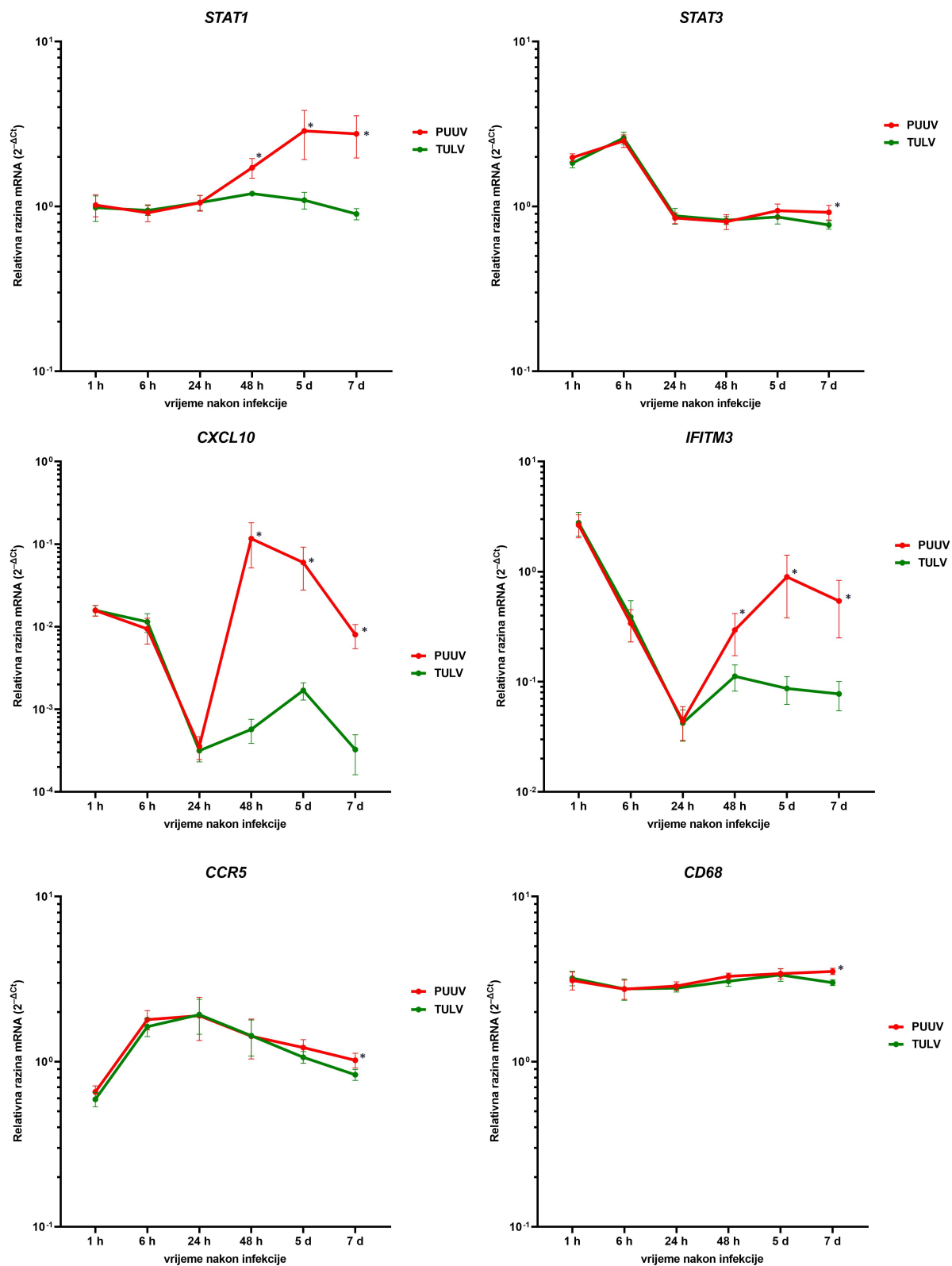
**Slika 20.** Dinamika promjene genske ekspresije u kasnoj fazi infekcije kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV (*CCR2*, *CD40LG*, *CXCL10*, *CXCR4*, *IFITM3*, *IL27*, *IL37*, *MRC1*, *STAT1*). Za analizu genske ekspresije korišten je qPCR array, a za analizu rezultata korišten je internetski portal *GeneGlobe Data Analysis Center*. Za normalizaciju dobivenih rezultata korištena su tri referentna gena. Relativne razine genske ekspresije izračunate su metodom relativne kvantifikacije  $2^{-\Delta C_t}$ . Student-ov t-test korišten je za izračunavanje značajnosti između dvije skupine. (\*) Različito kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u odnosu na

neinficirane stanice pri stupnju promjene  $\geq 2$  sa statističkom značajnošću od  $p \leq 0,05$ , različito pri stupnju promjene  $\geq 1 < 2$  sa statističkom značajnošću od  $p \leq 0,05$  i različito pri stupnju promjene  $\geq 2$  bez statističke značajnosti.

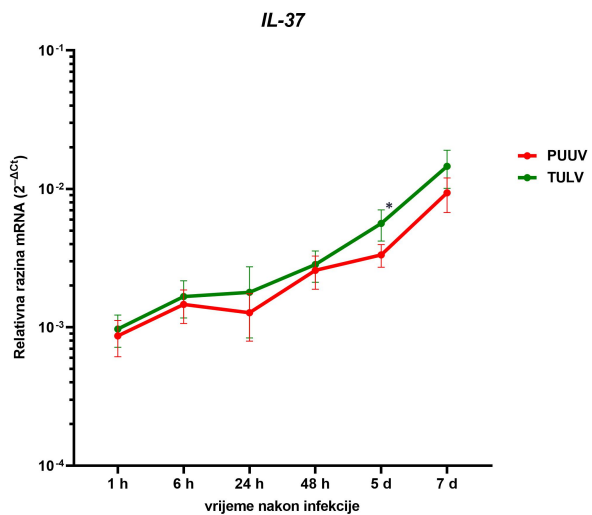
U kasnim satima praćenja infekcije (48 sati do 7 dana n.i.) prisutne su najočitije razlike između stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV, u devet gena (Tablica 5, Slika 21). Ekspresija osam analiziranih gena (*TNF*, *IFITM3*, *STAT1*, *CXCL10*, *CCL13*, *CD68*, *CCR*, *STAT3*) bila je statistički značajno povećana kod stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV, samo je gen *IL37* bio statistički značajno smanjen kod infekcije virusom PUUV u odnosu na infekciju virusom TULV. Gen *CXCL10* pokazao je najveće razlike i imao najveću promjenu ekspresije. Geni *CCL13*, *CD68*, *CCR5* i *STAT3* imali su samo u 7 dana n.i. statistički značajno povećanu ekspresiju kod infekcije virusom PUUV u odnosu na infekciju virusom TULV.



**Slika 21.** Usporedba promjene ekspresije devet gena koji su statistički značajno povećani kod stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV: geni za citokine i kemokine (*TNF*, *IL37*, *CCL13*, *CXCL10*); geni za receptore (*CCR5*, *CD68*); geni inducirani virusom (*IFITM3*, *STAT1*, *STAT3*). Za analizu genske ekspresije korišten je qPCR array, a za analizu rezultata korišten je internetski portal *GeneGlobe Data Analysis Center*. Za normalizaciju dobivenih rezultata korištena su tri referentna gena. Relativne razine genske ekspresije izračunate su metodom relativne kvantifikacije  $2^{-\Delta C_t}$ . Student-ov t-test korišten je za izračunavanje značajnosti između dvije skupine. (\*) Različito kod stanica inficiranih virusom



**Slika 21. nastavak** PUUV u odnosu na stanice inficirane virusom TULV pri stupnju promjene  $\geq 2$  sa statističkom značajnošću od  $p \leq 0,05$ , različito pri stupnju promjene  $\geq 1 < 2$  sa statističkom značajnošću od  $p \leq 0,05$  i različito pri stupnju promjene  $\geq 2$  bez statističke značajnosti.



**Slika 21. nastavak**

### **4.3. Diferencijacija monocita kao odgovor na infekciju patogenim ili apatogenim ortohantavirusom**

Monociti imaju multifunkcionalnu ulogu u organizmu, primarno u homeostazi i upali, u fagocitiranju svih čestica sa svojstvima antigena (npr. virusi, bakterije), ali i u predočavanju antigena drugim stanicama urođene i stečene imunosti. Monociti se u krvotoku se zadržavaju oko jedan do četiri dana te pod utjecajem faktora upale dio prelazi u tkiva gdje se daljnjom diferencijacijom polariziraju u heterogene efektorske stanice MDM ili MDCC. Dugotrajnom kultivacijom primarnih monocita, kroz sadam dana, s patogenim ili apatogenim ortohantavirusom željeli smo utvrditi ponašanje monocita uslijed infekcije te smjer diferencijacije i aktivacije, kao i analizirati razlikuje li se smjer diferencijacije pri infekciji patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom.

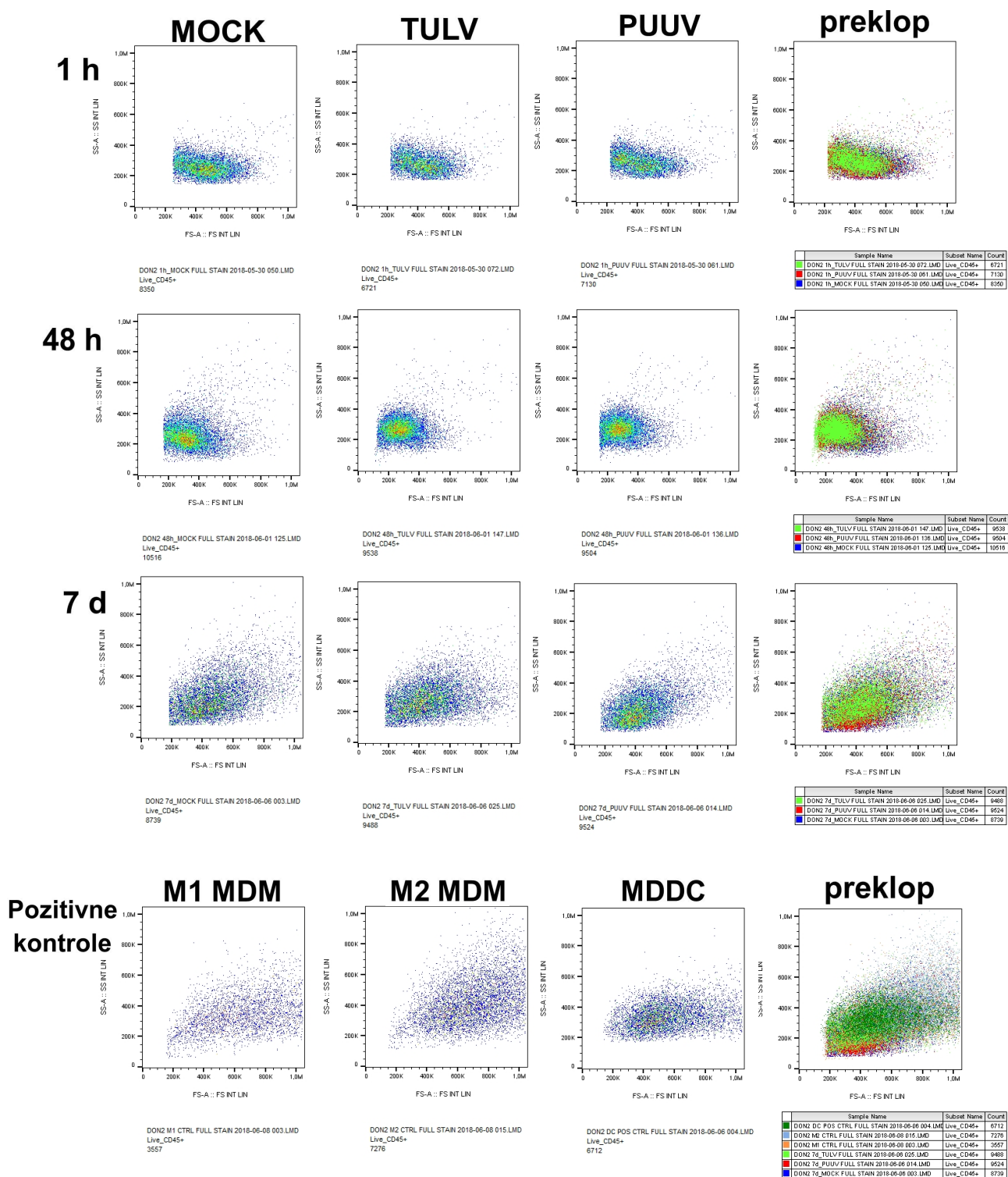
#### **4.3.1. Multiparametrijska imunofenotipizacija monocita/makrofaga metodom protočne citometrije za određivanje ekspresije staničnih površinskih molekula**

Na površini monocita i stanica MDM/MDCC metodom protočne citometrije analizirana je ekspresija osam staničnih molekula/receptora koje su važne za identifikaciju i aktivaciju monocita, makrofaga i DC te njihovu interakciju s drugim stanicama urođene i stečene imunosti kao i diferencijaciju prema stanicama MDM sličnih tipu M1 ili M2 odnosno stanicama MDCC: CD14, CD16, CD40, CD45, CD163, CD206, CD209, HLA-DR.

#### **4.3.1.1. Morfologija monocita tijekom praćenja infekcije**

Metodom protočne citometrije istražena je morfologija monocita koji su nakon infekcije s virusima PUUV ili TULV praćeni tijekom sedam dana (u tri vremenske točke od 1 sat n.i., 48 sati n.i. i 7 dana n.i.), kod sedam donora odnosno neovisnih eksperimenata. Koristili smo osam površinskih molekula/receptora (CD14, CD16, CD40, CD45, CD163, CD206, CD209, HLA-DR) koje su važne za identifikaciju i aktivaciju monocita, makrofaga i DC te njihovu interakciju s drugim stanicama urođene i stečene imunosti kao i diferencijaciju prema stanicama MDM ili stanicama MDDC te boju za vijabilnost stanica.

U programu za analizu podataka protočne citometrije FlowJo je na točkastom prikazu odabrana populacija živih CD45<sup>+</sup> stanica („LiveCD45+“) te su očitane vrijednosti rasapa svjetlosti prema naprijed (FSC) i bočnog rasapa svjetlosti (SSC) uspoređujući stanice inficirane s virusima PUUV ili TULV te neinficirane stanice. Stanice su tijekom infekcije/kultivacije od sedam dana promijenile izgled s obzirom na veličinu i granuliranost. Morfološki je u 1. satu n.i. bilo malih razlika između inficiranih i neinficiranih stanica, a velikih razlika u 48 sati n.i. i 7 dana n.i. gdje su inficirane stanice bile veće i imale veću granuliranost, u odnosu na neinficirane stanice (Slika 22). Stanice inficirane virusom TULV bile su najveće te s najvećom granuliranošću (Slika 22).

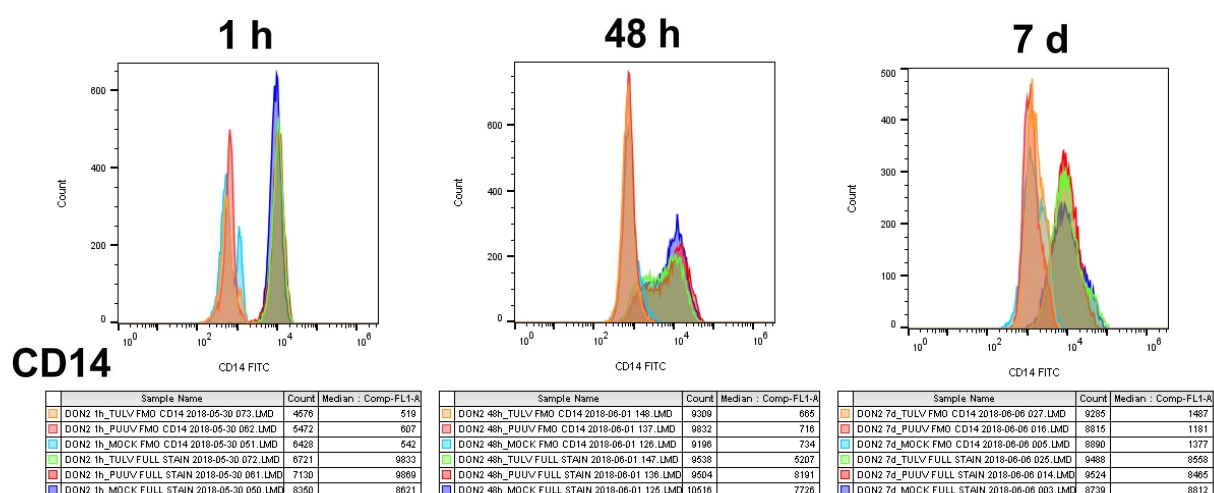


**Slika 22.** Dvoparametarski (FSC/SSC) točkasti prikaz morfologije monocita inficiranih s virusom PUUV ili virusom TULV, neinficiranih stanica (MOCK), preklopa točkastog prikaza (PUUV+TULV+MOCK), praćenih u tri vremenske točke (1 sat, 48 sati i 7 dana nakon infekcije) te pozitivnih kontrola (M1 MDM, M2 MDM, MDDC) praćenih 7 dana, analiziran metodom protočne citometrije. Za analizu rezultata korišten je program FlowJo, verzija 10.7.1. Na slici je prikazan jedan od sedam donora.

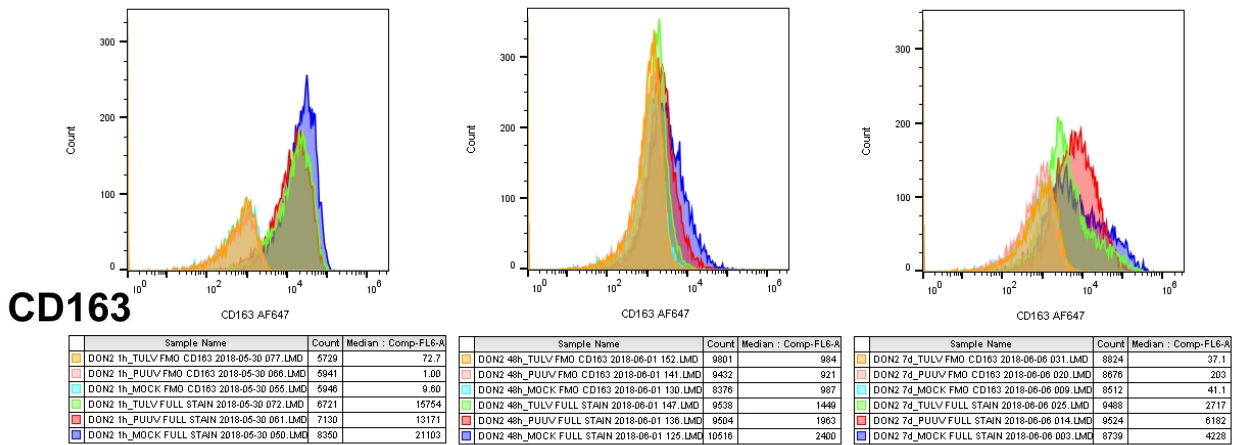
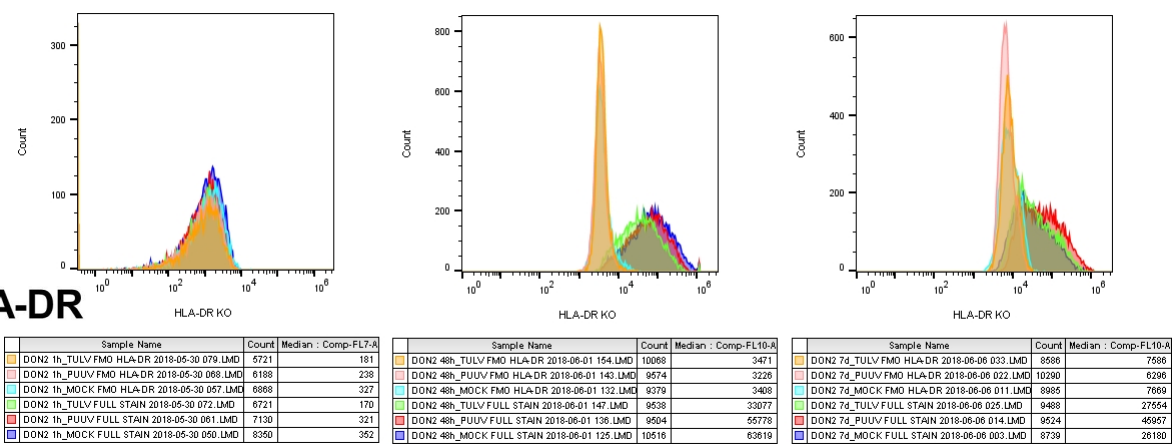
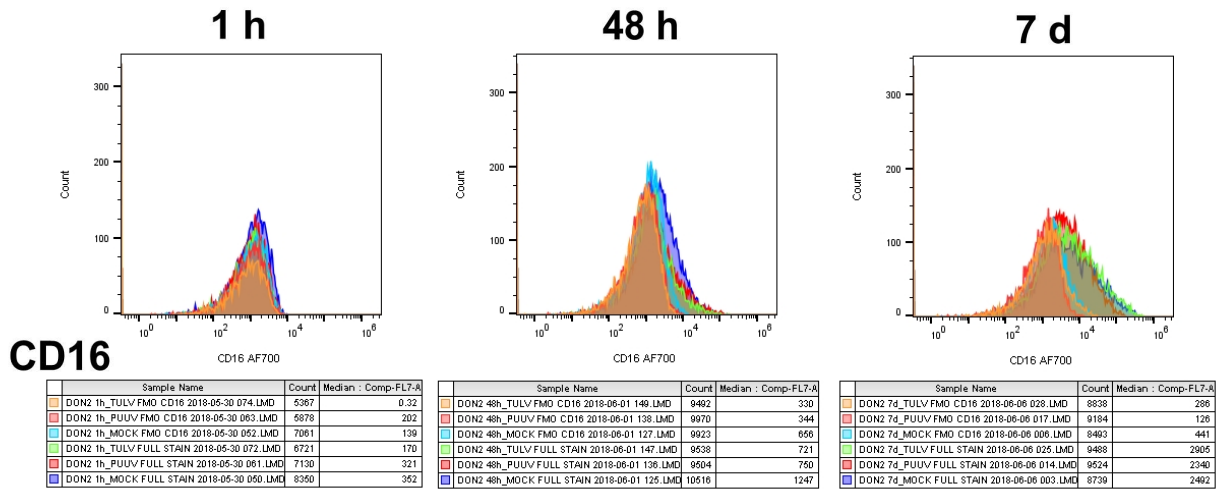


### 4.3.1.2. Ekspresija staničnih površinskih molekula monocita, makrofaga i dendritičkih stanica

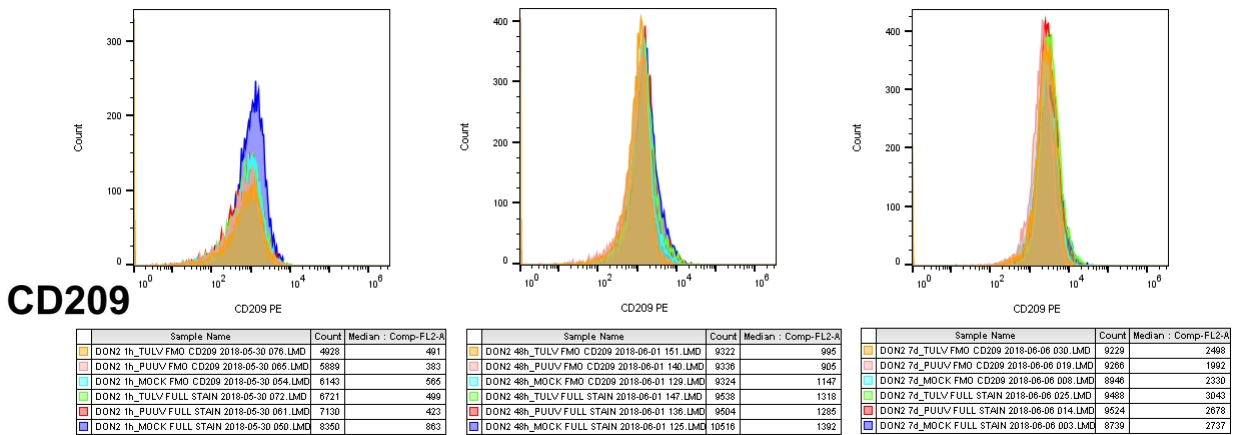
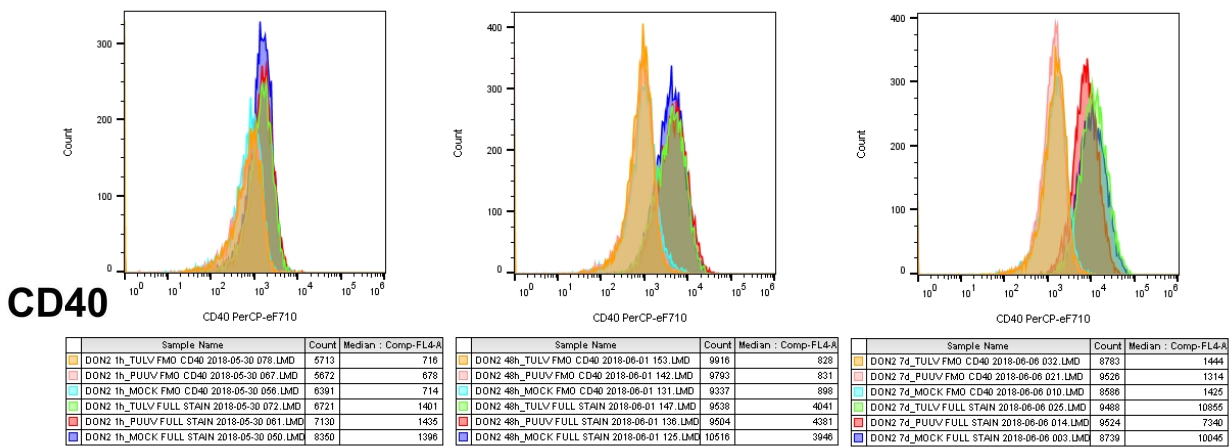
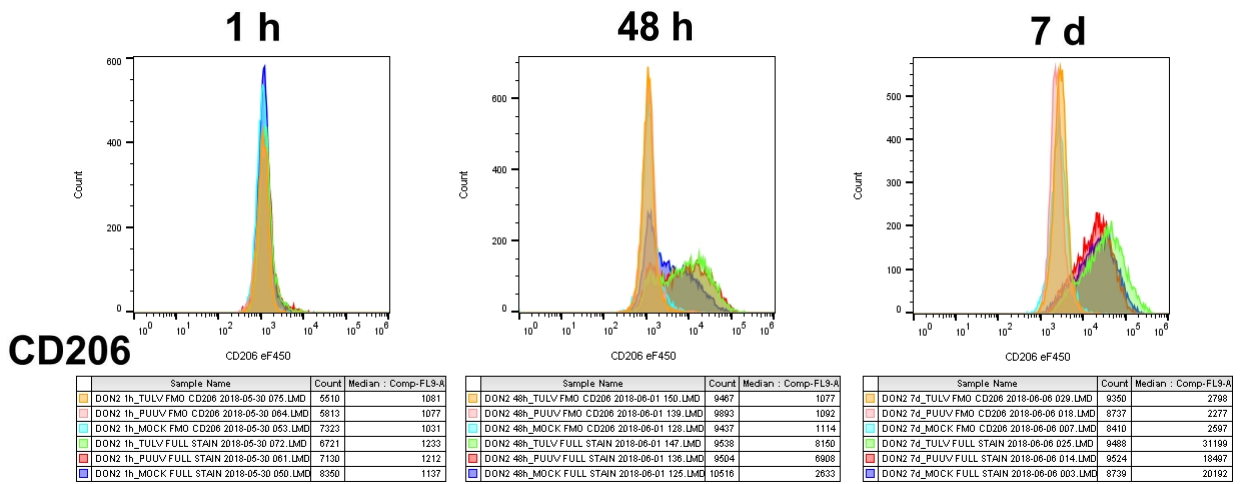
Ekspresija površinskih molekula na stanicama analizirana je metodom protočne citometrije s mjerenjem medijana intenziteta fluorescencije (MFI) specifičnih protutijela (Slika 23) i izražena je kao indeks obojenja (Slika 24). Eksperimenti infekcija napravljeni su od sedam različitih donora te su praćeni u tri vremenske točke nakon infekcije (1 sat n.i., 48 sati n.i. i 7 dana n.i.). Za svakog donora napravljene su istovremeno i njegove pozitivne kontrole diferencijacije monocita u MDM i MDCC (stimulacija M-SCF-om ili GM-SCF-om te aktivacija s IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 ili GM-SCF+IL-4). Odlučila sam se za pozitivne biološke kontrole svakog donora kako bih mogla dokazati kako izgleda signal kada je antigen od interesa maksimalno eksprimiran kod svakog donora s obzirom na interindividualnu varijabilnost. Indeks obojenja izračunat je za svakog od sedam donora, za svaki parametar, vremensku točku, inficirane, neinficirane stanice, kao i pozitivne biološke kontrole.



**Slika 23.** Ekspresija površinskih molekula na stanica inficiranih virusom PUUV (crveno) ili TULV (zeleno) te neinficiranih stanica (plavo) obojanih potpunim panelom protutijela te pripadnih kontrola FMO kojima nedostaje jedno protutijelo iz panela (svjetlo plavo, svjetlo crveno i narnčasto), analizirana je metodom protočne citometrije. Za analizu rezultata korišten je program FlowJo, verzija 10.7.1. Relativna količina površinskih molekula određena je mjerenjem medijana intenziteta fluorescencije (Median: Comp FL). U legendi ispod hisograma navedeno je ime uzorka, broj skupljenih „događaja“ (od engl. *events*) za populaciju živih stanica CD45+ te medijana intenziteta fluorescencije na tom fluorescentnom kanalu.



Slika 23. nastavak

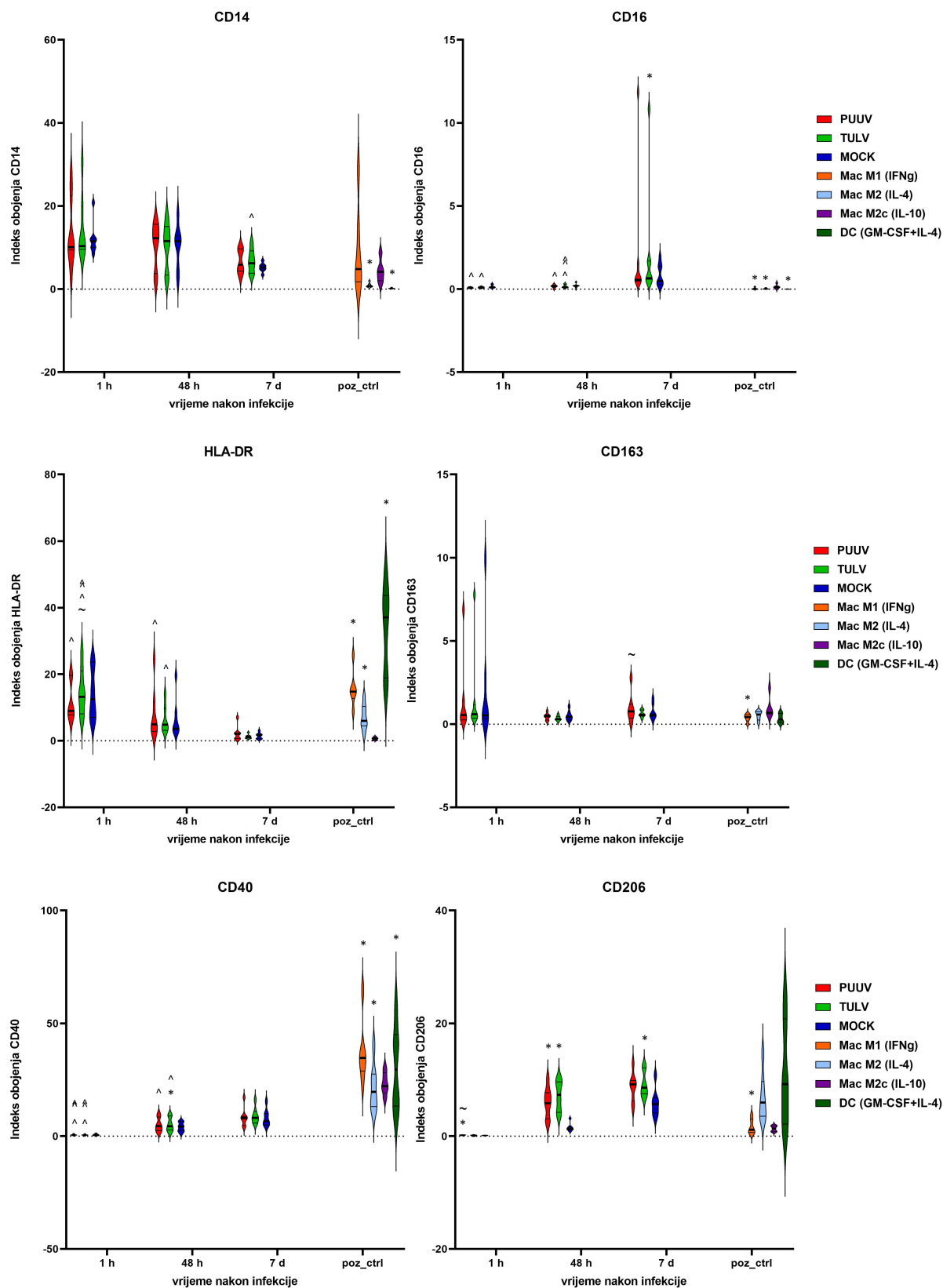


Slika 23. nastavak

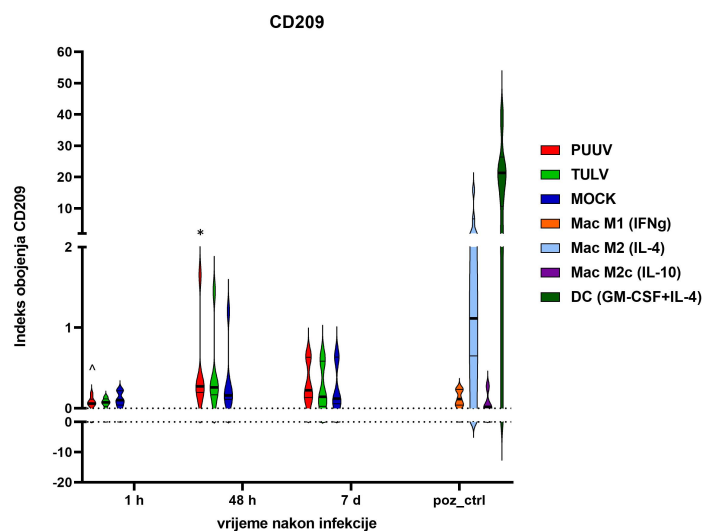
Rezultati su pokazali kako je kod stanica inficiranih virusom PUUV (Slika 24) u svim vremenskim točkama vidljivo smanjenje monocitnih markera CD14 i HLA-DR u odnosu na neinficirane stanice iako statistički nije bilo značajno. Istovremeno je vidljivo povećanje ekspresije molekule CD16 u 48 sati n.i. i 7 dana n.i., ali također bez statističke značajnosti u odnosu na neinficirane stanice. Ekspresija molekule CD40 (specifične za stanice M1 MDM) bila je u svim vremenskim točkama povećana u odnosu na neinficirane stanice, ali bez statističke značajnosti. Ekspresija molekule CD206 (specifične za stanice M2 MDM) bila je u svim vremenskim točkama povećana u usporedbi s neinficiranim stanicama, sa statistički značajnim povećanjem u 1. satu n.i. i u 48 sati n.i. u odnosu na neinficirane stanice. Ekspresija molekule CD163 (specifične za stanice M2c MDM) bila je u svim vremenskim točkama niska te se nije razlikovala u usporedbi s neinficiranim stanicama. Ekspresija molekule CD209 (specifične za stanice MDDC) bila je u 48 sati n.i. statistički značajno povećana u odnosu na neinficirane stanice.

Rezultati su pokazali kako je kod stanica inficiranih virusom TULV (Slika 24) u svim vremenskim točkama vidljivo smanjenje monocitnih markera CD14 i HLA-DR u odnosu na neinficirane stanice iako bez statističke značajnosti. Istovremeno je vidljivo povećanje ekspresije molekule CD16 u 48 sati n.i. bez statističke značajnosti te statistički značajno povećanje u 7. danu n.i. u odnosu na neinficirane stanice. Ekspresija molekule CD40 bila je također, u svim vremenskim točkama povećana, ali samo u 48 sati n.i. sa statističkom značajnošću u odnosu na neinficirane stanice. Ekspresija molekule CD206 bila je u 48 sati n.i. i 7. danu n.i. statistički značajno povećana u odnosu na neinficirane stanice. Ekspresija molekule CD163 bila je u svim vremenskim točkama niska te se nije razlikovala u usporedbi s neinficiranim stanicama. Ekspresija CD209 nije se razlikovala u odnosu prema neinficiranim stanicama.

U ekspresiji površinskih markera bilo je malo razlika između stanica inficiranih patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom (Slika 24). Ekspresija molekule CD206 bila je u 1. satu n.i. značajno povećana, dok je ekspresija molekule CD163 bila je u 7. danu n.i. značajno povećana, kod stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV.



**Slika 24.** Razina ekspresije staničnih površinskih molekula specifičnih za lozu (monociti, makrofagi/MDM i DC/MDDC) kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV te neinficiranih stanica korištenjem protočne citometrije. Za analizu rezultata korišten je



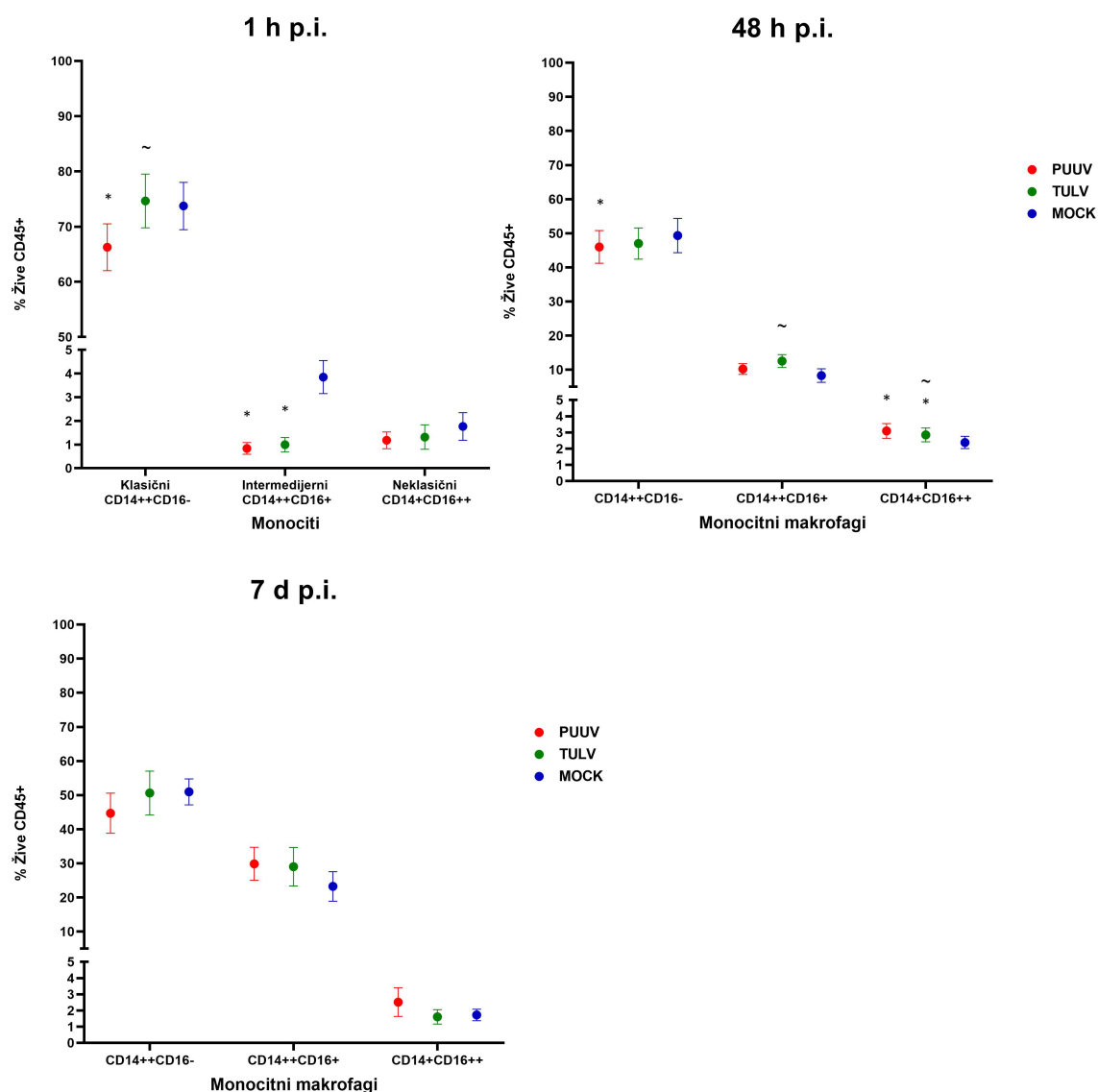
**Slika 24. nastavak** program FlowJo, verzija 10.7.1. Relativna količina površinskih markera na stanicama određena je mjerenjem medijana intenziteta fluorescencije specifičnih protutijela (MFI) te izražena kao indeks obojenja (od engl. *stain index*). „Violinski“ grafikoni predstavljaju indeks obojenja površinskih markera, od sedam neovisnih eksperimenata. Deblja crta unutar „violinskog“ grafikona je medijan podataka, dok su tanke crte kvartili. Statistička značajnost izračunata je korištenjem Wilcoxon-ovog testa rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću od  $<0,05$  (\* razlika stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u odnosu na neinficirane stanice; ~ razlika između stanica inficiranih virusom PUUV i TULV; ^ razlika između stanica inficiranih virusom PUUV u 1 i 48 sati n.i. i 7 dana n.i.; ili između stanica inficiranih virusom TULV u 1 i 48 sati n.i. i 7 dana n.i.).

#### **4.3.1.3. Postotak površinske ekspresije molekula/biljega CD14 i CD16 na membrani inficiranih monocita i stanica MDM/MDDC**

Kod infekcije virusom PUUV u 1. satu n.i. je postotak klasičnih i intermedijernih monocita bio statistički značajno smanjen u odnosu na neinficirane stanice, dok kod neklasičnih nije bilo razlike u odnosu na neinficirane stanice (Slika 25). U 48. satu n.i. je postotak subpopulacije  $CD14^{++}CD16^{-}$  bio statistički značajno smanjen u odnosu na neinficirane stanice, dok je postotak subpopulacije  $CD14^{+}CD16^{++}$  bio statistički značajno povećan u odnosu na neinficirane stanice, a postotak subpopulacije  $CD14^{++}CD16^{+}$  nije se razlikovao prema neinficiranim stanicama. Zanimljivo je kako se u 7. danu n.i. postotak subpopulacija nije razlikovao prema neinficiranim stanicama, s obzirom na diferencijaciju stanica tokom proteka vremena kultivacije.

Kod infekcije virusom TULV u 1. satu n.i. je postotak samo intermedijernih monocita bio statistički značajno smanjen u odnosu na neinficirane stanice, dok kod klasičnih i neklasičnih nije bilo razlike u odnosu na neinficirane stanice (Slika 25). U 48 sati n.i. je postotak subpopulacije  $CD14^{+}CD16^{++}$  bio statistički značajno povećan u odnosu na neinficirane stanice, a postotci subpopulacija  $CD14^{++}CD16^{-}$  i  $CD14^{++}CD16^{+}$  nisu se razlikovali prema neinficiranim stanicama. Zanimljivo je kako se u 7. danu n.i. postotak subpopulacija stanica nije razlikovao prema neinficiranim stanicama.

Kod stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV, u 1. satu n.i. je zabilježeno statistički značajno smanjenje postotka klasičnih monocita kod monocita inficiranih virusom PUUV (Slika 24). U 48 sati n.i. je postotak subpopulacije  $CD14^{++}CD16^{+}$  statistički značajno smanjen kod infekcije virusom PUUV, dok je postotak subpopulacije  $CD14^{+}CD16^{++}$  bio statistički značajno povećan kod infekcije virusom PUUV.



**Slika 25.** Postotak površinske ekspresije molekula CD14 i CD16 na inficiranim monocitima i stanicama MDM/MDDC tokom vremena infekcije. Rezultati su za svaku vremensku točku izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, od engl. *standard error of mean*) u sedam donora odnosno neovisnih eksperimenata. Statistička značajnost izračunata je pomoću Wilcoxon-ovog testa rangova s podudarnim parovima s dvostranom točnom p-vrijednošću od  $<0,05$  (\* razlika prema neinficiranim stanicama; ~ razlika između infekcije virusom PUUV i TULV).



#### 4.4.2. Diferencijacija monocita i promjene u genskoj ekspresiji

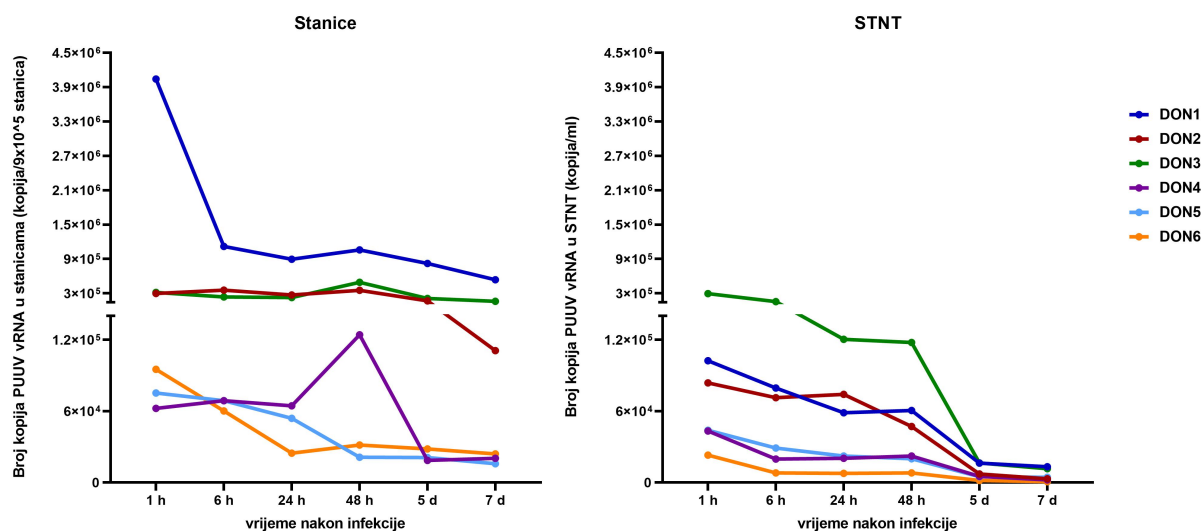
Jedan od ciljeva bio je istraživanje diferencijacije i aktivacije inficiranih monocita u kasnijim vremenskim točkama nakon infekcije (48 sati n.i. – 7 dana n.i.) te analiza diferencijacije pri infekciji patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom. Analizirali smo gensku ekspresiju receptora te transkripcijskih faktora *CD68*, *MRC1*, *CXCR4*, *IFITM3*, *STAT1* i *STAT3* (Slike 20 i 21) korištenjem metode qPCR *array*, a za analizu rezultata korišten je internetski portal GeneGlobe Data Analysis Center. Rezultati su pokazali kako u ranim kao i u kasnim fazama infekcije ortohantavirusi potiču diferencijaciju te gensku ekspresiju *MRC1*, *CD68*, *STAT1*. Kod stanica inficiranih virusom PUUV i TULV je genska ekspresija *MRC1* bila značajno povećana u odnosu na neinficirane stanice u skoro svim vremenskim točkama. Ekspresija gena *CD68*, koji je monocitni i makrofagni marker povezan s prezentacijom antigena, je kod infekcije virusom PUUV bila značajno povećana u odnosu na neinficirane stanice na početku u 1. satu n.i. te u na kraju mjerenja u 7. danu n.i., dok je kod infekcije virusom TULV bila značajno povećan u odnosu na neinficirane stanice samo na kraju mjerenja u 7. danu n.i. Gen *STAT1* je uz to što je interferonom aktivirani gen, također i marker polarizacije makrofaga. Ekspresija gena *STAT1* je kod infekcije virusom TULV bila značajno povećan samo u 48 sati n.i., dok je kod infekcije virusom PUUV ekspresija bila značajno povećana od 48 sati do 7 dana n.i. Ekspresija gena *STAT3* nije se razlikovala prema neinficiranim stanicama, nego samo između virusa u 7. danu n.i. gdje je bio značajno povećan kod infekcije virusom PUUV u odnosu na infekciju virusom TULV. Ekspresija receptora *CXCR4* bila je statistički značajno smanjena u 24 sata n.i. kod infekciju virusom PUUV te u 24 i 48 sati n.i. kod infekciju virusom TULV u odnosu na neinficirane stanice.

#### 4.4. Individualni odgovor donora na infekciju patogenim ili apatogenim ortohantavirusom

Analizom rezultata primijetili smo individualni odgovor donora na infekciju ili kultivaciju za određene solubilne analite i gensku ekspresiju, s razdvajanjem u dvije grupe po tri donora kod infekcije virusom PUUV ili TULV i kod neinficiranih stanica (Slike 27 i 28). Također, kod infekcija virusom PUUV individualne razlike su primijećene u različitoj količini broja kopija virusnih RNA u supernatantu i u stanicama (Slika 26).

##### 4.4.1. Individualni razlike donora u viremiji

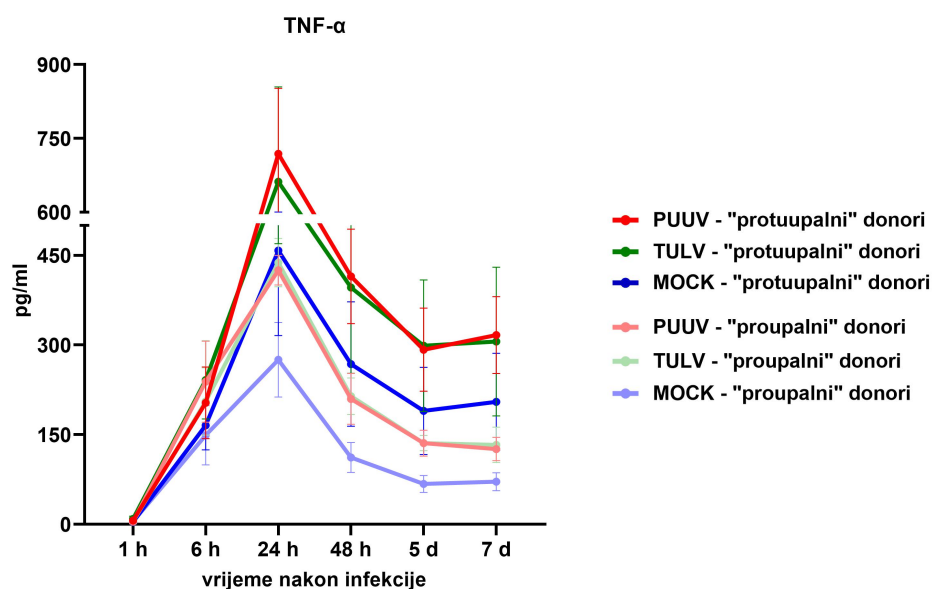
Kod infekcija s virusom PUUV primijetili smo razdvajanje u dvije grupe po tri donora s obzirom na različitu količinu kopija virusnih RNA u supernatantu i u stanicama. Tri tzv. „proupalna“ donora imala su niski broj kopija virusnih RNA u supernatantu i u stanicama. Ostali, tzv. „protuupalna“ donora imala su visoki broj kopija virusnih RNA u supernatantu i u stanicama (Slika 25). Razlike između „proupalnih“ i „protuupalnih“ donora nisu bile statistički značajne vjerojatno zbog malo uzorka (od tri donora po grupi).



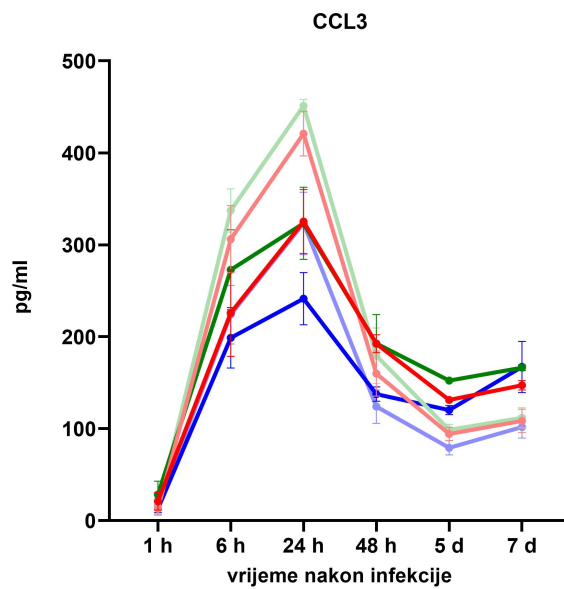
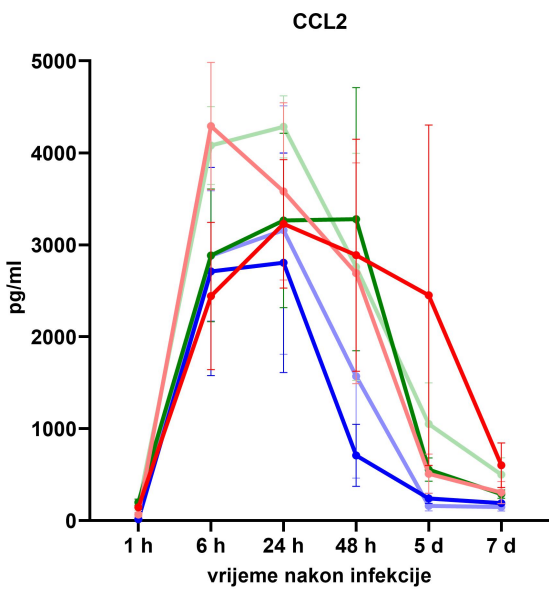
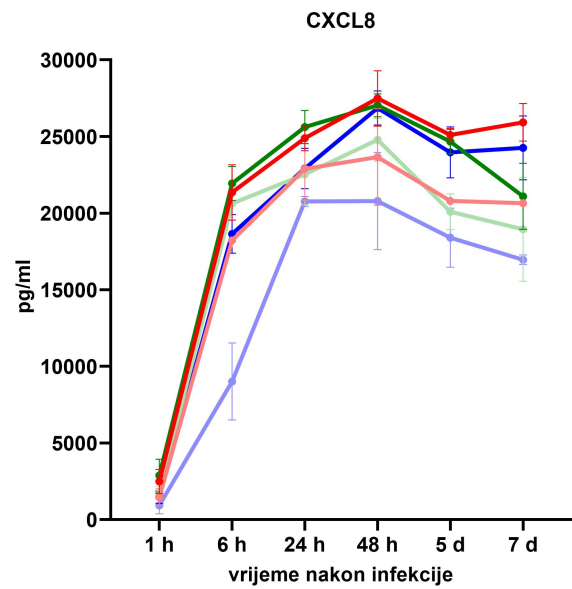
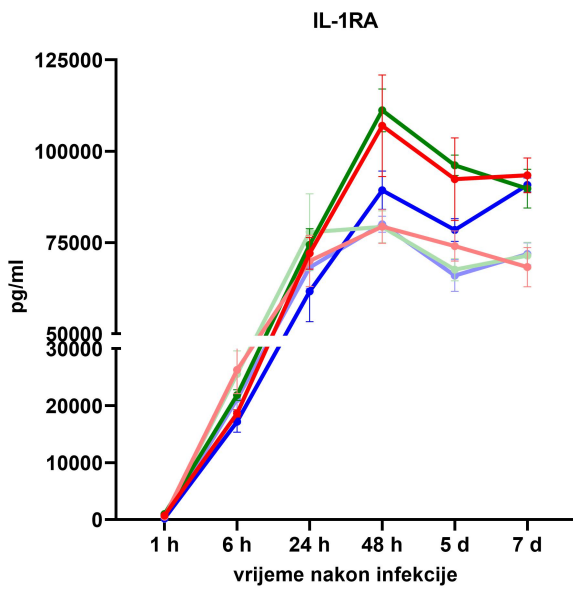
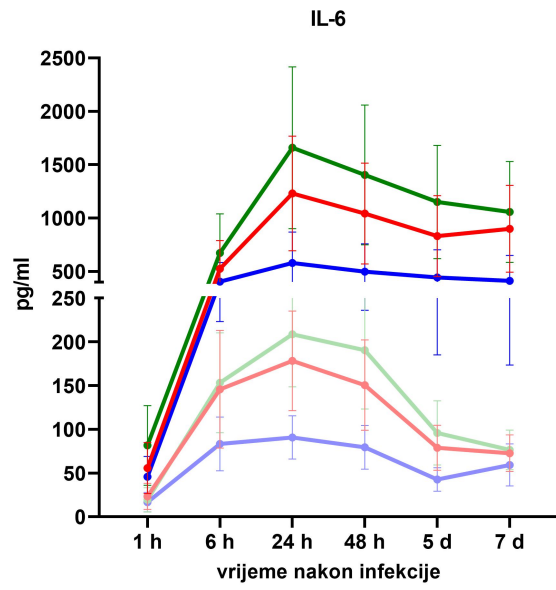
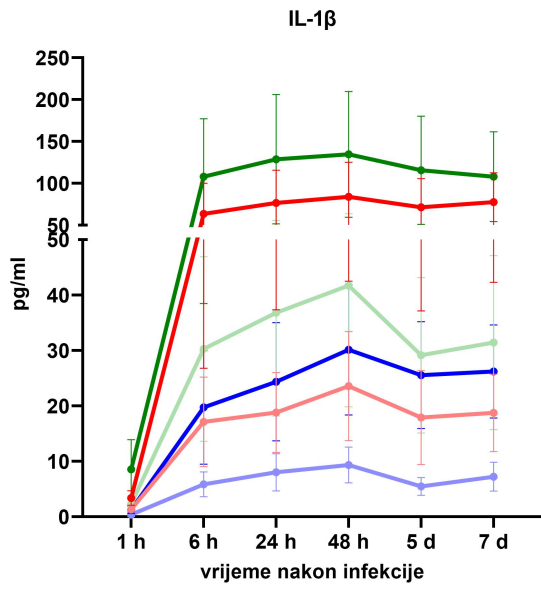
**Slika 26.** Individualni odgovor donora na infekciju virusom PUUV, s prikazom broj kopija virusne RNA S segmenta u stanicama i supernatantu inficiranih stanica, kod šest donora praćenih kroz sedam dana nakon infekcije, izmjerena je metodom RT-qPCR-a pomoću interkalirajuće boje koristeći vlastito dizajniran set specifičnih početnica i sintetskog standarda.

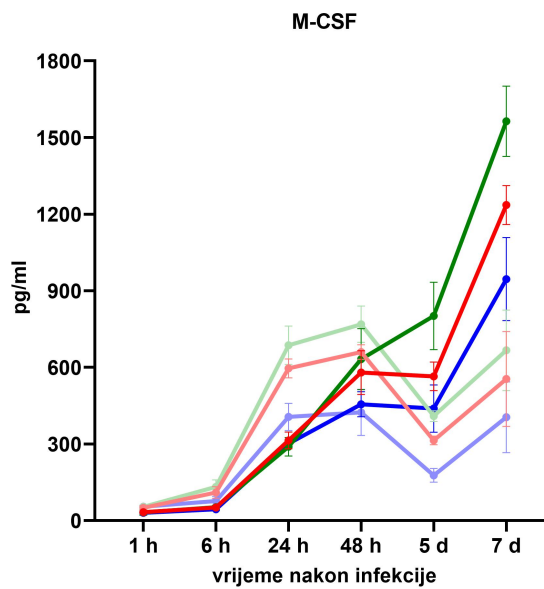
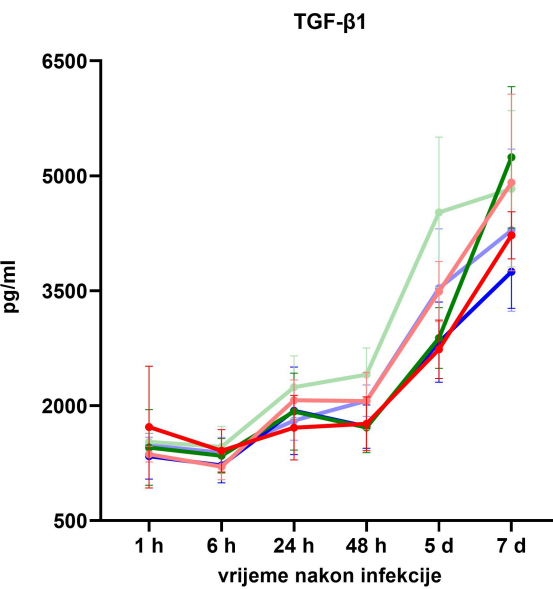
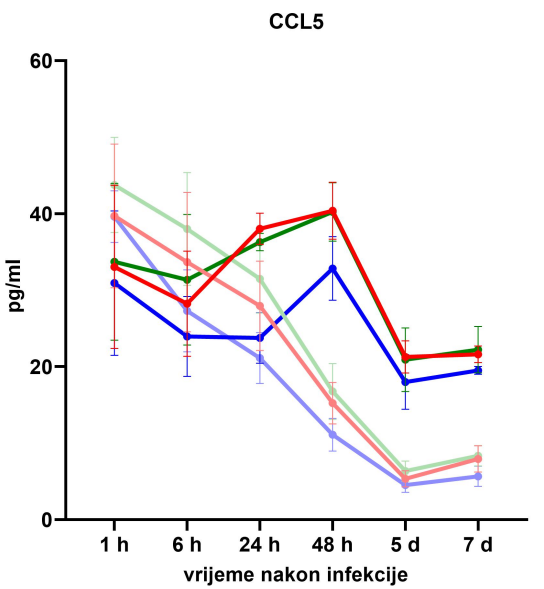
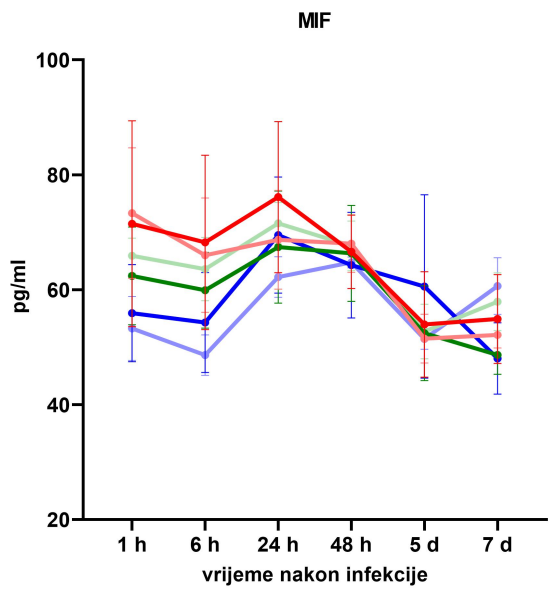
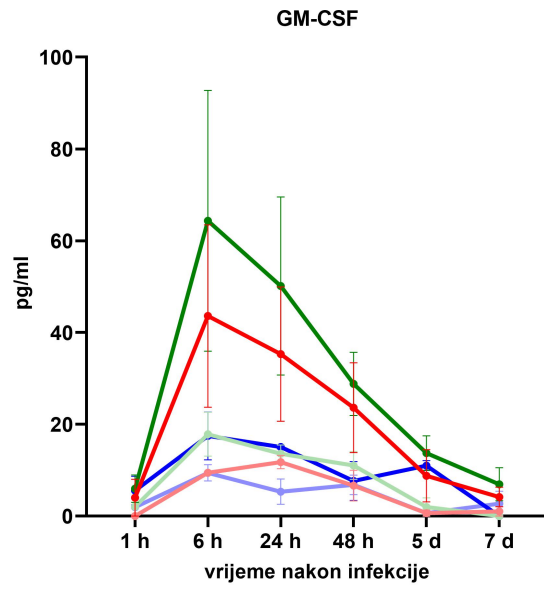
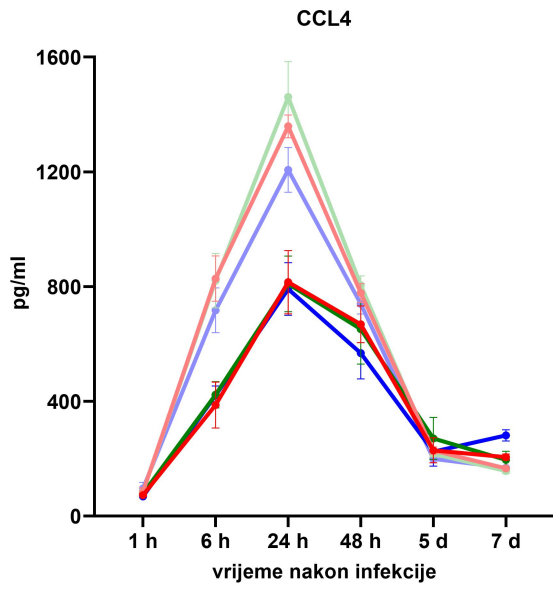
#### 4.4.2. Individualne razlike donora u koncentraciji solubilnih komponenti

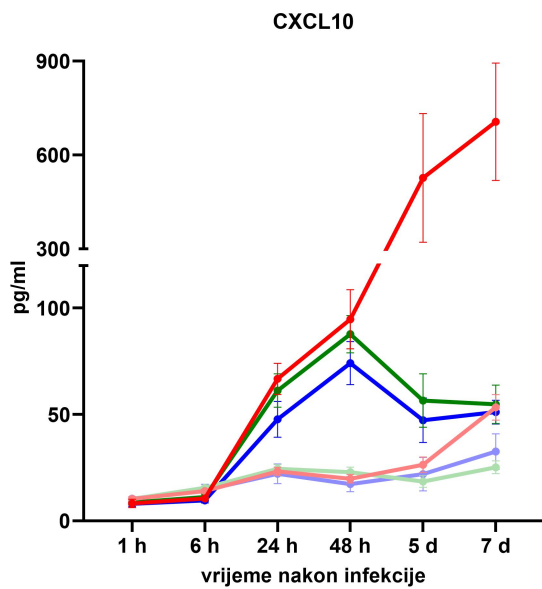
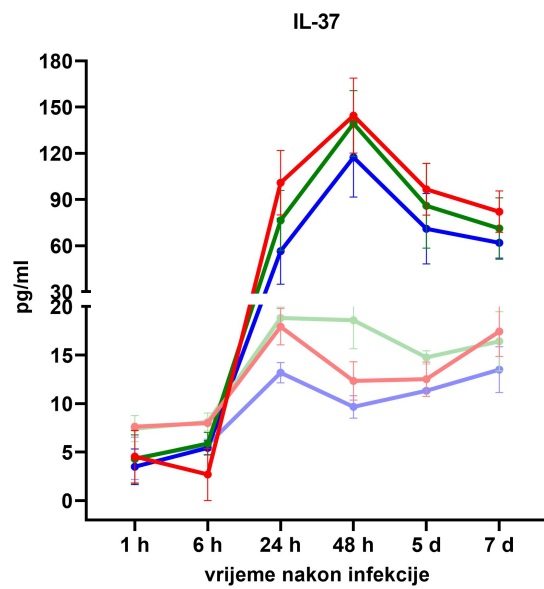
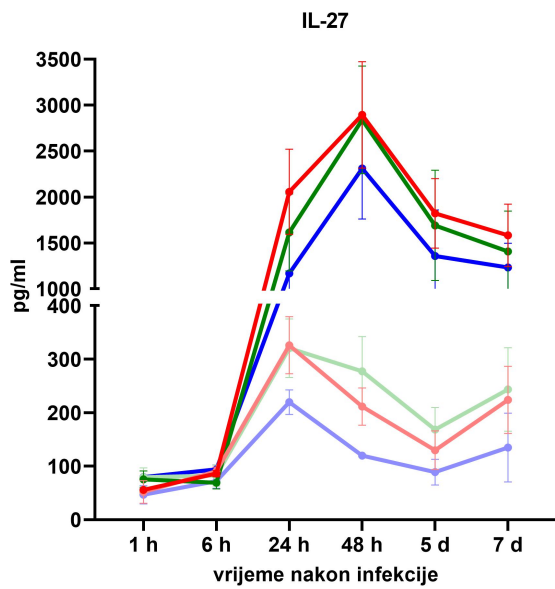
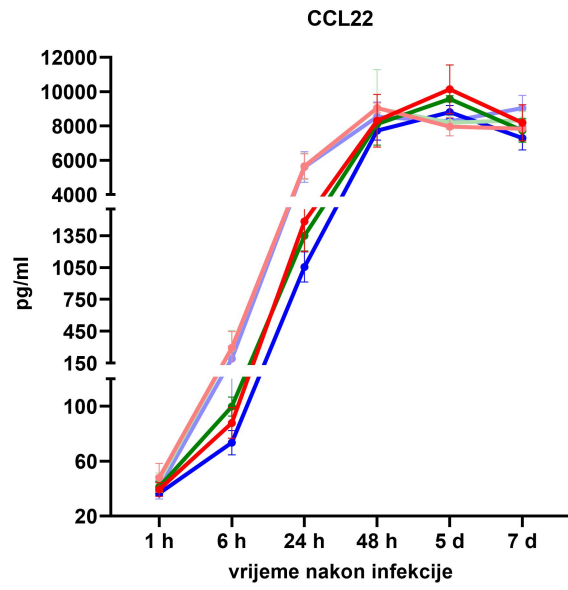
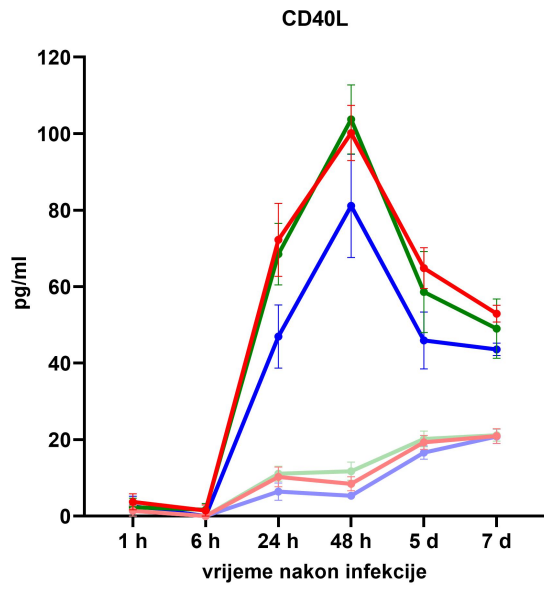
Primijetili smo različiti imunosni odgovor donora u proizvodnji citokina i kemokina te razdvajanje u skupinu tzv. „proupalna“ donora koja su u ranoj fazi infekcije imali veće koncentracije nekih citokina i kemokina (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, M-CSF) te na ostala tri tzv. „protuupalna“ donora koja su imala – a) konstantno veće koncentracije citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-27, CD40L, GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) od prve grupe donora ili b) niske koncentracije citokina i kemokina u ranoj fazi infekcije (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, M-CSF, IL-1RA, IL-37) (Slika 24). Zanimljivo je kako su tzv. „protuupalni“ imali veći broj kopija virusne RNA u supernatantu i u stanicama, dok su tzv. „proupalni“ donori imali manji broj kopija virusne RNA u supernatantu i u stanicama.



**Slika 27.** Individualni odgovor donora kod određenih solubilnih analita u supernatantu kod infekcije virusima PUUV ili TULV i neinficiranih stanica. Koncentracije solubilnih citokina i kemokina u supernatantima monocita zaraženih virusima PUUV i TULV i neinficiranim stanicama, u naznačenim vremenskim točkama, mjereni su korištenjem pojedinačnih ili višestrukih imunoloških testova pomoću magnetskih mikrokuglica na analizatoru Luminex 200 System. Za analizu rezultata korišten je program Luminex xPotent software, verzija 3.1. Kvantitativna koncentracija solubilnih citokina i kemokina izračunata je pomoću logističke jednadžbe s 5 parametara, koristeći standardnu krivulju. Rezultati su za svaku vremensku točku izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti od šest donora odnosno neovisnih eksperimenata mjerenih u duplikatu. (MOCK - neinficirane stanice)

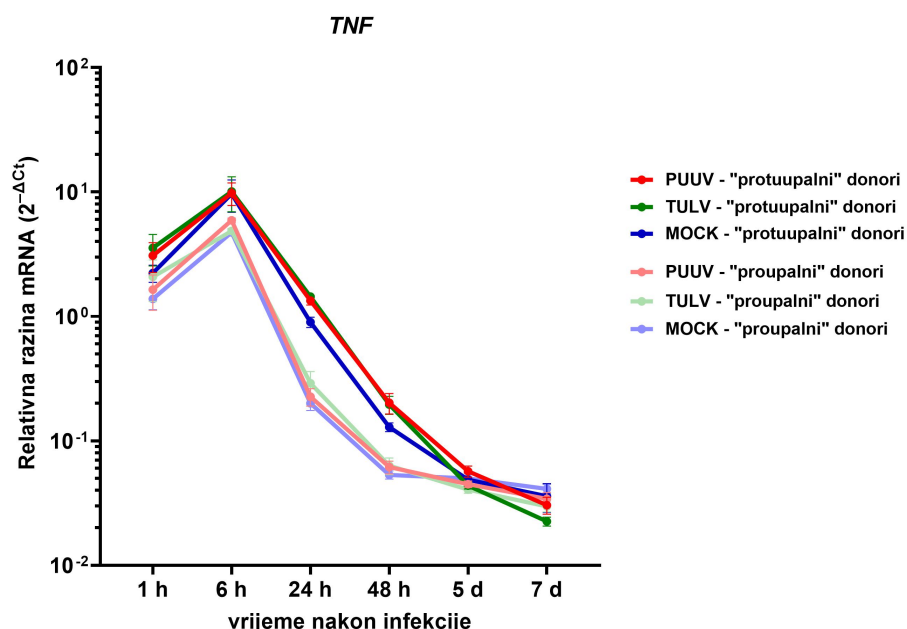




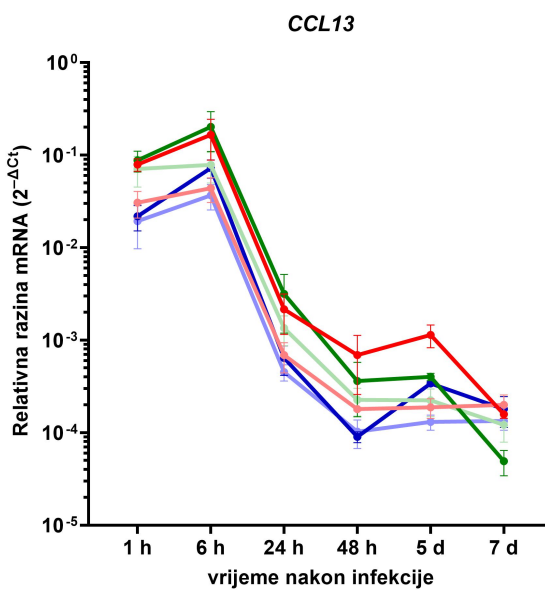
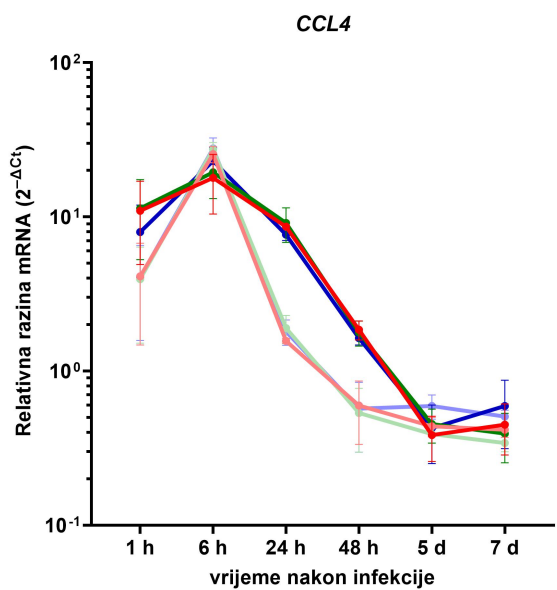
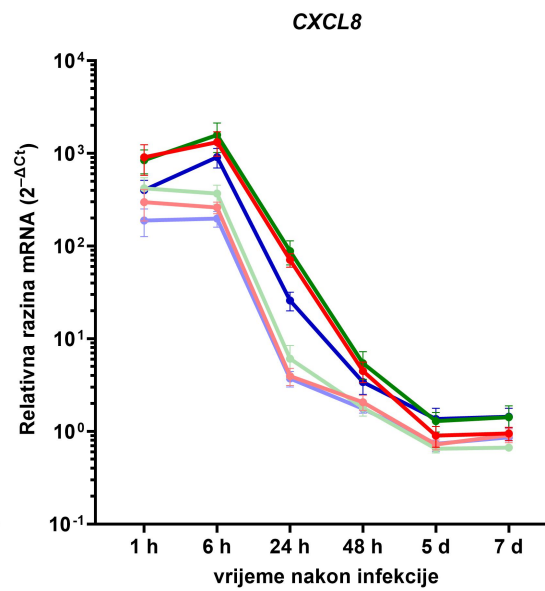
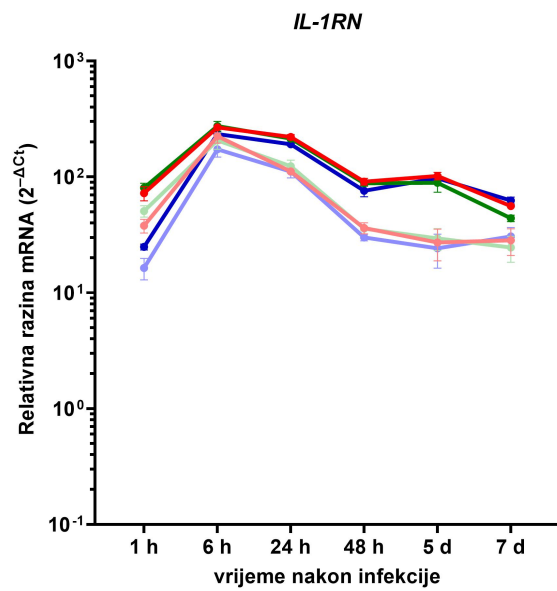
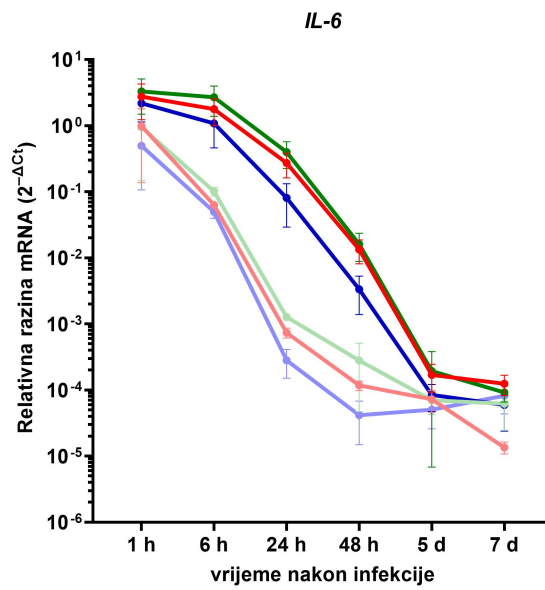
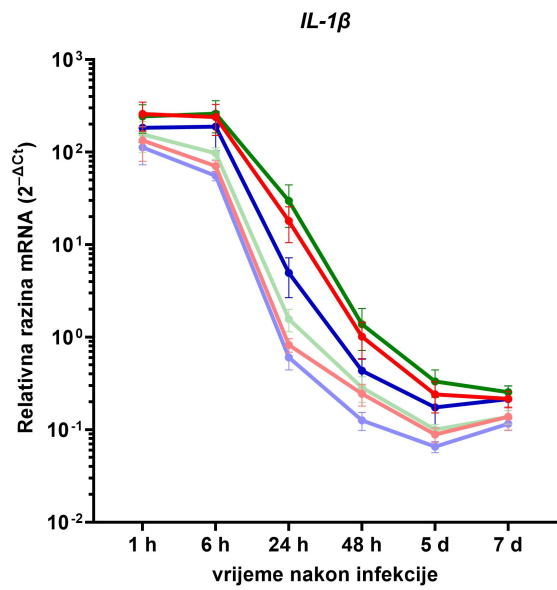


### 4.4.3. Individualne razlike donora u genskoj ekspresiji

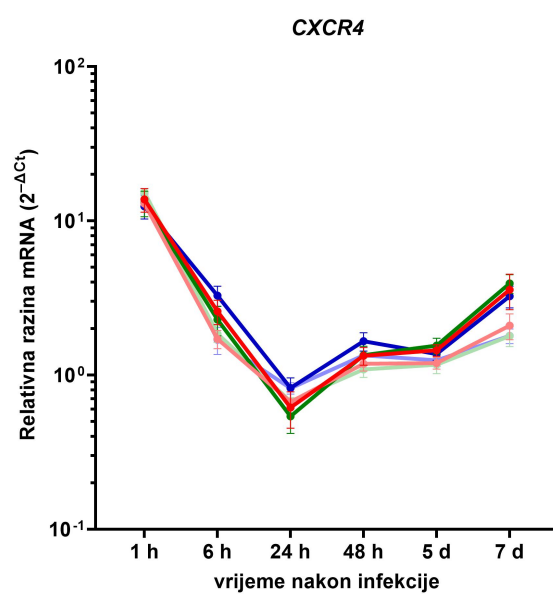
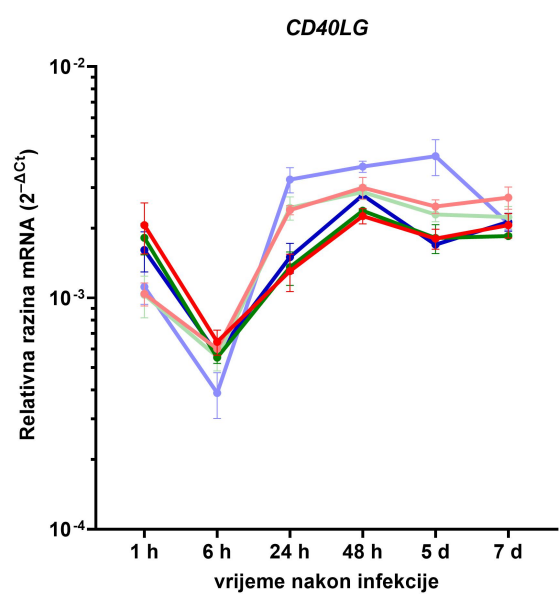
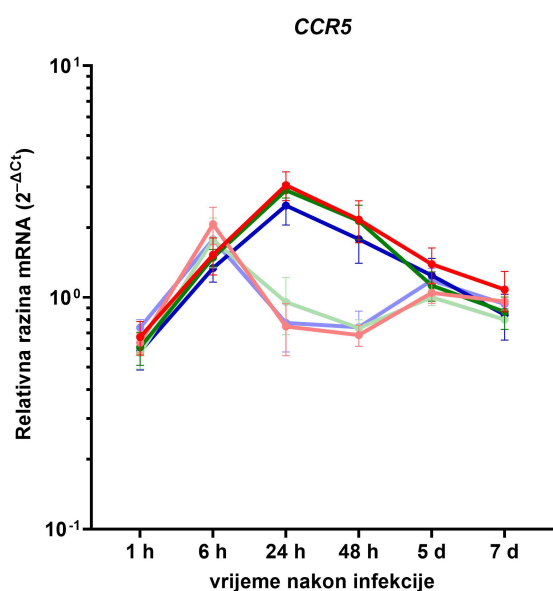
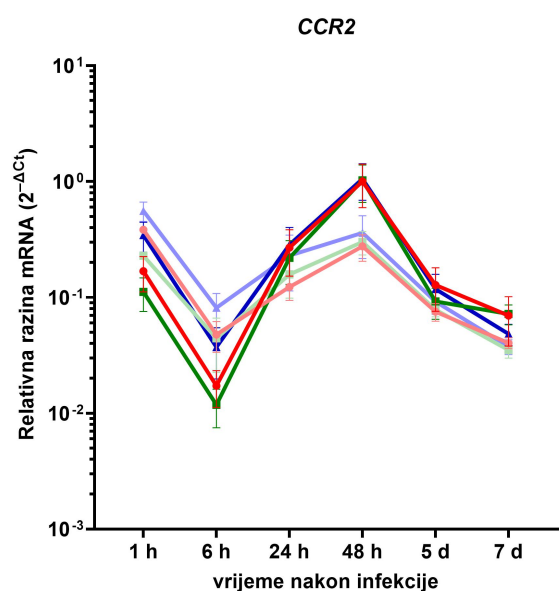
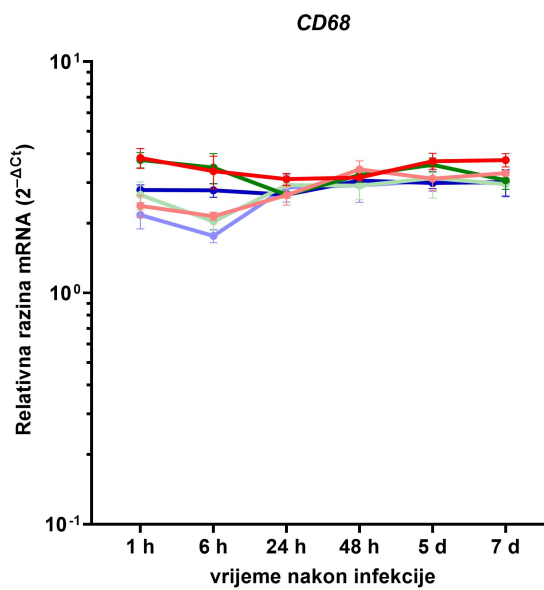
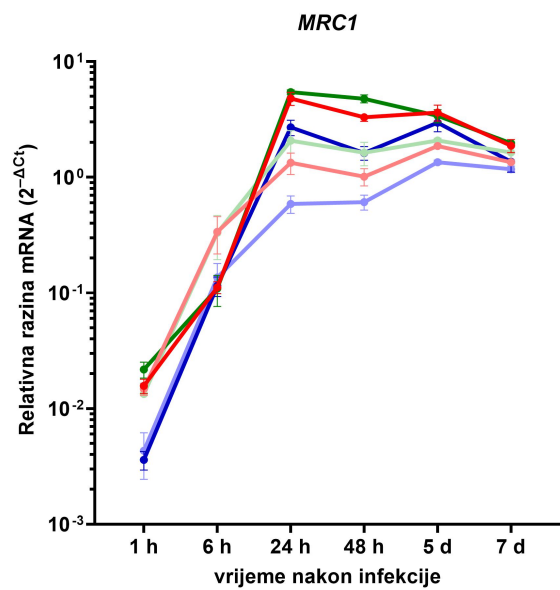
U dinamici genske ekspresije smo također detektirali različiti imunوسي odgovor donora te razdvajanje u dvije grupe po tri donora. Tzv. „proupalna“ donora koja su u 1 i/ili 6 h.n.i. imala veću ekspresiju gena *CCR2*, *CCR5*, *MRC1*, *IL27*, *CCL4*, *CXCL10*, *IFITM3*, *STAT1*. Nasuprot su „protuupalni“ donori imali konstantno veću ekspresiju gena *TNF*, *IL1b*, *IL1RN*, *IL6*, *CXCL8*, *STAT3* (Slika 28). Zanimljivo je kako su tzv. „protuupalni“ donori imali veći broj kopija virusne RNA u supernatantu i u stanicama, dok su tzv. „proupalni“ donori imali manji broj kopija virusne RNA u supernatantu i u stanicama.

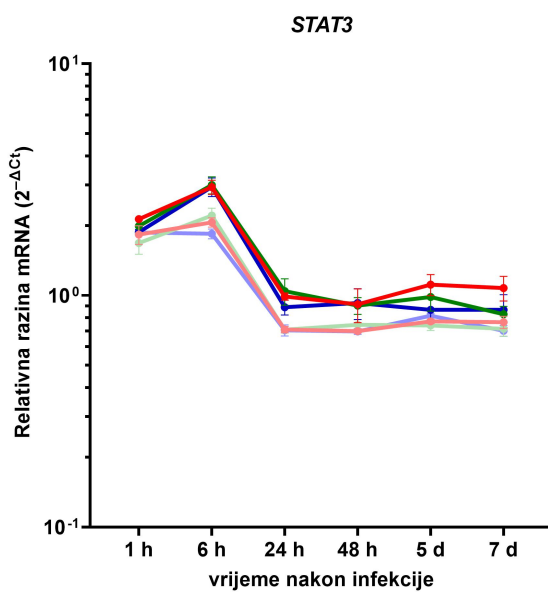
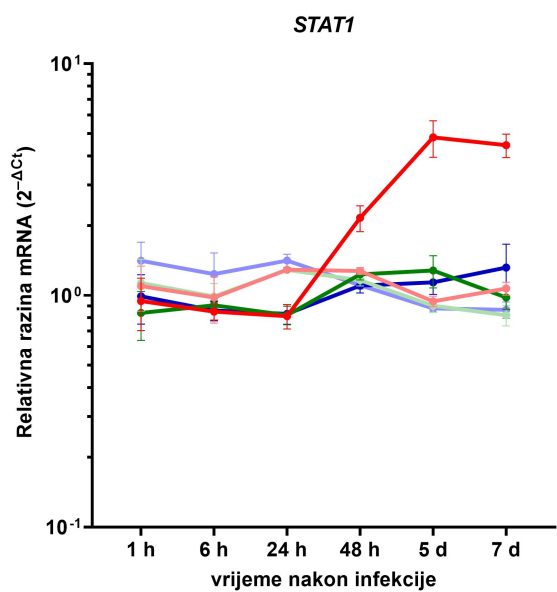
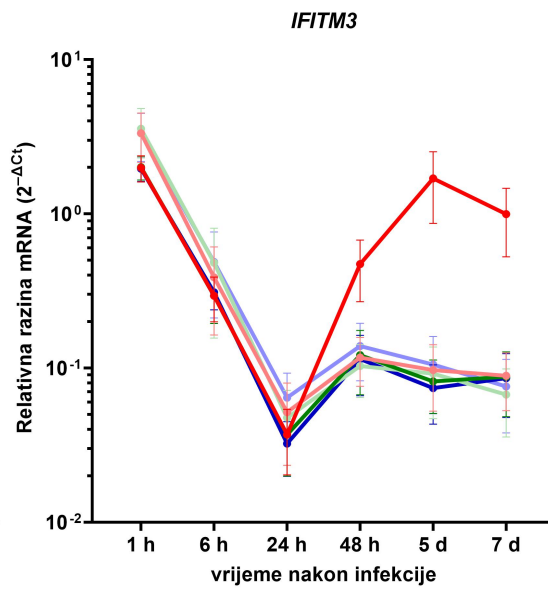
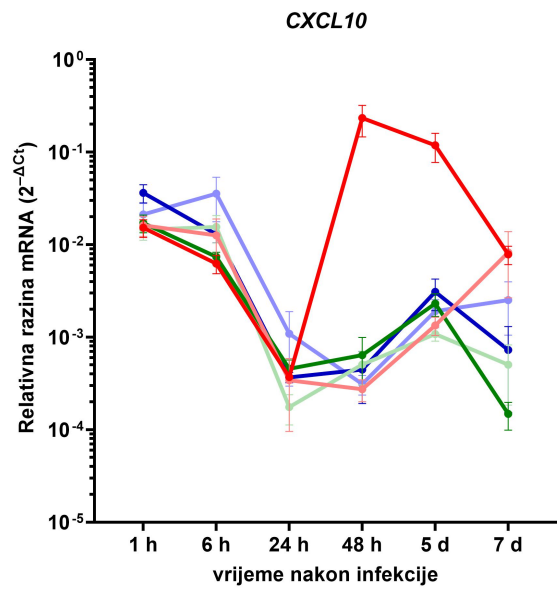


**Slika 28.** Individualni odgovor donora u genskoj ekspresiji kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV te neinficiranih stanica. Za analizu genske ekspresije korišten je qPCR array, a za analizu rezultata korišten je internetski portal *GeneGlobe Data Analysis Center*. Za normalizaciju dobivenih rezultata korištena su tri referentna gena. Relativne razine genske ekspresije izračunate su metodom relativne kvantifikacije  $2^{-\Delta Ct}$ . Student-ov t-test korišten je za izračunavanje značajnosti između dvije skupine. (MOCK - neinficirane stanice)







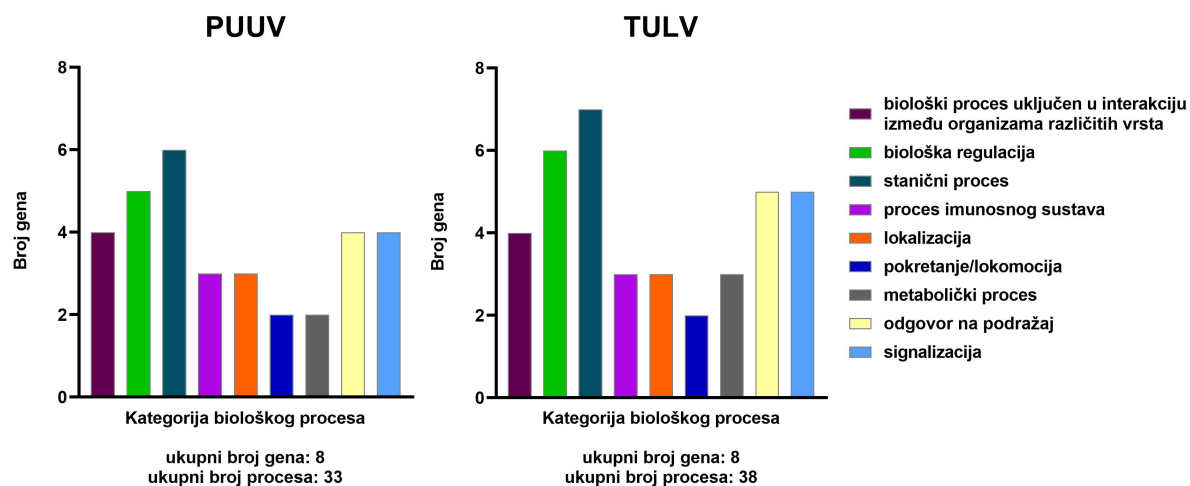


#### 4.5. Analiza bioloških procesa i mreže interakcija molekula

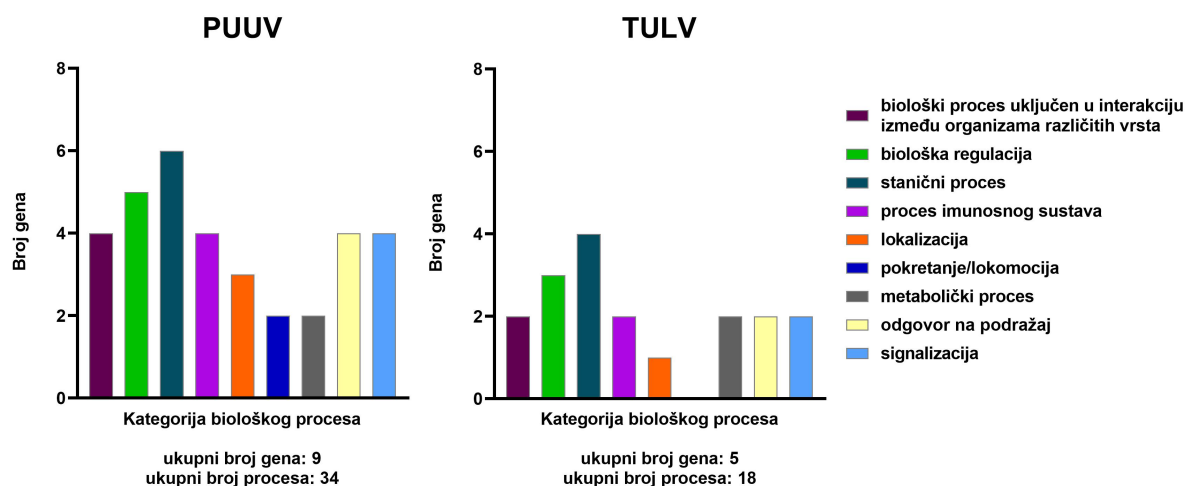
Napravljena je funkcionalna analiza podataka značajno promijenjenih gena kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV praćenih kroz sedam dana nakon infekcije, s karakterizacijom mreže interakcija između molekula i analizom bioloških procesa i izraženih staničnih signalnih puteva, pomoću platforme QIAGEN IPA za interpretaciju podataka i klasifikacijskog sustava PANTHER (Slike 28, 29 i 30).

U ranoj fazi infekcije (1 – 24 sata n.i.) su kod stanica inficiranih virusom PUUV bila aktivirana 33, a kod stanica inficiranih virusom TULV 38 bioloških procesa: (biološki proces uključen u interakciju između organizama različitih vrsta (*CCL13*, *CXCL10*, *STAT1*, *IL37*), biološka regulacija (*CCL13*, *CXCL10*, *STAT1*, *IL6*, *IL37*), stanični proces (*CCL13*, *CXCL10*, *MRC1*, *STAT1*, *IL6*, *IL37*), proces imunskog sustava (*CCL13*, *CXCL10*, *STAT1*, *IL37*), lokalizacija (*CCL13*, *CXCL10*, *MRC1*), pokretanje/lokomocija (*CCL13*, *CXCL10*), metabolički proces (*STAT1*, *IL37*), odgovor na podražaj (*CCL13*, *CXCL10*, *STAT1*, *IL37*), signalizacija (*CCL13*, *CXCL10*, *STAT1*, *IL37*) (Slika 27). *MRC1* je bio uključen u stanične podprocese - pupanje vezikula iz membrane, endocitozu posredovanu receptorima, invaginaciju membrane, lokalizaciju. U kasnoj fazi infekcije (48 sati – 7 dana n.i.) su kod stanica inficiranih virusom PUUV bila aktivirana 34 biološka procesa, dok je kod stanica inficiranih virusom TULV izostao biološki proces pokretanja/lokomocije, s aktivacijom 33 biološka procesa.

a)



b)

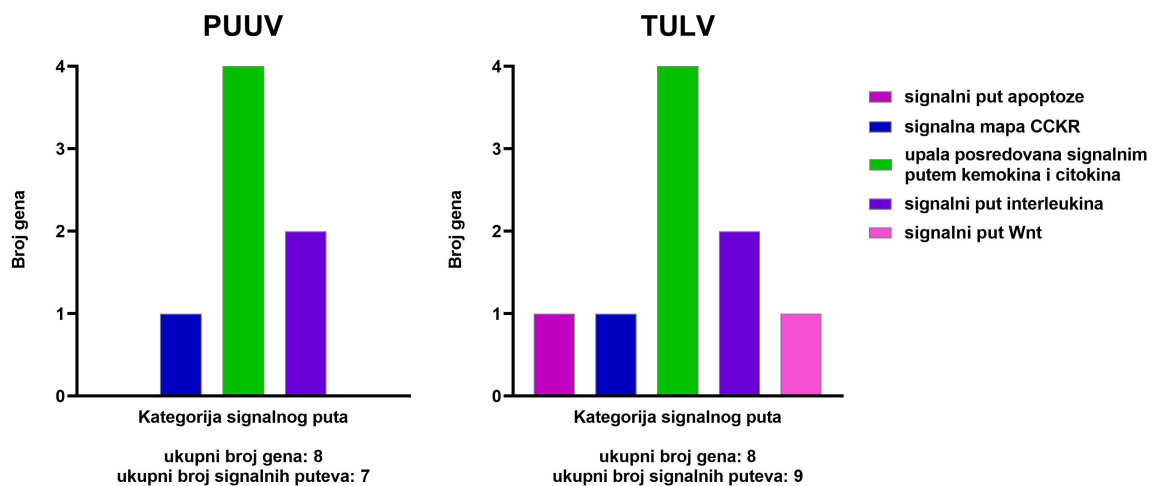


**Slika 28.** Prikaz aktiviranih bioloških procesa kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u a) ranoj (1 – 24 sata n.i.) i b) kasnoj fazi infekcije (48 sati – 7 dana n.i.), korištenjem klasifikacijskog sustava PANTHER, verzija 17.0 (od engl. *PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) Classification System*).

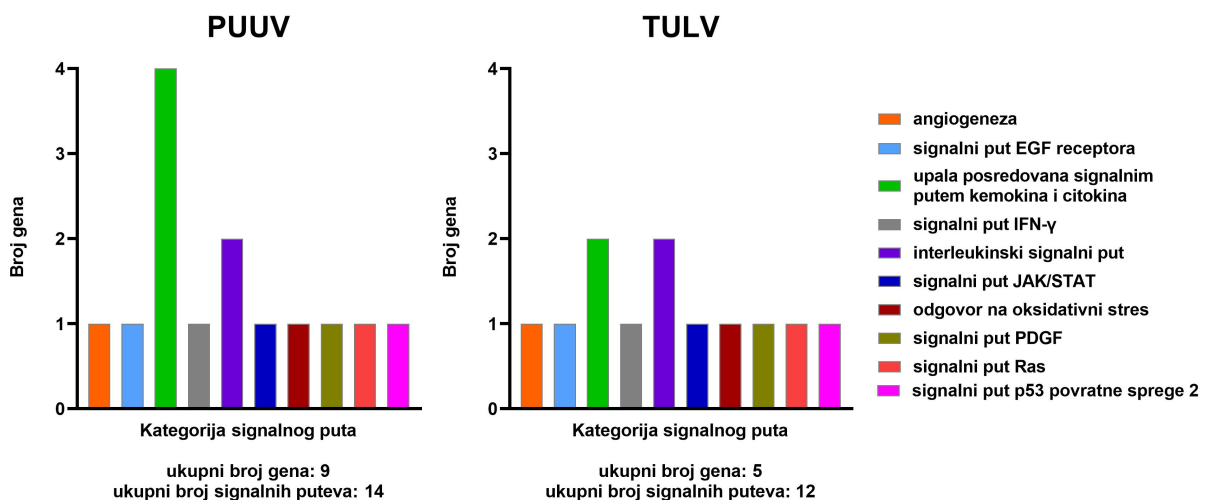
U aktivaciji signalnih puteva kod monocita inficiranih virusom TULV na početku infekcije bilo je aktivirano više signalnih puteva nego kod monocita inficiranih virusom PUUV (Slika 28). Na početku infekcije (1 – 24 sata n.i.) bilo je kod infekcije virusom PUUV aktivirano sedam signalnih puteva (CCKR signalna mapa (*CXCL8*), upala posredovana signalnim putem kemokina i citokina (*IL1B*, *CCL13*, *CXCL8*, *IL6*), put interakcije citokina i citokinskih receptora (*CD40LG*)), dok je kod infekcije virusom TULV bilo aktivirano devet signalnih puteva (signalni put TNF (*TNF*), signalni put MAPK (*TNF*), CCKR signalna mapa (*CXCL8*), upala posredovana signalnim putem kemokina i citokina (*IL1B*, *CCL13*, *CXCL8*, *IL6*),

signalni put interleukina (*CXCL8*, *IL6*) uslijed aktivacije TNF koji kod infekcije virusom PUUV nije bio aktiviran. Kod infekcije virusom PUUV je bio aktiviran put interakcije citokina i citokinskih receptora zbog aktivacije molekule *CD40LG* koji je kod infekcije virusom TULV izostao. U kasnoj fazi infekcije (48 sati – 7 dana n.i.) bilo je kod infekcije virusom PUUV aktivirano 14, a kod infekcije virusom TULV 12 signalnih puteva (angiogeneza (*STAT1*), signalni put EGF receptora (*STAT1*), upala posredovana signalnim putem kemokina i citokina (*CCL13*, *CXCL10*, *STAT1*, *IL6*), signalni put IFN- $\gamma$  (*STAT1*), interleukinski signalni put (*STAT1*, *IL6*), signalni put JAK/STAT (*STAT1*), odgovor na oksidativni stres (*STAT1*), signalni put PDGF (*STAT1*), signalni put Ras (*STAT1*), signalni put p53 povratne sprege 2 (*STAT1*) (Slika 29).

a)



b)

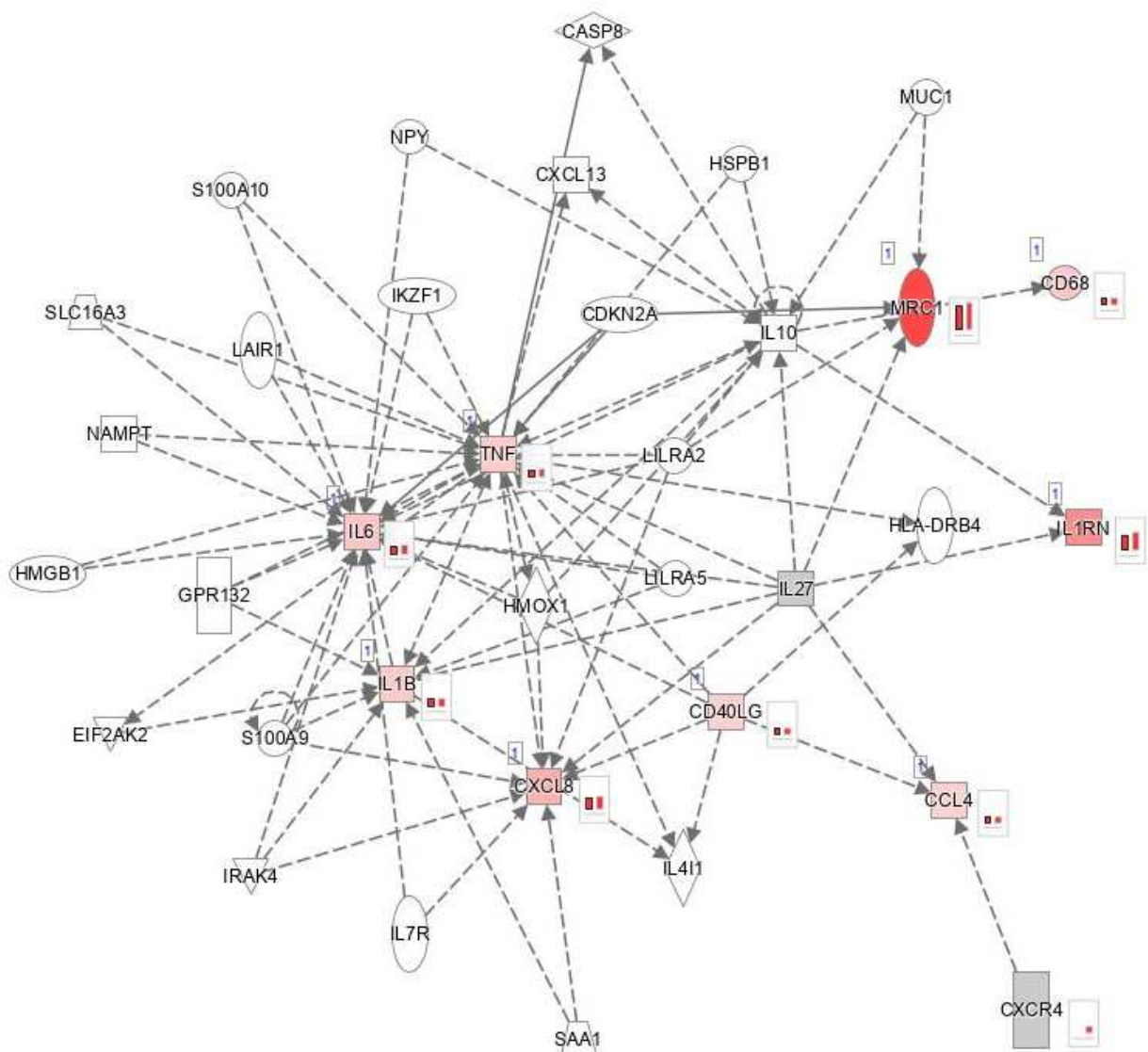


**Slika 29.** Prikaz aktiviranih signalnih puteva kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u a) ranoj (1 – 24 sata n.i.) i b) kasnoj fazi infekcije (48 sati – 7 dana n.i.), korištenjem

klasifikacijskog sustava PANTHER, verzija 17.0 (od engl. *PANTHER (Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System*).

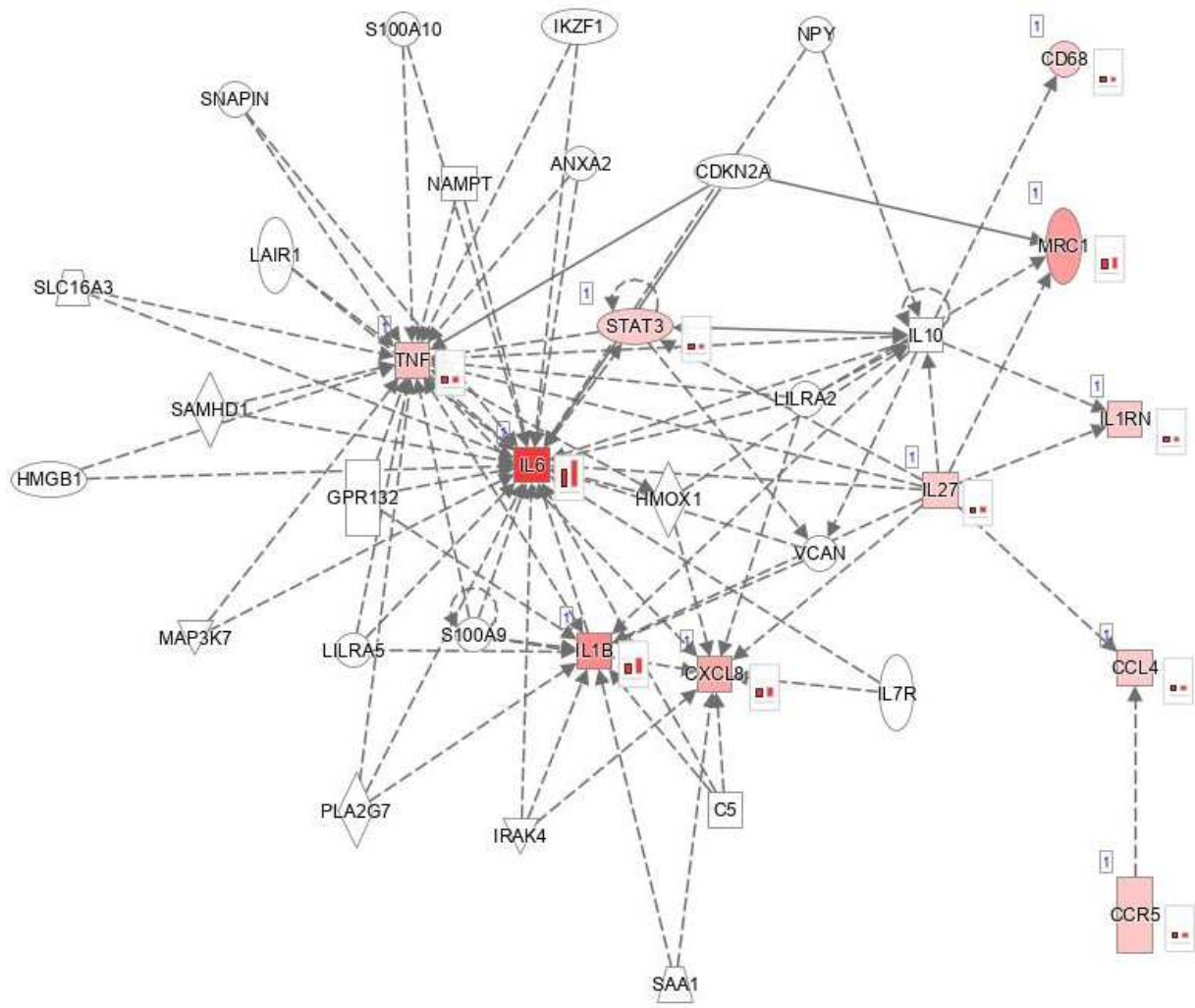
Karakterizacija mreže interakcija između proteina, pomoću platforme QIAGEN IPA za interpretaciju podataka, pokazala je direktnu i indirektnu povezanost citokina, kemokina, receptora (transmembranskih, G-proteinskih), enzima (peptidazama, kinazama), regulatora transkripcije i transportera (Slika 30).

a) 1 sat n.i.



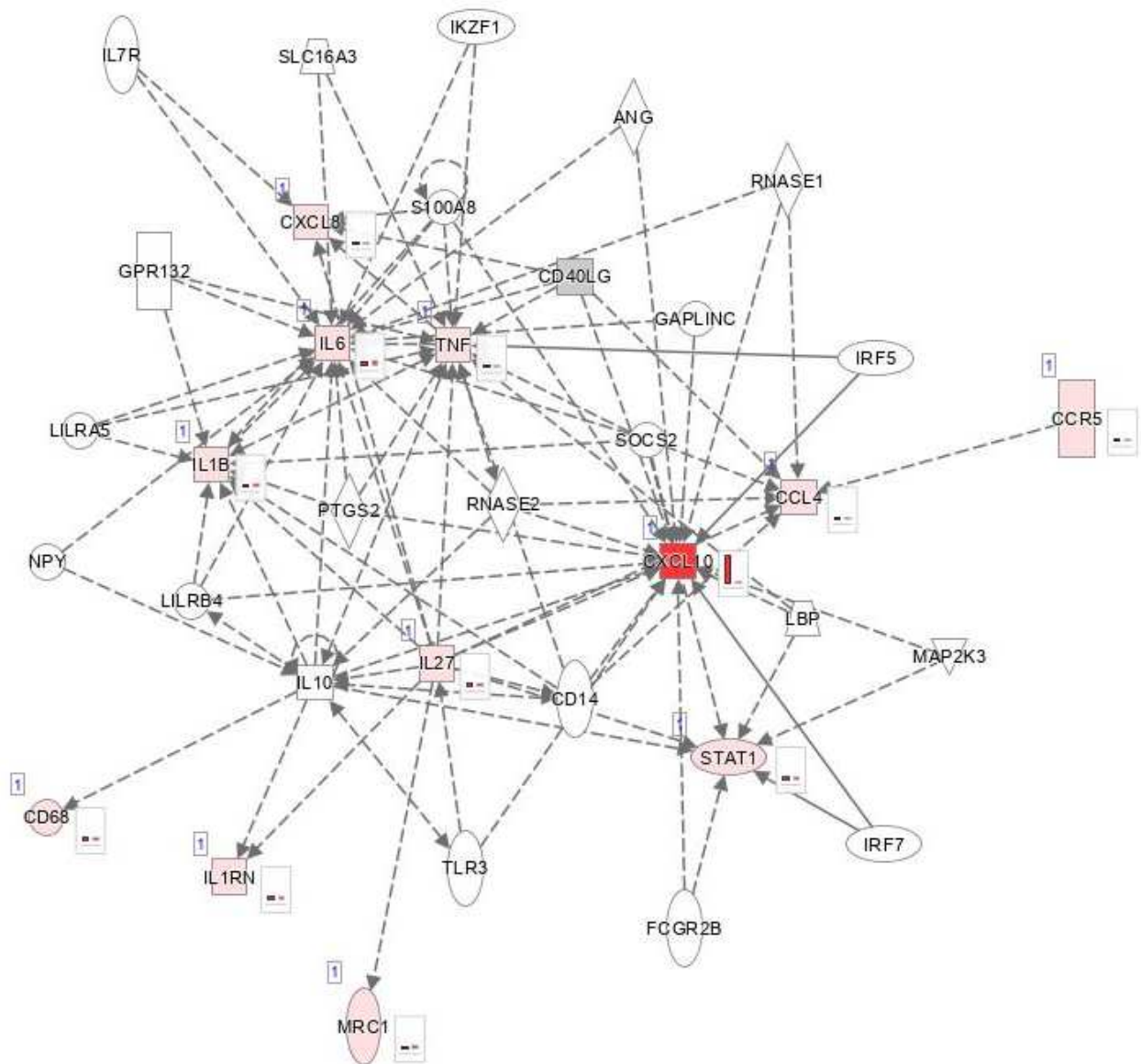


c) 24 sata n.i.

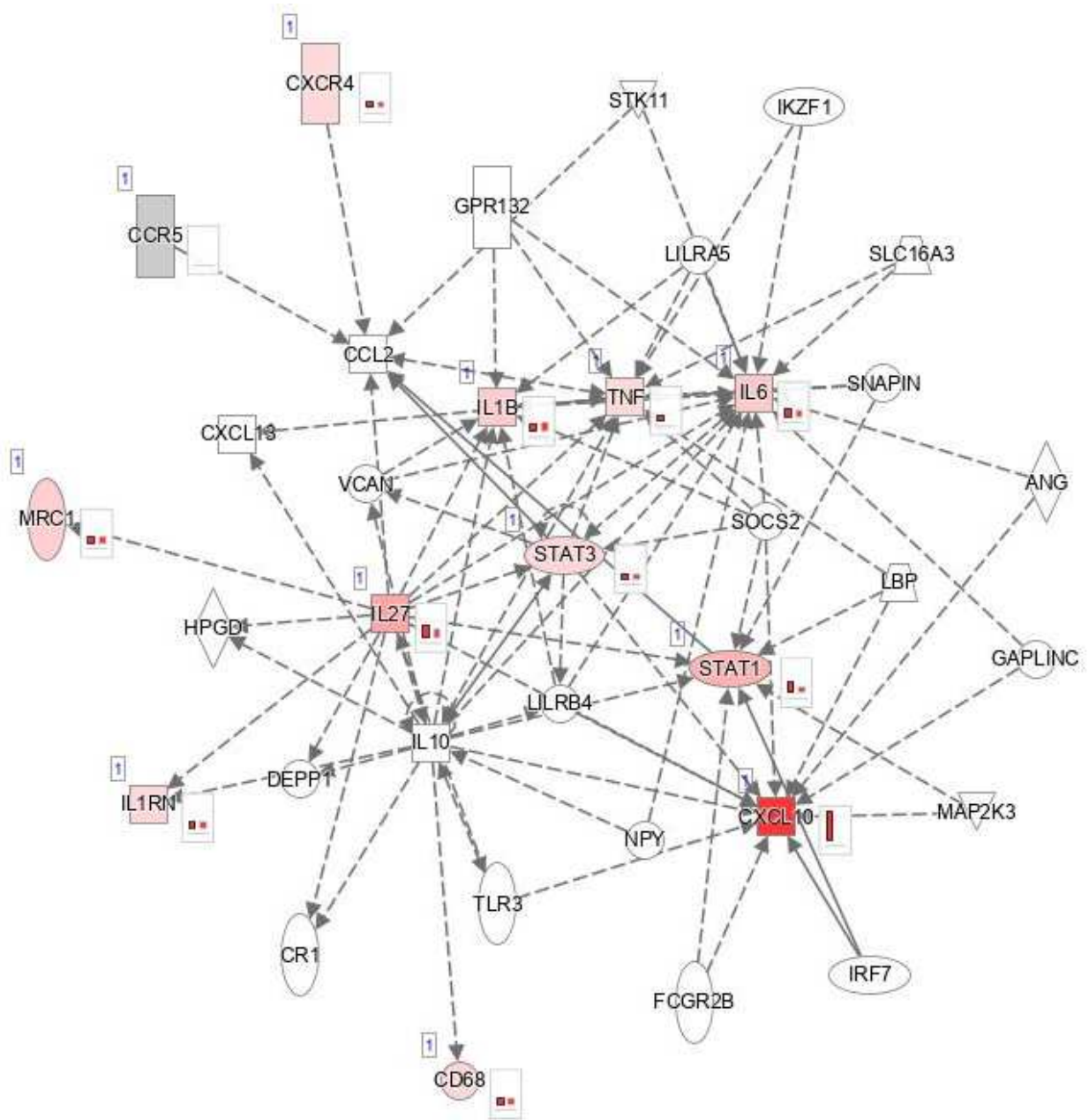




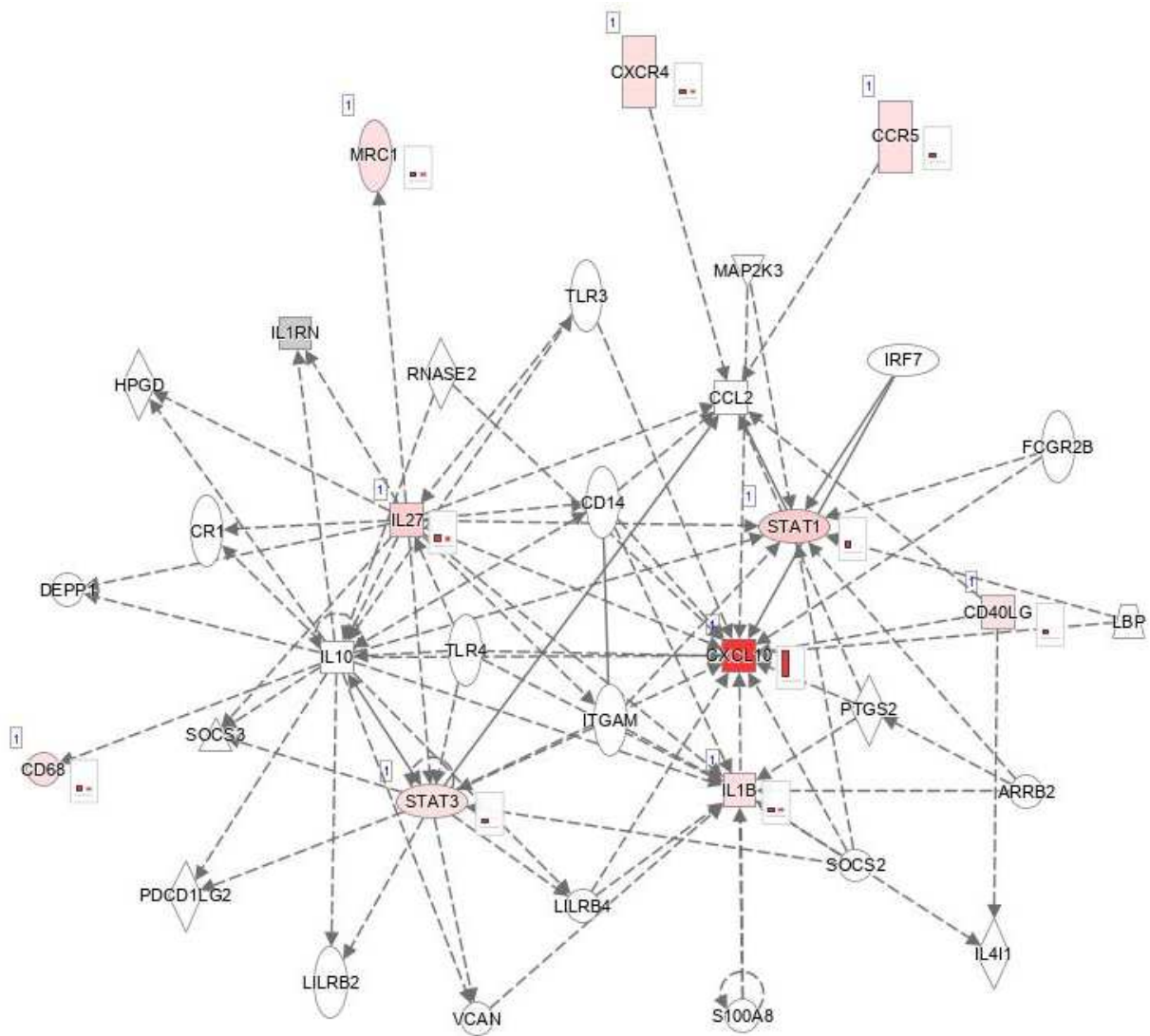
d) 48 sati n.i.



e) 5 dana n.i.



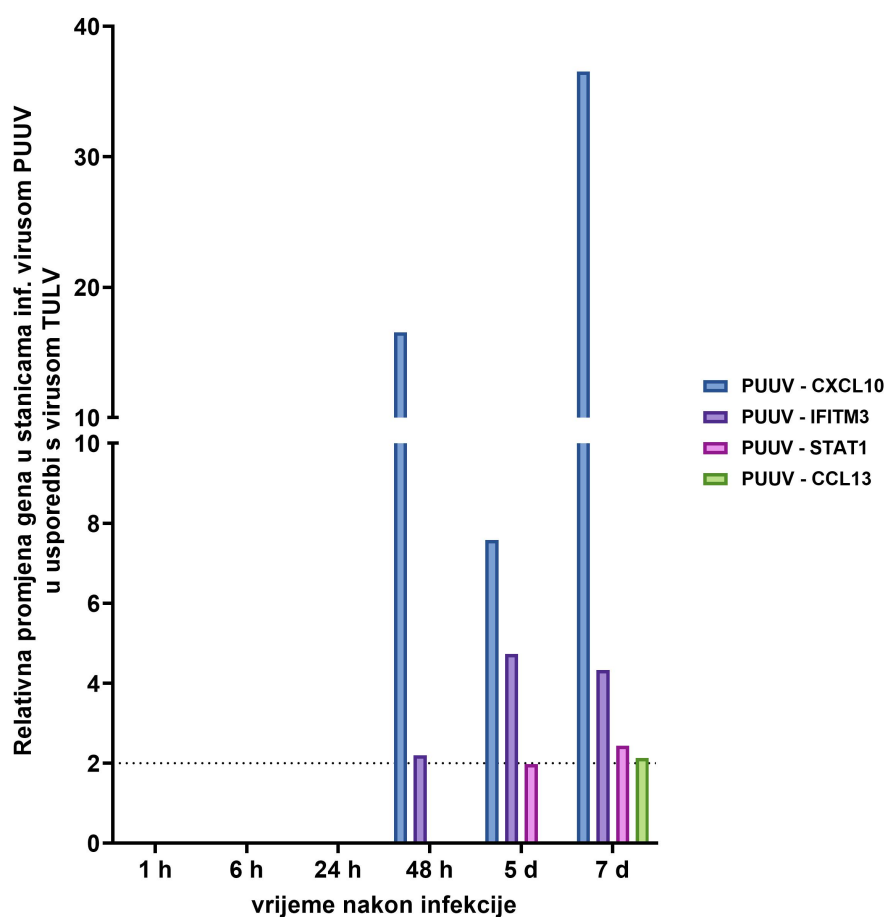
f) 7 dana n.i.



**Slika 30.** Prikaz mreže interakcija između analiziranih gena kod stanica inficiranih virusom PUUV i TULV i ostalih gena u toj mreži u a) 1 sat n.i., b) 6 sati n.i., c) 24 sata n.i., d) 48 sati n.i., e) 5 dana n.i., f) 7 dana n.i., korištenjem platforme QIAGEN IPA za interpretaciju podataka (od engl. *QIAGEN's data interpretation platform Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*).

#### 4.6. Biomarkeri u patogenoj u odnosu prema apatogenoj infekciji

Gene koji su bili statistički značajno povećani/smanjeni kod infekcije virusima PUUV ili TULV u odnosu na neinficirane stanice analizirali smo pomoću platforme QIAGEN IPA za interpretaciju podataka kako bismo karakterizirali moguće biomarkere koji su različiti kod patogene u odnosu prema apatogenoj infekciji stanica. Rezultati analize usporedbe biomarkera (od engl. *Biomarker Comparison analysis*) koristeći platformu QIAGEN IPA pokazali su neke gene kao potencijalne biomarkere, na početku infekcije virusom PUUV i TULV te na kraju praćenja infekcije kod virusa PUUV (Tablica 6 i Slika 31).



**Slika 31.** Geni sa statistički značajno povećanom ekspresijom kod stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim virusom TULV, kao mogući biomarkeri.

**Tablica 6.** Potencijalni biomarkeri u ranoj i kasnoj fazi infekcije patogenim/apatogenim virusom kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV, korištenjem platforme QIAGEN IPA za interpretaciju podataka (od engl. *QIAGEN's data interpretation platform Ingenuity Pathway Analysis (IPA)* s analizom usporedbe biomarkera (od engl. *Biomarker Comparison analysis*).

Vrijeme nakon infekcije	Virus	Ime molekule	Lokacija molekule	Porodica molekule
1 h	PUUV	CCR5	stanična membrana	G-proteinski receptor
		STAT3	jezgra	regulator transkripcije
	TULV	CXCR4	stanična membrana	G-proteinski receptor
		IL37	izvanstanični prostor	citokin
6 h	PUUV	nema biomarkera		
	TULV	nema biomarkera		
24 h	PUUV	nema biomarkera		
	TULV	nema biomarkera		
48 h	PUUV	IFITM3	apikalni odjeljak, kontakti stanica-stanica, površina stanice, stanična membrana, citoplazma, citoplazmatski mjehurići, rani endosomi, endoplazmatski retikulum, endosomska membrana, Golgijev aparat, kasni endosomi, lizosomi, lizosomska membrana, mikrosomalna membrana, jezgra, citoplazmatska membrana, vezikule	/
	TULV	STAT3	jezgra	regulator transkripcije
5 d	PUUV	CCR5	stanična membrana	G-proteinski receptor
		CXCL10	izvanstanični prostor	citokin
		TNF	izvanstanični prostor	citokin
	TULV	nema biomarkera		
7 d	PUUV	CCL13	izvanstanični prostor	citokin
		CCR5	stanična membrana	G-proteinski receptor
		CD40LG	izvanstanični prostor	citokin
		CXCL10	izvanstanični prostor	citokin
		IFITM3	apikalni odjeljak, kontakti stanica-stanica, površina stanice, stanična membrana, citoplazma, citoplazmatski mjehurići, rani endosomi, endoplazmatski retikulum, endosomska membrana, Golgijev aparat, kasni endosomi, lizosomi, lizosomska membrana, mikrosomalna membrana, jezgra, citoplazmatska membrana, vezikule	/
		STAT1	jezgra	regulator transkripcije
	TULV	nema biomarkera		

## 5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da ortohantavirusi potiču urođeni imunosni odgovor monocita koji se javlja se već 1 sat nakon infekcije virusom PUUV i virusom TULV na razini ekspresije gena, površinskih molekula/receptora i sinteze solubilnih modulatora biološkog odgovora. Aktivacija imunosnog odgovora u primarnim monocitima nakon ulaska ortohantavirusa u stanice i infekcije bila je neovisna replikaciji virusa. U ovom istraživanju je praćena dugotrajna kultivacija inficiranih primarnih monocita ortohantavirusima kroz sedam dana uz postojanu vijabilnost stanica te su zabilježene razlike urođenog imunosnog odgovora tijekom rane i kasne faze infekcije. U ranoj fazi infekcije prisutna je aktivacija primarnih monocita s miješanim M1/M2 odgovorom monocita dok je u kasnoj fazi infekcije prisutna indukcija diferencijacije prema stanicama MDM sličnih tipu M2.

Prijašnja istraživanja pokazala su u uvjetima *in vitro* uspješnost infekcije i replikacije patogenih i apatogenih ortohantavirusa u stanicama MDM i MDDC glodavaca i ljudi (Nagai i ostali 1985; P. W. Lee i ostali 1986; Temonen i ostali 1993; 1995; Raftery i ostali 2002b; Masanori Terajima i ostali 2004; Cebalo i Markotić 2007; Alemka Markotić i ostali 2007b; Marsac i ostali 2011; Scholz i ostali 2017) te u makrofagnim staničnim linijama i glodavaca i ljudi (Yao i ostali 1992; Alemka Markotić i ostali 2007b; Bourquain i ostali 2019). U stanicama MDM, MDDC i makrofagnim staničnim linijama, ortohantavirusi također ne uzrokuju citopatski učinak *in vivo* ni *in vitro* (Temonen i ostali 1993; Raftery i ostali 2002b; Alemka Markotić i ostali 2007b). U istraživanju Temonen i suradnika 1995. inficirali su nezrele i zrele stanice MDM virusom PUUV te su nezreli MDM-ovi (kultivirani 16 sati prije infekcije) proizveli 5 – 30 PFU/ml titra virusa u supernatantu, dok su naprotiv, zreli MDM (kultivirani do makrofaga kroz 6 dana prije infekcije) bili osjetljiviji na infekciju jer su proizvodili veće količine virusa u STNT-u, 75 PFU/ml. Nedavno istraživanje na stanicama M1 MDM (stimuliranim GM-CSF-om) pokazalo je kako je replikacija bila prisutna samo u patogenog virusa PUUV, dok u apatogenog virusa TULV nije bila prisutna, a s druge strane u stanicama M2 MDM (stimuliranim M-CSF-om) replikacija je izostala u oba virusa (Bourquain i ostali 2019). Poznato je iz navedenih ranijih istraživanja, kako su usprkos činjenici uspješne infekcije i replikacije ortohantavirusa u stanicama MDM i MDDC, dobivene količine repliciranih virusa male, od  $10^1$  do maksimalno  $10^4$  PFU/ml, što je znatno manje u odnosu na količine proizvedenih virusa u endotelnim ili stanicama Vero E6 ( $10^4$  do  $10^6$  PFU/ml) (Raftery i ostali 2002b; Alemka Markotić i ostali 2007b). Unatoč dosadašnjim

nekoherentnim istraživanjima, možemo ipak zaključiti kako su stanice MDM i nezrele stanice MDCC prijemčive na infekciju ortohantavirusima.

Kod nekih drugih virusa, s genomom sastavljenim od jednolančane RNA negativnog polariteta, istraživanja na inficiranim monocitima pokazala su različite rezultate ovisno o porodici virusa. U istraživanju s filovirusima (*Ebolavirus* i *Marburgvirus*) primarni su monociti bili jednako podložni infekciji kao i MDM-ovi, s produktivnim titrom virusa (Ströher i ostali 2001). Naprotiv, kod ortomiksovirusa (virus influenza), arenavirusa (*Lassa marmarenavirus* i *Mopeia marmarenavirus*) i rabdovirusa (virus bjesnoće) primarni su monociti bili osjetljivi na infekciju, ali bez proizvodnje infektivnih čestica (Lukashevich i ostali 1999; J. Li i ostali 2008; A. C. Y. Lee i ostali 2017). Također, kod virusa s jednolančanom RNA pozitivnog polariteta, npr. retrovirusa (HIV-1, od engl. *human immunodeficiency virus*), primarni monociti ostaju bez produktivne infekcije virusom, dok se diferencijacijom monocita u stanice MDM ili MDCC događa produktivna replikacija virusa HIV-1 u stanicama (Dong, Kwas, i Wu 2009).

Trenutno nije poznato mogu li se u organizmu, nakon udisanja aerosola kontaminiranog ortohantavirusima, monociti u perifernoj krvi inficirati te prenositi virus dalje kroz organizam. Također, trenutno nije poznato mogu li se „intaktni“ primarni monociti u uvjetima *in vitro* inficirati ortohantavirusima. Također, nepoznato je, ukoliko je bude, kakva će biti jačina i dinamika replikacije ortohantavirusa u primarnim monocitima. U ovom smo istraživanju željeli dati svoj doprinos odgovoru na ta pitanja.

Hipoteze ovog rada bile su kako ortohantavirusi potiču urođeni imunski odgovor primarnih monocita/makrofaga na razini genske ekspresije, ekspresije površinskih biljega i sinteze solubilnih modulatora biološkog odgovora, kako postoje razlike u urođenom imunskom odgovoru primarnih monocita/makrofaga inficiranih patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom te kako ortohantavirusi induciraju diferencijaciju primarnih monocita, ali se smjer diferencijacije razlikuje pri infekciji patogenim i apatogenim ortohantavirusom. Prve dvije hipoteze dokazane su ovim radom jer su ortohantavirusi potaknuli urođeni imunski odgovor primarnih monocita/makrofaga na razini ekspresije gena i staničnih površinskih receptora te sinteze solubilnih modulatora biološkog odgovora. Postoje vidljive razlike u urođenom imunskom odgovoru primarnih monocita i stanica MDM inficiranih patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom. Treća hipoteza, kako se smjer diferencijacije monocita razlikuje pri infekciji patogenim i apatogenim ortohantavirusom nije dokazana, iako postoje značajne razlike u genskoj ekspresiji citokina i

kemokina i njihovih koncentracija u supernatantu. Ipak, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ta hipoteza dokazala ili opovrgnula.

U ovom smo istraživanju očekivali niski prinos repliciranih virusa u primarnim monocitima i stanicama MDM/MDDC. Praćenjem kinetike infekcije kroz sedam dana, rezultati pokazuju kako su monociti inficirani virusom PUUV ili TULV podložni ulasku virusa i infekciji, ali nisu prijemčivi za replikaciju ortohantavirusa jer se broj kopija virusne RNA segmenta S u stanicama i u STNT-u smanjuje od 1 do 48 sati poslije infekcije (n.i.). Nadalje, stanice MDM su prijemčivi za replikaciju patogenim virusom PUUV jer je u 48 sati n.i. u stanicama MDM detektirano povećanje broja virusnih kopija, dok su za potvrdu replikacije apatogenim virusom TULV potrebna dodatna istraživanja. Trend povećanja ili smanjenja količine virusnih kopija u 3. i 4. d n.i. u stanicama ne možemo utvrditi, dok je u kasnijim vremenskim točkama od 5. i 7. d n.i. bilježen pad broja virusnih kopija. Međutim, rezultati praćenja uspješnosti infekcije pomoću indirektno imunofluorescencije ukazuju kako su stanice MDM (u 48 h n.i. i 7 d n.i.), osjetljivi/podložni infekciji patogenim virusom PUUV i apatogenim virusom TULV. Iz rezultata možemo zaključiti kako je infekcija primarnih monocita ortohantavirusima bila ograničena, bez produktivne replikacije virusa, dok je replikacija u stanicama MDM u 48 h n.i. bila prisutna kod patogenog virusa PUUV. Podložnost stanica MDM za replikaciju apatogenim virusom TULV bi trebalo dalje sustavno istražiti. Sukladno drugim istraživanjima, možemo zaključiti kako su i u ovom istraživanju stanice MDM bile podložne na infekciju ortohantavirusima u odnosu na primarne monocite. Rezultati pokazuju kako ortohantavirusi nemaju mogućnost replikacije u monocitima moguće iz intrinzičnih razloga u samoj konstituciji monocita kao efektorskih stanica urođene imunosti s pojačanim unosom i prezentacijom antigena, ili iz razloga jer su spororastući virusi, a monociti se kultivacijom diferenciraju u stanice MDM/MDDC. Rezultati ukazuju kako sposobnost replikacije u stanicama MDM razlikuje patogene od apatogenih vrsta ortohantavirusa.

Sukladno našem istraživanju, u radu švedskih autora, primarne klasične monocite zarazili su virusom PUUV ili virusom Hantaan (HTNV) visokom razinom mnogostrukosti infekcije (MOI) od 7,5 te nakon 40 h n.i. detektirali 1,4 % klasičnih monocita zaraženih virusom PUUV (0,4 % HTNV-om), također bez replikacije virusa u STNT-ima inficiranih stanica (Scholz i ostali 2017). U istraživanjima ove vrste, autori biraju MOI na temelju dostupne količine virusa ili ovisno o postavkama pokusa. Tako su u nekim istraživanjima infekcije stanica ortohantavirusima radili visokom razinom MOI od 5 ili 7,5 kako bi osigurali ujednačenu infekciju svih stanica u kulturi (Witkowski i ostali 2016; Scholz i ostali 2017).



Tako je u jednom radu primijećena povećana ekspresija proteina Mx1 kad je infekcija virusom TULV bila izvršena razinom MOI od 1, u odnosu na infekciju nižom razinom MOI od 0,1 (Bourquain i ostali 2019). Mi smo odabrali razinu MOI od 0,1 kako bismo malom količinom virusa pokušali imitirati prirodnu infekciju. Pretpostavljamo kako je u ovom istraživanju u infekciji virusom TULV bilo prisutno vrlo malo virusa te vjerojatno, da smo koristili veći MOI s većim količinama virusa dobili bismo jači imunosni odgovor. Moguće je kako bismo, koristeći veću razinu MOI detektirali replikaciju virusa u stanicama i supernatantu. Nadalje, drugi autori (Witkowski i ostali 2016; Scholz i ostali 2017) pratili su infekciju stanica u 12 sati n.i. i 40 sati n.i. kako bi omogućili uspostavu infekcije te ranu ekspresiju virusnih gena, kao i detekciju promjena genske ekspresije urođenog staničnog odgovora na infekciju. U skladu s time smo u ovom istraživanju željeli pratiti cijeli vremenski tijek infekcije od rane faze s monocitima do kasne faze razlučivanja infekcije s diferencijacijom monocita te smo imali šest vremenskih točaka u praćenju genske ekspresije i solubilnih komponenti te, zbog tehničkih razloga, tri vremenske točke u praćenju ekspresije staničnih površinskih markera.

Infekcije monocita u ovom istraživanju bile su uspješne jer su inficirani monociti i stanice MDM/MDDC statistički značajno reagirale na infekciju sintezom proupalnih citokina i kemokina te povećanjem genske ekspresije proupalnih gena kod monocita i kasnije protuupalnih gena kod stanica MDM/MDDC. Kao što smo očekivali, u ovom istraživanju nije primijećena apoptoza monocita ili stanica MDM/MDDC jer ortohantavirusi nisu citolitički niti za druge stanice. Stanice su bile vijabilne tokom cijelog vremenskog tijeka praćenja infekcije, zabilježeno je povećanje volumena i granuliranosti stanica, količina dobivene ukupne RNA se povećavala trajanjem tijeka infekcije.

U istraživanje su bili uključeni samo muški dobrovoljni darivatelji krvi radi smanjenja utjecaja ženskih hormona na istraživanje, što predstavlja ograničenje ovog istraživanja.

Postoje fiziološke spolne razlike u osjetljivosti na virusnu infekciju te su mušjaci/muškarci više podložni većini virusnih infekcija od ženki/žena. Ženke/žene razvijaju snažniji upalni odgovor tijekom infekcije te je težina infekcije veća kod su mušjaka/muškaraca nego kod ženki/žena (S.L. Klein i Roberts 2010).

Dokazane su spolne razlike u imunosnom odgovoru na virusnu infekciju u sintezi citokina, IFN tipa I i adaptivnoj imunosti (broj T-limfocita i sinteza protutijela) (S.L. Klein i Roberts 2010). Dokazan je učinak ženskih spolnih hormona na funkcioniranje imunosnog sustava.

Ženski spolni hormoni potiču diferencijaciju monocita prema DC s većom sintezom IFN tipa I i proupalnih citokina te povećanim prijenosom signala preko receptora nalik Tollu (TLR7 i TLR9) (S.L. Klein i Roberts 2010; S.L. Klein i Flanagan 2016). Prisutne su spolne razlike u ekspresiji gena u signalnim putevima TLR i indukciji odgovora IFN tipa I gdje je u žena i ženki štakora povećana ekspresija gena *TLR7*, *MYD88*, *RIGI*, *STAT3*, *NFKB*, *TNF* (Hannah, Bajic, i Klein 2008; Sabra L. Klein, Jedlicka, i Pekosz 2010). Također, antigen prezentirajuće stanice (APC) žena/ženki efikasnije su u prezentiranju peptida prema naivnim T-limfocitima nego APC muškaraca (S.L. Klein i Flanagan 2016; S.L. Klein i Roberts 2010; Seillet i ostali 2012). U akutnoj infekciji bolesnika s HVBS dokazane su spolne razlike gdje žene izlučuju veće koncentracije IL-9, FGF-2, and GM-CSF, a manje koncentracije CXCL8 i CXCL10 u uporedbi s muškarcima (Jonas Klingström, Lindgren, i Ahlm 2008). Spolne razlike u imunom odgovoru na patogene znače i moguće razlike u odgovoru na terapiju. Prevalencija infekcije veća je kod muškaraca nego kod žena što je također utjecano i povećanom izloženošću patogenima. Češća učestalost oboljelih muškaraca dokazana je i u HVBS-u, što je također utjecalo na odabir samo muških darivatelja u ovom istraživanju. Nadalje, odabrali smo i podudarnost dobne skupine darivatelja prema dobnoj skupini HVBS bolesnika (između 25 i 50 godina starosti).

Uz spol, na sposobnost sinteze citokina/kemokina mogu utjecati i drugi genetski čimbenici poput polimorfizma promotora gena ili pojedinih HLA haplotipova.

U kralješnjaka je identificirano nekoliko gena koji utječu na otpornosti na bolesti koji doprinose učinkovitijem imunom odgovoru, smanjenoj replikaciji virusa u organizmu te lakšoj patologiji bolesti. Najbolje proučeni geni koji utječu na otpornosti na bolesti kodiraju proteine iz superobitelji imunoglobulina i pod utjecajem su spolnih hormona (S.L. Klein i Roberts 2010). Hormoni prenose signal do elemenata hormonskog odgovora (HRE, od engl. hormone response elements) u promotoru gena koji reagiraju na hormone, čime utječu na transkripciju gena (S.L. Klein i Roberts 2010). HRE su identificirani u promotoru nekoliko antivirusnih gena kod štakora usijed infekcije virusom SEOV što ukazuje kako spolni hormoni mogu izravno utjecati na spolno različite protuvirusne odgovore (Hannah, Bajic, i Klein 2008). Također, s obzirom na to da mušjaci imaju različite spolne kromosome, a pojedini geni koji reguliraju imunski odgovor nalaze se na kromosomu X, male razlike u alelima će vjerojatno biti jače vidljive kod muškaraca nego kod žena (S.L. Klein i Roberts 2010). Težina HVBS-a djelomično ovisi o genetskim čimbenicima bolesnika (učestalost pojedinih HLA haplotipova, polimorfizam imunskih i drugih gena) (Mustonen i ostali 1996; Mäkelä i ostali 2001; M. L. Wang i ostali 2009; Misa Korva i ostali 2011). Spolni

polimorfizmi u genu IL-1 $\beta$  predviđaju težinu i postojanost virusa hepatitisa C kod muškaraca (Yue Wang i ostali 2003). U bolesnika s HVBS prisutan je individualan odgovor na infekciju (Jonsson, Figueiredo, i Vapalahti 2010) što je dokazano i u našem istraživanju gdje je bio prisutan individualni odgovor donora na infekciju virusima PUUV i TULV.

Prepoznavanje virusa od strane imunskog sustava prvi je i najkritičniji korak u odgovoru organizma na virusnu infekciju. Prepoznavanje virusa obavljaju citoplazmatske senzorne molekule, koje prepoznaju jedinstvene virusne „uzorke“ (npr. virusnu dvolančanu RNA). Nakon prepoznavanja virusa, senzorne molekule pokreću signalne kaskade koje induciraju antivirusni odgovor s pojačanom ekspresijom antivirusnih molekula i/ili molekula upale (npr. interferoni) (Gack 2017). Također, intrinzični odgovor stanica na virusnu infekciju definira vrstu i jačinu kasnijeg sustavnog odgovora te može imati snažne učinke na ishod virusne infekcije i zaustavljanje infekcije ili napredovanje do razvoja bolesti (Kell 2022). Patogeni i apatogeni ortohantavirusi koriste različite i specifične integrinske receptore za ulazak virusa u stanice. Patogeni virusi koriste integrin  $\alpha_v\beta_3$ , dok apatogeni koriste integrin  $\alpha_5\beta_1$  (I. N. Gavrilovskaya i ostali 1998; 1999; E. R. Mackow i Gavrilovskaya 2001). Svi ortohantavirusi induciraju interferon (IFN) tipa I u inficiranim stanicama, ali se razlikuju u jačini i trajanju proizvodnje IFN te u daljnjem imunskom odgovoru (Geimonen i ostali 2002; Spiropoulou i ostali 2007; Handke i ostali 2009; Matthys i ostali 2011). Tako patogeni ortohantavirusi uspješno izbjegavaju ranu indukciju IFN tipa I pomoću svojih proteina te time omogućuju nesmetanu replikaciju unutar stanica (Kraus i ostali 2004). Kod infekcije virusom PUUV je u endotelnim stanicama i staničnoj liniji akutne monocitne leukemije (THP-1) povećanje IFN- $\beta$  počelo tek od 8 sati n.i., sa značajnim povećanjem zabilježenim 24 i 48 sati n.i. (Bourquain i ostali 2019). Apatogeni ortohantavirus Prospect Hill virus (PHV) nije uspio suprimirati proizvodnju IFN tipa I što je dovelo do ranog sprečavanja replikacije virusa u stanicama (Matthys i Mackow 2012). Ipak, u stanicama THP-1 inficiranim virusom TULV se povećanje IFN- $\beta$  pojavilo od 6-8 sati n.i., s trendom smanjivanja od 8 sati n.i. nadalje (Bourquain i ostali 2019). Također, apatogeni virus TULV se uspješno replicira u ljudskim endotelnim stanicama, što ukazuje kako osim regulacije indukcije IFN- $\beta$  postoje i drugi čimbenici koji utječu na sposobnost ortohantavirusa da budu patogeni (Matthys i ostali 2011; Matthys i Mackow 2012).

Virusni proteini Gn i NSs povezani su s inhibicijom staničnog interferonskog odgovora (Jääskeläinen i ostali 2007b; 2008; Alff i ostali 2008; Matthys i ostali 2011). Također, citoplazmatski dio proteina Gn patogenog ortohantavirusa NY-1 (NY-1V) inhibirao je

aktivaciju NF- $\kappa$ B i IFN- $\beta$  dok citoplazmatski dio proteina Gn apatogenog virusa PHV nije uspio inhibirati transkripcijske odgovore NF- $\kappa$ B ili IFN- $\beta$  (Alff i ostali 2008). Dokazane razlike u ulasku, utjecaju virusnih proteina i inhibiciji kaskade signala urođenog imunskog odgovora igraju ulogu u patogeničnosti ortohantavirusa (Spiropoulou i ostali 2007; Shim i ostali 2011). Slijedom navedenog, htjeli smo dati doprinos razjašnjavanju razlika u urođenom imunskom odgovoru između patogenih i apatogenih ortohantavirusa pa smo kao modele virusa uzeli patogeni virus PUUV i apatogeni virus TULV. U radu Raftery i suradnika 2020. prikazano je kako patogeni, ali ne i apatogeni ortohantavirusi mogu inficirati monocite, dendritičke stanice i nezrele stanice MDDC te imati produktivnu replikaciju.

Monociti su trenutno klasificirani u tri subpopulacije na temelju diferencijalne ekspresije molekula CD14 i CD16. Monocitne subpopulacije jedna su linija stanica u različitim fazama diferencijacije (Wong i ostali 2011). Subpopulacije monocita se uz osnovne razlike u fenotipskim značajkama, razlikuju i po svojim funkcijama i aktivnostima te pokazuju i neke jedinstvene značajke (Weber i ostali 2000). Subpopulacije monocita značajno su promijenjene tijekom akutne faze infekcije HTNV-om u bolesnika s HVBS-om. U bolesnika monociti prolaze kroz aktivaciju i ekspanziju subpopulacija; intermedijarni monociti (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) značajno su povećani (20 – 30 %), a klasični (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) te neklasični (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) značajno su smanjeni (J. Wang i ostali 2014; Tang i ostali 2015; X. Li i ostali 2018; Vangeti i ostali 2021). U drugom istraživanju su, međutim, tijekom akutne faze HVBS-a u bolesnika inficiranih virusom PUUV bile značajno smanjene sve subpopulacije monocita i DC-ova (Scholz i ostali 2017). Smanjivanje subpopulacija monocita i DC-ova u krvi autori su objasnili kao posljedicu mobilizacije stanica te izlaska iz cirkulacije u tkiva, na mjesta upale (Scholz i ostali 2017).

Infekcije monocita u ovom istraživanju prikazuju pretpostavljeno stanje u organizmu prije širenja virusa i sistemske infekcije organizma koja prethodi akutnom stanju bolesti u bolesnika oboljelih od HVBS-a. U našem istraživanju su klasični i intermedijarni monociti u 1 h n.i. bili statistički značajno smanjeni kod infekcije virusom PUUV u odnosu na neinficirane stanice i u odnosu na infekcije virusom TULV, a samo intermedijarni u 1 h n.i. kod virusa TULV u odnosu na neinficirane stanice. Značajno smanjenje intermedijarnih monocita kod oba virusa ukazuje na gubitak sposobnosti prezentacije antigena, jer je poznato kako intermedijarni monociti imaju najvišu razinu ekspresije molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti razreda II (MHC II, od engl. *major histocompatibility complex, class II*) i kostimulacijskog receptora CD40 od svih monocitnih subpopulacija (Wong i ostali 2011).

Tokom praćenja vremena infekcije vidljiv je pad postotka CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> stanica te povećanje postotka CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> stanica kao posljedica infekcije ortohantavirusima te u manjoj mjeri uvjeta kultivacije. Također, protokom vremena infekcije, vidljivo je smanjenje indeksa obojenja monocitnih markera CD14 i HLA-DR, što ukazuje na gubitak sposobnosti prezentacije antigena, a moguće i na ulazak virusa PUUV u stanicu preko receptora CD14. Zanimljivo je kako su u 48 h n.i. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> stanice kod virusa TULV bile statistički značajno povećane u odnosu na virus PUUV što ukazuje na sudjelovanje u suprimiranju virusa kod monocita/MDM inficiranih virusom TULV. Nadalje, u 48. h n.i. su CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> stanice kod virusa PUUV i TULV bile statistički značajno više u odnosu na neinficirane stanice te također kod virusa PUUV u odnosu na virus TULV.

Kultivacijom u uvjetima *in vitro* monociti adheriraju na plastiku i počinju spontanu diferencijaciju u stanice MDM ili MDDC (L. Fantuzzi i ostali 1999). Poznato je kako odabir metode izolacije, separacije i kultivacije monocita (izolacija adherencijom na plastiku, elutriacijom, Ficoll/Percoll gradijentom; separacija pozitivnom selekcijom magnetskim mikrokuglicama s CD14 protutijelima, negativnom selekcijom magnetskim mikrokuglicama; kultivacija M-CSF-om ili GM-CSF-om; metode odvajanja stanica) mogu imati različite učinke na izolaciju subpopulacija, razine ekspresije površinskih markera i funkciju stanica te tako djelomično utjecati na rezultate (L. Fantuzzi i ostali 1999; Gessani, Fantuzzi, i Belardelli 2000; L. Zhou i ostali 2012). U ovom smo istraživanju odabrali izolaciju na gradijentu gustoće (Ficoll) i separaciju negativnom selekcijom magnetskim mikrokuglicama kako bismo dobili intaktne sve subpopulacije monocita (klasične, intermedijerne i neklasične monocite) te smo ih kultivirali uzgojem na neobloženoj plastici za stanične kulture ili na foliji „Lumox“ kako bi monociti što manje adherirali na podlogu te što kasnije krenuli u diferencijaciju. Stanice smo odvajali otopinom EDTA za koju smo dokazali kako u najmanjoj mjeri utječe na smanjenje ekspresije površinskih molekula od interesa. U ovom smo istraživanju odabrali izolaciju/kultivaciju svih subpopulacija monocita, koja nalikuje stanju subpopulacija monocita u krvi, radi dobivanja što objektivnije slike infekcije monocita ortohantavirusima.

Primarni monociti izolirani iz PBMC-ova mogu u uvjetima *in vitro* biti diferencirani u CD14<sup>++</sup> MDM-ove, pomoću kultivacije citokinom M-CSF kroz 5 – 7 dana (Italiani i Boraschi 2014). Doduše, takve stanice su nezrele te ih je potrebno aktivirati u željeni pro- ili protuupalni oblik kultivacijom željenim citokinima kroz naredna dva dana (H. Liu i ostali 2008; Italiani i Boraschi 2014; Ginhoux i ostali 2016). Proces diferencijacije potpomaže pozitivna povratna sprega M-CSF-a i njegovog receptora CSF1R (H. Liu i ostali 2008). Također, rano u

procesu diferencijacije povećava se ekspresija gena za kemokine, uključujući CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL24 i CXCL5 (Mantovani, Bonecchi, i Locati 2006; H. Liu i ostali 2008). Monociti kultivirani u uvjetima *in vitro* diferenciraju se i aktiviraju, ali ne proliferiraju (L. J. Zhou i Tedder 1996). Međutim, tijekom ranih sati kultivacije smanjuje se ekspresija MHC II što upućuje na smanjenje sposobnosti prezentacije antigena (H. Liu i ostali 2008). Ipak, monociti bolesnika imali su povećane razine molekula HLA-DR, što ukazuje na aktivaciju i migraciju monocita u periferna tkiva tijekom akutne faze HVBS-a (Vangeti i ostali 2021). U istraživanju virusa krimsko-kongoanske hemoragijske vrućice (od engl. *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, CCHFV) primijećeni su pokazatelji neispravne aktivacije imunskog odgovora zbog nedovoljnog povećanja ekspresije molekula MHC II kod makrofaga i DC-ova (Bente i ostali 2010). Prezentacija antigena putem molekula MHC II te adekvatne razine molekula MHC II potrebne su za aktivaciju adaptivnog imunskog odgovora (aktivaciju naivnih T-limfocita), stoga niske razine ekspresije molekula MHC II mogu ometati sposobnost kontrole virusne infekcije (Bente i ostali 2010). I u ovom istraživanju smo 1 sat n.i. pokazali vidljivo smanjenje površinske ekspresije monocitnih markera CD14 i HLA-DR, kod monocita inficiranih virusom PUUV u odnosu na neinficirane monocite, što ukazuje na gubitak sposobnosti prezentacije antigena. Također, dokazano je statistički značajno smanjenje površinske ekspresije HLA-DR 1 sat n.i., kod monocita inficiranih virusom PUUV u odnosu na monocite inficirane virusom TULV što ukazuje na veću moć/sposobnost patogenog virusa PUUV u blokiranju predočavanja antigena putem molekule HLA-DR te većoj sposobnosti izbjegavanja/odgađanja imunskog odgovora stanice.

Rezultati pokazuju kako su u ovom istraživanju monociti uslijed infekcije ortohantavirusima odgovorili istovremeno i pro- i protu-upalno, tzv. miješanim signalom M1/M2 monocita, s obzirom na to da je zabilježena povećana genska ekspresija pro- i protu- upalnih gena, pro- i protu- upalnih solubilnih citokina i kemokina u ranoj fazi infekcije. Koncept miješanog M1/M2 odgovora monocita s M1/M2 fenotipom je relativno nov te odražava M1/M2 polarizaciju makrofaga, a opisan je većinom kod kroničnih i autoimunih bolesti (sistemske skleroze, sistemskog juvenilnog idiopatskog artritisa, dijabetesa), tumorskih stanica, ali opisan je i u virusnih infekcija. U bolesnika s COVID-19 periferni monociti imali su proupalni miješani M1/M2 fenotip s diferencijacijom u stanice MDM (D. Zhang i ostali 2021). Inficirani monociti su bili morfološki veći (visoki FSC) te su imali površinsku ekspresiju CD80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>, a unutarstanično bojanje je pokazalo značajno povećanje IL-6 i

TNF- $\alpha$ , ali i povećanje IL-10 (D. Zhang i ostali 2021). Kod infekcije hepatalne stanične linije virusom hepatitisa C (HCV) pokazana je diferencijacija monocita u MDM s M2 površinskim fenotipom (CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> CD209<sup>+</sup>) te mješanim M1/M2 profilom izlučenih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF- $\beta$ ), dok je u bolesnika s kroničnom infekcijom virusom HCV molekula CD206 bila povećan na monocitima (Saha et al. 2016). I u bolesnikaoboljelih od HVBS zabilježen je takav profil monocita u krvi bolesnika s površinskom ekspresijom CD206 i CD163 (J. Wang i ostali 2014; X. Li i ostali 2018), iako nije terminološki nazvan miješanim signalom M1/M2 monocita.

U ovom istraživanju u kasnoj fazi infekcije inficirane stanice diferenciraju u stanice MDM slične tipu M2 uslijed povećane genske ekspresije protuupalnih gena, ali i solubilnih citokina i kemokina te ekspresije površinskog markera CD206.

Makrofagi posjeduju veliku plastičnost te se uslijed uvjeta mikrookoliša aktiviraju. Aktivacija u proupalno (M1) ili protuupalno (M2) aktivacijsko stanje makrofaga, koncept je preuzet iz modela aktivacije T-limfocita u Th1 ili Th2 (Mosser i Edwards 2008; Sica i Mantovani 2012). Za M1 makrofage je karakteristična velika fagocitna aktivnost, veliki kapacitet prezentacije antigena i pojačano izlučivanje proupalnih citokina i kemokina, što inducira aktivaciju Th1 odgovora limfocita i olakšava fagocitozu posredovanu komplementom (Atri, Guerfali, i Laouini 2018). Kod nekoliko virusnih infekcija, polarizacija u M1 pogoduje uspostavljanju virusne infekcije (Herbein i Varin 2010). M2 makrofagi moduliraju Th2 odgovor limfocita izlučivanjem protuupalnih medijatora, što dovodi do nakupljanja neutrofila, monocita i T limfocita (Nikitina i ostali 2018). Stanice MDM slične tipu M2 imaju izraženiju endocitozu i djelomične fagocitoze, uključeni su mehanizme popravka, homeostazu, metaboličke procese i patogenezu (Nikitina i ostali 2018). Treba naglasiti kako su M1 i M2 aktivacijska stanja makrofaga samo ekstremi u kontinuumu mnoštva aktivacijskih stanja (Mosser i Edwards 2008; Sica i Mantovani 2012), gdje aktivacija varira od ranog proupalnog M1 stanja do kasnijeg protuupalnog M2 stanja (Malyshev i Malyshev 2015). Svaki fenotip se javlja kao odgovor na određeni podražaj, M1 kao odgovor na stimulaciju LPS-om i/ili IFN- $\gamma$ ; M2a kao odgovor na IL-4/IL-13; M2b kao odgovor na IgG imunosne komplekse; M2c kao odgovor na glukokortikoide, IL-10 ili TGF- $\beta$ , a varijabilnost izraženih markera koji nisu ograničeni na M1 i M2 stanje označavamo kao stanice MDM slične tipu M1 ili M2 (Biswas i Mantovani 2010; Malyshev i Malyshev 2015; Atri, Guerfali, i Laouini 2018; Nikitina i ostali 2018). Pri promjenama uvjeta mikrookoliša MDM i makrofagi mijenjaju svoje aktivacijsko stanje iz M1 u M2 i obratno (Malyshev i Malyshev 2015; Atri, Guerfali, i Laouini 2018; Nikitina i ostali

2018). Također, virusi i bakterije mogu aktivno suprimirati antibakterijske i antivirusne modulatore imunskog odgovora reprogramiranjem makrofaga u M2 fenotip (Malyshev i Malyshev 2015). Naravno, u uvjetima *in vivo* postoji obično nekoliko istovremenih podražaja koji utječu na makrofage i MDM (Sica i Mantovani 2012; Vogel i ostali 2014).

Molekula CD206/*MRC1* transmembranski je endocitni receptor koji pripada porodici lektina tipa C te veže manozne-, fukozne- i N-acetilglukozaminske- glikoproteine, a prvotno je nazvan manozni receptor (MR, or engl. *mannose receptor*) (Gordon i Plüddemann 2019). Molekula CD206/*MRC1* prototipski je marker aktivacije M2 makrofaga (Gordon i Plüddemann 2019) jer inducira toleranciju T-limfocita i smanjenu citotoksičnost (van der Zande i ostali 2021). U organizmu je izražen u većini tkivnih makrofaga i DC-ova, u mikrovaskularnim endotelnim stanicama (jetre, slezene, limfe, kože) te nekim specijaliziranim stanicama, dok je s monocita odsutan, ali se brzo eksprimira tokom aktivacije i diferencijacije (Martinez-Pomares 2012). U uvjetima *in vitro* ekspresija molekule CD206 prisutna je na stanicama MDM i MDDC (Taylor, Gordon, i Martinez-Pomares 2005). Molekula CD206 se veže za manozne glikoproteine kojima su obloženi mnogi mikroorganizmi (Astarie-Dequeker i ostali 1999). Virus influenzae, dengue, virus hepatitisa B (HBV) i virus HIV-1 koriste receptore CD206, CD209 i CLEC5A za ulazak putem endocitoze u stanice MDM i MDDC u kojima izazivaju imunski proupalni odgovor (Arboleda Alzate i ostali 2017; Monteiro i Lepenies 2017). Također, glikoproteini Gn i Gc virusa HTV bogati su manozom (X. Shi i Elliott 2004) pa možemo pretpostaviti moguće korištenje receptora CD206 za ulazak virusa HTV u stanice. Fagocitoza posredovana receptorom CD206 povećava ekspresiju receptora PPAR $\gamma$  (od engl. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), koji suprimira aktivaciju NF- $\kappa$ B, a potiče izlučivanje molekule/kemokina CXCL8 (Rajaram i ostali 2010). Izlučivanje kemokina CXCL8 je u ovom istraživanju bilo značajno povećano kod infekcije s oba virusa u odnosu na neinficirane stanice samo 1 sat n.i., dok je genska ekspresija CXCL8 bila značajno povećana samo kod monocita inficiranih virusom TULV u odnosu na neinficirane stanice i to samo u ranoj fazi infekcije (1 i 24 sata n.i.).

U bolesnika s HVBS dokazano je kako su monociti u krvi imali povećanu ekspresiju markera CD206<sup>+</sup> i CD163<sup>+</sup>, a promjene u ekspresiji markera CD163 i CD206 bile su u pozitivnoj korelaciji s težinom bolesti (X. Li i ostali 2018). Zanimljivo je kako je marker CD206 prisutan u krvi kod aktiviranih monocita dok je odsutan s intaktnih monocita u krvi. U ovom je istraživanju površinska ekspresija markera CD206 kod stanica inficiranih virusom PUUV bila značajno povećana tijekom cijelog vremena infekcije te kod stanica inficiranih virusom



TULV 48 sati i 7 dana n.i. u odnosu na neinficirane stanice. Jačina signala površinske ekspresije 7 dana n.i. je bila (iako bez statističke značajnosti) iznad razine ekspresije M2 MDM pozitivne kontrole, a ispod razine MDDC pozitivne kontrole, istovremeno diferenciranih iz istih donora. Možemo zaključiti kako su inficirani monociti, u ovom istraživanju, ekspresijom markera CD206 bili bliži stanicama MDM sličnih tipu M2 nego stanicama MDDC, što potvrđuje diferencijaciju i smjer aktivacije monocita u stanice MDM slične tipu M2. Genska ekspresija *MRC1* bila je, u ovom istraživanju, značajno povećana tokom većine vremena praćenja infekcije kod infekcije s oba virusa u odnosu na neinficirane stanice, a snažno se povećavala u ranoj fazi infekcije te onda stagnirala do kraja infekcije. U našem istraživanju, ekspresija površinskih markera se nije razlikovala kod stanica inficiranih patogenim u odnosu na stanice inficirane apatogenim virusom. Ipak, zanimljivo je kako je u našem istraživanju površinska ekspresija markera CD206 1 sat n.i. bila statistički značajno povećana kod monocita inficiranih virusom PUUV u usporedbi s monocitima inficiranim virusom TULV, što ukazuje na pokretanje imunskog odgovora stanica od samog početka infekcije i veći utjecaj patogenog virusa PUUV na supresiju aktivacije monocita i smjer diferencijacije od apatogenog virusa TULV. Također je u ranoj fazi infekcije izlučivanje proupalnih citokina i kemokina (IL1- $\beta$ , IL-6, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8) bilo izraženije kod monocita inficiranih virusom TULV u usporedbi s monocitima inficiranim virusom PUUV.

Receptor CD209 (deskriptivni naziv DC-SIGN je od engl. *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*) također pripada porodici lektina C-tipa i ključan u migraciji DC-ova i uspostavljanju prvog kontakta s T-limfocitima, u prenošenju informacija imunskog odgovora preko prepoznavanja ICAM-3 te u interakcijama s endotelnim ICAM-2 (Relloso i ostali 2002). Receptor CD209 je specifičan za nezrele i zrele DC u perifernim organima (Geijtenbeek i ostali 2000; Relloso i ostali 2002), marker je diferencijacije stanica MDDC (Relloso i ostali 2002), ali ga eksprimiraju i stanice MDM (Lugo-Villarino i ostali 2018). Receptor CD209 nije izražen na monocitima niti aktiviranim monocitima (Geijtenbeek i ostali 2000). U istraživanja na hepatalnim stanicama inficiranih virusom HCV, kod obe MDM pozitivne kontrole inducirane u stanice M1 (GM-CSF-om ili IFN $\gamma$ +LPS) te M2 MDM (M-CSF-om ili IL-4) primjećeno je povećanje ekspresije molekula CD40 i CD209, što ukazuje na izraženost ovih markera u oba polarizirajuća stanja stanica MDM (B. Saha, Kodys, i Szabo 2016). Također, u našem istraživanju su pozitivne kontrole, stanice MDDC (diferencirani GM-CSF-om+IL-4), ali i M2 MDM (diferencirani M-CSF-om pa inducirani IL-4) imale

površinsku ekspresiju receptora CD209. Na inficiranim stanicama, u našem istraživanju, je površinska ekspresija receptora CD209 48 sati n.i. kod infekcije virusom PUUV bila statistički značajno povećana u odnosu na neinficirane stanice, ipak bila je vrlo niska u odnosu na ekspresiju receptora CD209 na pozitivnim kontrolama M2 MDM i MDDC diferenciranih od istih donora. Stoga, uslijed vrlo niske površinske ekspresije receptora CD209, možemo zaključiti kako inficirani monociti u našem istraživanju ne diferenciraju u MDDC.

U našem istraživanju je površinska ekspresija molekule CD163 (marker M2c MDM/makrofaga) bila slaba, bez razlika u odnosu na neinficirane stanice. Ipak, 7 dana n.i. marker CD163 bio je statistički značajno povećan kod stanica inficiranih virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranih virusom TULV. Fenotip stanica M2c MDM/makrofaga se razvija kao odgovor na stimulaciju glukokortikoidima, citokinima IL-10 ili TGF- $\beta$  (Biswas i Mantovani 2010). U ovom je istraživanju izlučivanje TGF- $\beta$ 1 bilo značajno povećano kod oba virusa u odnosu na neinficirane stanice tek 7 dana n.i.. Moguću funkcionalnu aktivaciju inficiranih stanica u M2c MDM fenotip bi bilo poželjno dalje istražiti.

U ovom istraživanju je ekspresija molekule/receptora CD40 (marker M1 MDM/makrofaga) na inficiranim monocitima, bila niska u odnosu na pozitivne kontrole. Kod TULV je receptor CD40 48 sati n.i. bio značajno povećan u odnosu na neinficirane stanice, dok u stanicama inficiranim virusom PUUV nije bilo razlika u odnosu na neinficirane stanice. Također, između virusa nije bilo razlika u površinskoj ekspresiji CD40. Zanimljiv je rezultat kako ortohantavirusi na monocitima ne aktiviraju receptor CD40 te razina ekspresije ostaje na razini neinficiranih stanica. Receptor CD40 je kostimulacijska molekula izražena na površini antigen prezentirajućih stanica, B-limfocita i mnogih ne-imunosnih stanica (Elgueta i ostali 2009), a vezanjem na CD40L pokreće aktivaciju stečenog imunskog sustava, prvenstveno razvoj citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita (Ara, Ahmed, i Xiang 2018). Interakcija molekula CD40-CD40L na površini potiče unutarstaničnu aktivaciju više signalnih puteva (npr. NF- $\kappa$ B) te povećanje upalnih citokina i kemokina (Quezada i ostali 2004). Ukoliko izostane kostimulacijski signal CD40-CD40L razvija se tolerancija umjesto imunskog odgovora (Quezada i ostali 2004). Genska ekspresija CD40LG bila značajno povećana 6 sati n.i. u stanicama inficiranim virusom PUUV, a značajno smanjena 48 h p.i. u oba virusa u odnosu na neinficirane stanice. Iz ovih rezultata možemo zaključiti kako je izostanak povećanja

ekspresije CD40 te smanjenje ekspresije CD40LG bio utjecan „mimikrijom“ oba virusa te kako monociti inficirani ortohantavirusima ne diferenciraju u stanice M1 MDM.

Receptor na monocitima CCR2 važan je za mobilizaciju monocita iz koštane srži u periferna tkiva te „putovanje“ na mjesta upale gdje se oni diferenciraju ovisno o signalima iz mikrookoliša u „rješavanju“ virusnih, bakterijskih, gljivičnih infekcija i infekcija praživotinjama (Yuanfan Wang i ostali 2009, 2; C. Shi i Pamer 2011). Kultivacijom u uvjetima *in vitro* monociti mijenjaju oblik i funkcije. U ovom istraživanju inficirani su monociti tijekom vremenskog praćenja infekcije povećali veličinu stanica te povećali granuliranost. U jednom istraživanju monociti su pod utjecajem CCL2 promijenili oblik od okruglih u izduljene stanice (Wisniewski i ostali 2010). Kultivacijom monociti gube karakteristične monocitne markere *CCR2* i *CCR3*, dok markeri *CCR1*, *CCR4*, *CCR5* i *CXCR4* ostaju nepromijenjene ekspresije na površini stanica te genske ekspresije (Di Marzio, Tse, i Landau 1998; L. Fantuzzi i ostali 1999). Postupno smanjenje ekspresije *CCR2* na monocitima i paralelno povećanje izlučivanja CCL2 potaknuto adhezijom i diferencijacijom rezultira nestankom *CCR2* s diferenciranih stanica MDM koji su potom neosjetljivi na CCL2, što predstavlja mehanizam povratne sprege u regulaciji odgovora monocita/MDM-ova na upalu (L. Fantuzzi i ostali 1999). Sekvenciranje RNA nove generacije pokazalo je kako je *CCR2* bio među 10 najznačajnijih gena sa smanjenom ekspresijom tijekom diferencijacije monocita u makrofage, što potvrđuje kako kultivacijom, prianjanjem za površinu i diferencijacijom monocita u stanice MDM, monociti gube *CCR2* (Dong i ostali 2013). U ovom istraživanju zanimljiv je rezultat značajnog smanjenja genske ekspresije *CCR2* u ranim satima nakon infekcije virusom PUUV (1 sat n.i.) ili virusom TULV (1 i 6 sati n.i.) u odnosu na neinficirane stanice, dok je istovremeno u STNT-u CCL2 bio značajno povećan u odnosu na neinficirane stanice. Štoviše, u stanicama inficiranih virusom TULV je 1 sat n.i. ekspresija gena *CCR2* bila značajno smanjena u odnosu prema stanicama inficiranih virusom PUUV. U radu švedskih autora površinska je ekspresija *CCR2* bila smanjena na klasičnim monocitima i CD1c+ mDC nakon 40 sati n.i. kod virusa PUUV u odnosu na neinficirane stanice (Scholz i ostali 2017). S obzirom na to da je uočena smanjena genska ekspresija *CCR2* kod inficiranih stanica u ovom istraživanju, neovisno o patogenosti virusa, postoji mogućnost kako ortohantavirusi i preko receptora *CCR2* ulaze u monocite. Za monocitni receptor *CCR5* pokazano je kako u HVBS bolesnika genotip *CCR5* ne utječe na osjetljivost na infekciju ortohantavirusom (iako su bolesnici homozigoti za funkcionalni *CCR5* imali dulji oporavak zbog dulje oligurne faze i nižeg broja trombocita u usporedbi s heterozigotima) (Kletenkov i

ostali 2019). Nadalje, CCR5 i CXCR4 važni su ko-receptori za virus HIV-1 (Di Marzio, Tse, i Landau 1998; Laura Fantuzzi i ostali 2019). U drugom je istraživanju, kod inficiranih stanica MDM s virusom HTNV, virusom ANDV ili virusom SNV, genska ekspresija *CCR1* i *CCR5* bila povećana (Alemka Markotić i ostali 2007b). Naši rezultati su, naprotiv, pokazali kako nije bilo razlike u ekspresiji gena *CCR5* između inficiranih i neinficiranih monocita, niti kod stanica MDM tijekom cijelog vremenskog trajanja infekcije. Stoga iz našeg istraživanja možemo zaključiti kako ortohantavirusi ulaskom u stanice ne potiču ekspresiju CCR5 u primarnim monocitima. U jednom istraživanju infekcija virusom influence A izazvala je brzo smanjenje CCR2 na monocitima, dok inaktivirani virus nije značajno promijenio površinsku ekspresiju CCR2, a ekspresija molekula CCR1 i CCR5 je ostala nepromijenjena nakon virusne infekcije (Salentin i ostali 2003). Budući da je u našem istraživanju genska ekspresija *CCR2* bila značajno smanjena kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV, možemo zaključiti kako je smanjenje *CCR2* prisutno uslijed infekcije ortohantavirusima i odgovora monocita te kultivacije, a neovisno o patogenosti ortohantavirusa. U jednom je istraživanju pokazano kako je površinska ekspresija CXCR4 bila prisutna na monocitima prije kultivacije, dok se u 24 sata kultivacije povećala, a potom bila nemjerljiva u 7. danu kultivacije (L. Fantuzzi i ostali 1999). U drugom je istraživanju postojala ekspresija CXCR4 na monocitima prije kultivacije, a potom pala na nemjerljivu razinu u roku od 24 sata do 7. dana kultivacije (Di Marzio, Tse, i Landau 1998). Naši rezultati, također, pokazuju naglo smanjenje genske ekspresije *CXCR4* gdje je kod stanica inficiranih virusom PUUV statistički značajno smanjena u 24 sata n.i. te kod stanica inficiranih virusom TULV u 24 i 48 sati n.i. u odnosu na neinficirane stanice, a kasnije povećanje ekspresije nije bilo statistički značajno. Receptor CXCR4 sudjeluje u popravku i regeneraciji tkiva, povezan je s proliferacijom stanica raka, hematopoezom i navođenjem stanica te zadržavanjem monocita u koštanoj srži i aktivacijom matičnih stanica (Bianchi i Mezzapelle 2020). Primarni ligandi za CXCR4 su CXCL12 i MIF. Koncentracija MIF je, u ovom istraživanju, bilo značajno povećana kod stanica inficiranih virusom TULV (1 – 6 sati n.i.) i virusom PUUV (6 sati n.i.) u odnosu na neinficirane stanice, a kasnije nije imao nikakvih značajnih razlika u dinamici i oscilaciji izlučivanja u STNT. MIF je pleiotropni upalni citokin i važan uzvodni medijator urođene imunosti, koji je pohranjen u citoplazmi te inhibira apoptozu izazvanu aktivacijom stanica (Grieb i ostali 2010; Rajasekaran i ostali 2016). Očito upalni signali izazvani ortohantavirusima nisu bili dovoljno opsežni kako bi se MIF jače aktivirao.

Geni primarnog odgovora stanice javljaju se od 0 do 8 h nakon podražaja, dok se geni sekundarnog odgovora javljaju od >12 h nakon podražaja (Donato i ostali 2013). U našem su istraživanju geni primarnog odgovora, za proupalne citokine i kemokine (*TNF*, *IL6*, *CXCL8*) bili povećani 1 i/ili 6 sati n.i. samo kod monocita inficiranih virusom TULV, dok kod monocita inficiranih virusom PUUV nisu bili povećani. Vidljivo je kako je upalni odgovor stanice jače izražen kod monocita inficiranih virusom TULV što očito rezultira suzbijanjem infekcije i replikacije ovog ortohantavirusa, potvrđujući apatogenu narav virusa. Ekspresija ostalih gena primarnog odgovora (*IL1RN*, *CCL13*, *MRC1*) koji su se također javili 1 sat n.i. bila je jednaka kod monocita inficiranih virusom PUUV i virusom TULV. Značajno povećanje ekspresije gena *IL1RN* dokazano je 1 sat n.i. kod monocita inficiranih virusom TULV te 1 i 6 sati n.i. kod monocita inficiranih virusom PUUV, što je puno ranije od značajnog povećanja ekspresije gena *IL1 $\beta$*  od 24 do 48 sati n.i. Značajno povećanje genske ekspresije *IL1RN* tako rano u fazi infekcije, a prije pojave *IL1 $\beta$*  ukazuje kako virus u monocitima pokušava utišati upalni odgovor te pospješiti širenje infekcije. Ipak, u ranim fazama infekcije (1 – 24 sati n.i.) dominira sinteza proupalnih citokina i kemokina te genska ekspresija proupalnih gena citokina, kemokina kao i utišavanje gena za receptore i gena stimuliranih virusom. Naprotiv, (Cvetko Krajinović, Lidija 2014) pokazala je supresiju ranog imunskog odgovora, perifernih mononuklearnih stanica u bolesnika inficiranih virusom PUUV, na razini ekspresije gena važnih za sintezu receptora za prepoznavanje općih struktura, kemokina i njihovih receptora, citokina, faktora transkripcije, kao i nekih signalnih molekula. U ovom su istraživanju u ranim fazama infekcije značajno smanjenu ekspresiju pokazali samo geni za receptore *CCR2*, *CXCR4* i kemokin *CXCL10* kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u odnosu na neinficirane stanice.

Većina solubilnih proupalnih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF) i kemokina (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 i MIF) dosegla je vrhunac izlučivanja u STNT-u 24 sata n.i., smanjujući se u kasnoj fazi infekcije. Poznato je kako TNF- $\alpha$  utječe na razinu ekspresije više receptora (smanjenjem ili povećanjem ekspresije), među njima je i CD55 (DAF) koji ortohantavirusi koriste za ulazak u stanice (Krautkrämer i Zeier 2008). Nadalje, poznato je kako TNF- $\alpha$  smanjuje ekspresiju *CCR5* i *CXCR4* što rezultira smanjenjem infekcije virusom HIV (Bailer, Lee, i Montaner 2000). S obzirom na to da je, u našem istraživanju, ekspresija gena *TNF* bila značajno povećana samo kod monocita inficiranih virusom TULV 1 sat n.i., možemo pretpostaviti kako također i TNF- $\alpha$  utječe na nemogućnost virusa TULV da zarazi daljnje stanice.

U ovom istraživanju je ekspresija gena *CCL13* bila povećana u inficiranim monocitima u skoro svim vremenskim točkama kod oba virusa u odnosu na neinficirane stanice. Kemokini pripadaju porodici  $\alpha$ -kemokina (CXC kemokini, npr. CXCL8, CXCL10) ili porodici  $\beta$ -kemokina (CC kemokini npr. CCL2, CCL4, CCL5, CCL13). CXC kemokini utječu i prvenstveno privlače neutrofile, dok CC kemokini privlače i utječu na monocite, eozinofile i T-limfocite (Berkhout i ostali 1997). CCL13 je član porodice CC kemokina koji su monocitni kemoatraktanti te je kemoatraktant za monocite, T-limfocite, nezrele DC i eozinofile (Mendez-Enriquez i García-Zepeda 2013). Molekula CCL13 je ligand za receptore CCR1, CCR2, CCR3, ACKR1 (DARC), ACKR2 (CCR9) (Berkhout i ostali 1997; Mendez-Enriquez i García-Zepeda 2013; K. Chen i ostali 2018). Molekula CCL13 je povezan s eozinofilijom u astmi, degranulacijom bazofila i eozinofila, s kemotaksijom monocita i izlučivanjem proupalnih citokina u reumatoidnom artritisu (propadanjem zglobova, proliferacijom hondrocita), multiplom sklerozom (aktivacija oligodendrocita i razaranje mijelina), pretilosti i aterosklerozom (stvaranje plakova) (Mendez-Enriquez i García-Zepeda 2013). Molekula CCL13 je također homeostatski kemokin u raznim tkivima – npr. u sekundarnim limfnim organima, i ima funkciju usmjeravanja (od engl. *homing*) T- i B- limfocita kao i DC (Mendez-Enriquez i García-Zepeda 2013; K. Chen i ostali 2018). Pokazano je kako se kemokin CCL13 oslobađa kao posljedica aktivacije NF- $\kappa$ B, zajedno s drugim kemokinima (Garcia-Zepeda i ostali 1996) te je također induciran i u Th1- i Th2-tipu imunskog odgovora (proupalnim citokinima TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$  te protuupalnim IL-4) (Garcia-Zepeda i ostali 1996; Mendez-Enriquez i García-Zepeda 2013). Molekula CCL13 se ipak više povezuje s modelom aktivacije T-limfocita u Th2 tip odgovora. Koncentracija kemokina CCL13 značajno je smanjena u serumu bolesnika oboljelih od HPS-a (Morzunov i ostali 2015). U jednom su istraživanju kod djece oboljele od respiratornih virusnih infekcija koncentracije kemokina CCL7 i CCL13 bile značajno povećane kod djece zaraženih virusom u usporedbi s uzorcima iste djece kada su bila asimptomatska, a koncentracije kemokina CCL7 i CCL13 su značajno korelirale s brojem makrofaga u uzorcima aspirata nosa (od engl. *nasal aspirate*) (Santiago i ostali 2008). Stanice MDM kao i MDCC luče CCL13 (Caux i ostali 2000; Schinnerling, García-González, i Aguillón 2015) pa na osnovi sinteze kemokina CCL13 ne možemo tvrditi smjer diferencijacije monocita uslijed infekcije ortohantavirusima.

U ovom istraživanju je izlučivanje kemokina CCL22 u supernatant bilo povećano samo 6 sati n.i. kod stanica inficiranih virusom PUUV ili TULV u odnosu na neinficirane stanice. Kemokin CCL22 izlučuju M2a makrofagi, stanice MDM, DC i MDCC te aktivirani B-limfociti, a veže se na CCR4 prisutan većinom na Th2 stanicama (Yashiro i ostali 2019).

Pretpostavljamo kako je u ovom istraživanju sinteza kemokina CCL22 bila potaknuta ekspresijom molekule CD206/*MRC1*.

Proupalni kemokin CXCL10 luče monociti, DC, neutrofili, hepatociti, fibroblasti, endotelne i druge stanice uslijed stimulacije s IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  preko signalnog puta ovisnog o NF- $\kappa$ B i STAT1, a potiče regrutaciju T-limfocita i NK-stanica, monocita i eozinofila (Yeruva, Ramadori, i Raddatz 2008; M. Liu i ostali 2011). U jednoj studiji pokazali su sinergijski učinak IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$  u indukciji kemokina CXCL10 kod crijevnih epitelnih stanica u uvjetima *in vitro* (Yeruva, Ramadori, i Raddatz 2008), dok su u drugoj studiji pokazali sinergijski učinak LPS-a i IFN- $\gamma$  u indukciji kemokina CXCL10 u neutrofilima (Tamassia i ostali 2007). Postoje također oprečne studije koje govore u prilog stimulacije izlučivanja kemokina CXCL10 induciranog s citokinom IFN- $\beta$  (Vazirinejad i ostali 2014). Koncentracija kemokina CXCL10 u bolesnika s HVBS-om povećana je u serumu, kao i u genskoj ekspresiji u stanicama PBMC, a također i kod drugih virusnih infekcija i bolesti (Jonas Klingström, Lindgren, i Ahlm 2008; P.-Z. Wang i ostali 2012; Cvetko Krajinović, Lidija 2014; Y. Zhang i ostali 2014). U uvjetima *in vitro* nakon infekcije s različitim ortohantavirusima sinteza kemokina CXCL10 bila je povećana i na genskoj i na proteinskoj razini u raznim stanicama, HMVEC, MDM i THP-1/PMA (Sundstrom i ostali 2001; Shin, Yanagihara, i Song 2012). U ovom istraživanju je, očekivano, koncentracija kemokina CXCL10 u STNT-u bila značajno povećana kod inficiranih monocita u odnosu na neinficirane stanice, kod infekcije virusom TULV značajno 48 sati n.i., a kod infekcije virusom PUUV 7 dana n.i. Zanimljivo je kako je u ovom istraživanju genska ekspresija *CXCL10* u inficiranim monocitima bila značajno smanjena u ranoj fazi infekcije (u 1. satu n.i. kod infekcije virusom TULV i u 1. i 6. satu n.i. kod infekcije virusom PUUV), dok je u kasnoj fazi infekcije bila značajno povećana samo kod infekcije virusom PUUV u odnosu na infekciju virusom TULV i na neinficirane stanice, štoviše kemokin *CXCL10* imao je najveću razinu ekspresije od svih proučavanih gena, dok je kod infekciju virusom TULV genska ekspresija *CXCL10* u kasnoj fazi infekcije bila značajno smanjena u odnosu na neinficirane stanice. U drugom istraživanju je u endotelnim stanicama genska ekspresija *CXCL10* kod apatogenog virusa PHV bila povećana već 1 dan n.i., a kod patogenih ortohantavirusa tek 4 dana n.i. (Geimonen i ostali 2002). Možemo zaključiti kako usprkos razlikama u vrsti stanica te stupnju diferencijacije indukcija sinteze kemokina CXCL10 različita je kod infekcije patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom. U ovom istraživanju je supresija sinteze kemokina CXCL10 kod infekcije apatogenim virusom TULV također povezana s viremijom u stanicama jer su stanice MDM

uspjele zauzdati infekciju virusom TULV, dok je kod infekcije virusom PUUV viremija u stanicama bila dokazana 48 sati n.i., a značajno povećano izlučivanje kemokina CXCL10 detektirano je od 5. do 7. dana n.i. kod infekcije virusom PUUV u odnosu na infekciju virusom TULV i na neinficirane stanice. Iako mjerljiva sinteza IFN- $\gamma$  u ovom istraživanju nije dokazana, a s obzirom na to da je sinteza kemokina CXCL10 u STNT-u kao i ekspresija gena bila povećana, očito mehanizam indukcije sinteze kemokina CXCL10 kod infekcije ortohantavirusima djeluje preko TNF- $\alpha$  te moguće i preko IFN- $\beta$ . Također, iako još uvijek postoje nepoznanice oko bioloških puteva i funkcija kemokina CXCL10, s obzirom na to da je u ovom istraživanju prisutno izlučivanje kemokina CXCL10 u STNT kod inficiranih stanica, usprkos početno značajno smanjenoj genskoj ekspresiji, možemo pretpostaviti kako kemokin CXCL10 postoji pohranjen u staničnim granulama.

U jednom istraživanju su monociti izloženi živom virusu herpes simplex tipa 1 (HSV-1), ili virusu inaktiviranom ultraljubičastim svjetlom, neovisno o podražaju, proizvodili zeleni fluorescentni protein (GFP, od engl. *green fluorescent protein*) što vjerojatno odražava unos/endocitozu virusnih čestica, a ne infekciju te time pokazali kako aktivna replikacija virusa HSV-1 nije potrebna za proizvodnju citokina (Cros i ostali 2010). Naprotiv, istodobno su fibroblasti proizvodili GFP samo kod infekcije živim virusom (Cros i ostali 2010). Također, u drugom istraživanju monocita inficiranih živom ili UV tretiranim virusom Ebola, su monociti neovisno o podražaju, bili aktivirani i proizvodili citokine te su zaključili kako nije potrebna aktivna replikacija virusa Ebola za aktivaciju monocita (Ströher i ostali 2001). Iz našeg istraživanja možemo također zaključiti kako za aktivaciju monocita i proizvodnju citokina te kemokina nije nužna produktivna replikacija ortohantavirusa u monocitima. Nadalje, možemo zaključiti kako je aktivacija monocita neovisna o vijabilnosti virusa, posljedica same prirode monocita kao efektorskih stanica urođene imunosti s pojačanim unosom i prezentacijom antigena. Zanimljivo je kako je, u ovom istraživanju, ekspresija molekule HLA-DR u 1. satu n.i. bila statistički značajno smanjena kod monocita inficiranih virusom PUUV u odnosu na monocite inficirane virusom TULV, što ukazuje kako patogeni virus PUUV ima utjecaj na sposobnost prezentacije antigena smanjujući molekulu HLA-DR na monocitima, za razliku od apatogenog virusa TULV koji ima isti indeks obojenja HLA-DR-a kao kod neinficiranih monocita. Patogeni virus PUUV može porementiti prezentaciju antigena, kako ga se ne bi prepoznalo.



Aktivnost transkripcijskog faktora *STAT1* izostaje ili je vrlo niska u svježe izoliranim monocitima, ali se spontano aktivira tijekom procesa diferencijacije monocita (Coccia i ostali 1999). Vremenski ovisna indukcija *STAT1* dobro korelira s povećanom ekspresijom nekih markera diferencijacije makrofaga (Coccia i ostali 1999). U ovom istraživanju je ekspresija *STAT1* bila povećana od 48 sati do 7 dana n.i. samo kod stanica inficiranih virusom PUUV, dok je kod stanica inficiranih virusom TULV bila povećana u 48 sati n.i. u odnosu na neinficirane stanice, sa značajnim razlikama među virusima gdje je gen *STAT1* kod infekcije virusom PUUV bio povećan od 48 sati do 7 dana n.i. u odnosu na infekciju virusom TULV. Citokin TGF- $\beta$ 1, koji inače inhibira proces sazrijevanja, aktivaciju i ekspresiju gena *STAT1*, u našim je pokusima bio značajno povećan tek 7 dana n.i. Stoga možemo pretpostaviti kako postoji još neki put inhibicije gena *STAT1*, koji je pod utjecajem samog virusa. Prilikom infekcija virusom PUUV, geni inducirani virusom *STAT1* i *IFITM3*, koji se inače potaknuti interferonom javljaju rano nakon ulaska virusa u stanice ovdje su značajno povećani tek od 48 sati do 7 dana n.i. (*STAT1* od 48 sati do 7 dana n.i.; *IFITM3* u 5 do 7 dana n.i.). Poznato je kako ortohantavirusi suprimiraju put interferona, što (pretpostavljamo) čine i u monocitima u ovom istraživanju, dok je u kasnoj fazi infekcije u stanicama MDM taj put induciran s obzirom na to da je detektirano povećanje genske ekspresije *STAT1* tek u kasnijim vremenskim točkama. Ekspresija gena *STAT3* nije bila značajna kod inficiranih stanica u odnosu na neinficirane stanice. Jedno istraživanje pokazalo je kako je poticanje primarnih ljudskih makrofaga s IFN- $\alpha$  rezultiralo značajnom aktivacijom *STAT1* u prisutnosti IL-10, što je dovelo do aktivacije nekoliko gena ovisnih o *STAT1* kao što su *CXCL9*, *CXCL10* i *IFN regulatorni faktor 1 (IRF1)* (Sharif et al. 2004). U našem istraživanju je koncentracija citokina IL-10 u STNT-u bila skoro nedetektibilna, iako postoje razlike u odgovoru inficiranih stanica u usporedbi s neinficiranim stanicama te stanica inficiranih virusom PUUV i TULV. U ovom istraživanju, su se geni *CXCL10*, *IFITM3* i *STAT1* istaknuli kao kao potencijalni biomarkeri infekcije patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom.

Prilikom diferencijacije monocita u stanice MDM/MDDC aktivira se više tisuća gena (H. Liu i ostali 2008; Italiani i ostali 2014; Z. Zhang i ostali 2020). Istraživači grupiraju aktivirane gene u smislene skupine radi lakše interpretacije. Jedna skupina gena koji su bitni tijekom procesa diferencijacije su kod neaktiviranih monocita bili smanjene ekspresije, zatim povećane tijekom aktivacije te ponovno smanjene kod diferenciranih stanica MDM, a uključivali su gene za citokine i kemokine, imunost i obranu, staničnu pokretljivost, prijenos signala i prijenos signala putem površinskih receptora (H. Liu i ostali 2008). Nadalje, geni

koji su bili povećane ekspresije u monocita, a tijekom diferencijacije se smanjuju, uključivali su gene uključene u imunost posredovanu MHC razredom II, imunost prema T-limfocitima te metabolizam lipida, masnih kiselina i steroida (H. Liu i ostali 2008). Druga skupina gena potrebna je za diferencijaciju te je ključna za funkciju diferenciranih MDM, u kojoj su geni sa smanjenom ekspresijom kod monocita te povećanom cijelo vrijeme trajanja diferencijacije, a uključivali su procese vezane uz pokretljivost stanice, metabolizam ugljikohidrata, aminokiselina i proteina, imunost i obranu, sklapanje proteina te egzocitozu. Treća skupina gena pokazala se važnima za funkciju ili održavanje stanica MDM jer su bili povećane ekspresije tek kasnije tijekom diferencijacije, a uključivala je gene za metabolizam koenzima, vitamina i transport elektrona, puteve stanične proliferacije i diferencijacije, signalne puteve posredovane ligandima i puteve prijenosa signala. Tijekom diferencijacije u stanice MDM većina gena transkripcijskih faktora bila je smanjene ekspresije, što ukazuje kako je supresija gena važnih za transkripcijsku regulaciju ključna u diferencijaciji monocita u stanice MDM (H. Liu i ostali 2008). Takvu dinamiku genske ekspresije smo utvrdili i u našem istraživanju gdje su geni za transkripcijske faktore bili povećani tek u kasnoj fazi infekcije.

U radu Italiani i suradnika 2014 su po prvi puta pokazali kako ista populacija stanica (monocita) može prijeći iz proupalnog M1 stanja u protuupalno M2 stanje stanica MDM. Značajno promijenjene gene podijelili su u pet funkcionalnih grupa ovisno o procesima: upala, rana protuupala i protuupala, diferencijacija uzrokovana upalom, pozitivna diferencijacija te negativna diferencijacija. Geni koji su povezani s M1 MDM bili su u grupama upala i diferencijacija uzrokovana upalom, dok su geni povezani sa stanjem M2 stanica MDM bili u procesu pozitivna diferencijacija i negativna diferencijacija. U toj studiji monocite su stimulirali pomoću citokina CCL2 pa LPS-om i TNF-om, a naznačili su također da kada su koristili virusni podražaj (umjesto LPS-a) kako je imunski odgovor bio je vrlo sličan (osim što je također izazvao virusno specifični odgovor) (Italiani i ostali 2014). U našim uvjetima gdje su monociti bili inficirani ortohantavirusima formirao se u ranoj fazi infekcije miješani M1/M2 monocitni odgovor, a u kasnoj fazi infekcije protuupalni odgovor stanica MDM sličnih tipu M2. Monociti inficirani virusima, su u ovom istraživanju odmah nakon infekcije (1 sat n.i.) značajno povećali ekspresiju proupalnih gena *CXCL8*, *TNF*, *CCL13* te protuupalnog *IL1RN*, dok su *IL6* i *IL1B* bili značajno povećani od 6.-48. h n.i., ali s trendom naglog smanjenja ekspresije kasnije tijekom infekcije, što odgovara dinamiци funkcionalne grupe upala. Geni *CCL4* i *CCR5* imali su identičan trend, ali bez ikakvih značajnosti u odnosu na neinficirane stanice. U ovom istraživanju su trend funkcionalne grupe protuupala sa značajnim smanjenjem u ranoj fazi infekcije te kasnijim povećanjem ekspresije,

imali geni *IL27*, *CXCL10*, *IFITM3*, *CD40LG*, *CCR2*, *CXCR4*. Ekspresija gena *MRC1* bila je jednaka funkcionalnog grupi diferencijacija uzrokovana upalom s naglim povećanjem ekspresije od 1. sata n.i. te dosegom platoa ekspresije od 24 sata do 7 dana n.i. Geni *IL37* i *STAT1* pripali su grupi pozitivna diferencijacija s konstantnim povećanjem ekspresije kod stanica inficiranih virusima (bez promjena ekspresije u ranoj fazi, ali s konstantnim povećanjem od 48 sati do 7 dana n.i.). Ekspresija gena *CD68* kod inficiranih stanica bila je najbližnja dinamici funkcionalne grupe „negativna diferencijacija“ s povećanjem ekspresije 1 sat n.i. pa stagnacijom, a bez razlika prema neinficiranim stanicama u kasnijem tijeku infekcije. Najznačajnije razlike u našem istraživanju prema spomenutoj studiji (Italiani i ostali 2014) bile su za gene *CXCL10*, *STAT1* te *IFITM3* gdje je u toj studiji ekspresija tih gena bila prvotno povećana, a u našim uvjetima bili su prvotno smanjeni što možemo zaključiti kako je direktan rezultat djelovanja ortohantavirusa na spomenute gene.

U monocitima inficiranim virusom TULV je na početku infekcije bilo aktivirano više signalnih puteva u odnosu na monocite inficirane virusom PUUV, uslijed aktivacije signalnih puteva vezanih uz gen *TNF*. Nadalje, kod stanica inficiranih virusom PUUV bio je aktiviran put interakcije citokina i citokinskih receptora zbog aktivacije gena *CD40LG* koji je kod stanica inficiranih virusom TULV bio značajno snižen u odnosu na neinficirane stanice. U kasnoj fazi infekcije je kod stanica inficiranih virusom PUUV bilo aktivirano više signalnih puteva nego kod stanica inficiranih virusom TULV. Možemo zaključiti kako je u ranim satima nakon infekcije u monocitima inficiranim virusom TULV potaknuto više gena i signalnih puteva gdje stanice uspijevaju utišati virusnu infekciju i replikaciju, dok je u kasnoj fazi praćenja infekcije bilo više događanja u stanica MDM inficiranih virusom PUUV gdje se patogeni ortohantavirus nakon početnog miješanog pro/-protuupalnog odgovora monocita ipak uspijeva replicirati i potaknuti protuupalni odgovor diferencijacijom u stanice MDM slične tipu M2, sintezom i izlučivanjem protuvirusne gene i proteina.

Potrebna su daljnja istraživanja s uključenim većim brojem gena, transkripcijskih faktora, solubilnih modulatora biološkog odgovora, površinskih molekula te analizama aktivacije stanica kako bi se dao daljnji doprinos diferencijaciji primarnih monocita nakon infekcije ortohantavirusima te razlikama u infekciji patogenim u odnosu na infekciju apatogenim ortohantavirusom.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U ovom istraživanju su po prvi put u uvjetima *in vitro* ispitani i uspoređeni elementi urođenog imunosnog odgovora primarnih monocita/makrofaga, na infekciju patogenim Puumala (PUUV) ili apatogenim Tula (TULV) ortohantavirusom, prateći ključne promjene u ekspresiji staničnih površinskih markera (kod sedam donora) te ekspresije gena i lučenja proteina u supernatant (kod šest donora).

1. Po prvi puta je praćena dugotrajna kultivacija inficiranih primarnih monocita ortohantavirusima (HTV) kroz sedam dana uz postojanu vijabilnost stanica te su zabilježene razlike urođenog imunosnog odgovora tijekom rane i kasne faze infekcije.

2. Primarni monociti nisu podložni replikaciji virusa HTV, dok primarni monociti nakon 48 sati od infekcije jesu podložni replikaciji virusa HTV.

Moguće kako sposobnost replikacije u stanicama nakon 48 sati od infekcije razlikuje patogene od apatogenih ortohantavirusa. Razlike u podložnosti stanica replikaciji patogenog i apatogenog ortohantavirusa potrebno je dalje istražiti.

Također, potrebno je dalje istražiti razloge podložnosti stanica na replikaciju nakon 48 sati od infekcije, jesu li uzorkovani diferencijacijom monocita *per se* (zbog kultivacije) ili uslijed „sporog“ replikacijskog ciklusa ortohantavirusa koji su inače „spororastući“ virusi i u stanicama za uzgoj virusa.

3. Pokretanje/aktivacija imunosnog odgovora u primarnim monocitima nakon ulaska ortohantavirusa u stanice i infekcije neovisno/a je replikaciji virusa HTV.

Urođeni imunosni odgovor monocita javlja se već u 1. satu nakon infekcije ortohantavirusima na razini ekspresije gena, površinskih molekula/receptora i sinteze solubilnih modulatora biološkog odgovora.

4. HTV potiču aktivaciju primarnih monocita s miješanim M1/M2 odgovorom monocita u ranoj fazi infekcije (izlučivanje i povećana genska ekspresija i proupalnih i protuupalnih citokina i kemokina) te induciraju diferencijaciju prema stanicama MDM sličnih tipu M2 u kasnoj fazi infekcije (izlučivanje i povećana površinska ekspresija protuupalnih citokina i kemokina te površinskih receptora).

Potencijalno razlikovanje smjera diferencijacije pri infekciji patogenim virusom HTV (prema stanicama MDM sličnih tipu M2) od apatogene infekcije (prema stanicama MDM sličnih tipu M1) potrebno je dalje istražiti.

5. Postoje značajne razlike u urođenom imunosnom odgovoru primarnih monocita inficiranih patogenim virusom PUUV u usporedbi s primarnim monocitima inficiranim virusom TULV. Razlike su dokazane već u 1. satu nakon infekcije s izlučivanjem većih koncentracija proupalnih kemokina i citokina te aktivacijom više bioloških procesa i staničnih signalnih puteva kod monocita inficiranih apatogenim virusom TULV u usporedbi s monocitima inficiranim patogenim virusom PUUV.

Razlike u genskoj ekspresiji najočitije su u kasnoj razi infekcije s ekspresijom gena induciranih virusom te aktivacijom više bioloških procesa i staničnih signalnih puteva kod stanica inficiranih patogenim virusom PUUV u usporedbi sa stanicama inficiranim apatogenim virusom TULV.

Dokazane razlike daju doprinos rasvjetljavanju razlika u intrinzičnoj virulentnosti virusa PUUV i TULV gdje stanice na infekciju virusom TULV reagiraju s više uključene „stanične mašinerije“ te suprimiraju apatogeni virus TULV, a patogeni PUUV izaziva slabiju reakciju te uspijeva preživjeti i replicirati se u stanicama.

6. Dokazan je individualni imunosni odgovor donora na infekciju virusima HTV i razdvajanje u dvije grupe po tri donora (tzv. „proupalna“ donora koja su u ranoj fazi infekcije imala veće koncentracije nekih citokina i kemokina i manji broj kopija virusne RNA u supernatantu i u stanicama te ostala tri tzv. „protuupalna“ donora koja su u ranoj fazi infekcije imala niske koncentracije kemokina ili konstantno veće koncentracije proupalnih citokina i ekspresiju proupalnih gena te veći broj kopija virusne RNA u supernatantu i u stanicama).

Individualne razlike u imunosnom odgovoru donora bilo bi poželjno dalje istražiti.

## 7. POPIS LITERATURE

- Abudurexiti, Abulikemu, Scott Adkins, Daniela Alioto, Sergey V. Alkhovsky, Tatjana Avšič-Županc, Matthew J. Ballinger, Dennis A. Bente, i ostali. 2019. „Taxonomy of the Order Bunyavirales: Update 2019“. *Archives of Virology* 164 (7): 1949–65. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04253-6>.
- Adams, Michael J., Elliot J. Lefkowitz, Andrew M. Q. King, Balázs Harrach, Robert L. Harrison, Nick J. Knowles, Andrew M. Kropinski, i ostali. 2017. „Changes to Taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017)“. *Archives of Virology* 162 (8): 2505–38. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3358-5>.
- Albornoz, Amelina, Anja B. Hoffmann, Pierre-Yves Lozach, i Nicole D. Tischler. 2016. „Early Bunyavirus-Host Cell Interactions“. *Viruses* 8 (5). <https://doi.org/10.3390/v8050143>.
- Alexeyev, O. A., i V. G. Morozov. 1995. „Neurological Manifestations of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Caused by Puumala Virus: Review of 811 Cases“. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 20 (2): 255–58. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.2.255>.
- Alff, Peter J., Nandini Sen, Elena Gorbunova, Irina N. Gavrilovskaya, i Erich R. Mackow. 2008. „The NY-1 Hantavirus Gn Cytoplasmic Tail Coprecipitates TRAF3 and Inhibits Cellular Interferon Responses by Disrupting TBK1-TRAF3 Complex Formation“. *Journal of Virology* 82 (18): 9115–22. <https://doi.org/10.1128/JVI.00290-08>.
- Ancuta, Petronela, Kuang-Yu Liu, Vikas Misra, Vanessa Sue Wacleche, Annie Gosselin, Xiaobo Zhou, i Dana Gabuzda. 2009. „Transcriptional Profiling Reveals Developmental Relationship and Distinct Biological Functions of CD16+ and CD16- Monocyte Subsets“. *BMC Genomics* 10 (kolovoz): 403. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-403>.
- Ancuta, Petronela, Ravi Rao, Ashlee Moses, Andrew Mehle, Sunil K. Shaw, F. William Luscinskas, i Dana Gabuzda. 2003. „Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes“. *The Journal of Experimental Medicine* 197 (12): 1701–7. <https://doi.org/10.1084/jem.20022156>.
- Antonen, Jaakko, Ilona Leppänen, Jyrki Tenhunen, Pertti Arvola, Satu Mäkelä, Antti Vaheri, i Jukka Mustonen. 2013. „A Severe Case of Puumala Hantavirus Infection Successfully Treated with Bradykinin Receptor Antagonist Icatibant“. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 45 (6): 494–96. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.755268>.
- Ara, Anjuman, Khawaja Ashfaq Ahmed, i Jim Xiang. 2018. „Multiple Effects of CD40&ndash;CD40L Axis in Immunity against Infection and Cancer“. *ImmunoTargets and Therapy* Volume 7 (lipanj): 55–61. <https://doi.org/10.2147/ITT.S163614>.
- Arai, Satoru, Son Truong Nguyen, Bazartseren Boldgiv, Dai Fukui, Kazuko Araki, Can Ngoc Dang, Satoshi D. Ohdachi, i ostali. 2013. „Novel Bat-Borne Hantavirus, Vietnam“. *Emerging Infectious Diseases* 19 (7): 1159–61. <https://doi.org/10.3201/eid1907.121549>.
- Arai, Satoru, Jin-Won Song, Laarni Sumibcay, Shannon N. Bennett, Vivek R. Nerurkar, Cheryl Parmenter, Joseph A. Cook, Terry L. Yates, i Richard Yanagihara. 2007. „Hantavirus in Northern Short-Tailed Shrew, United States“. *Emerging Infectious Diseases* 13 (9): 1420–23. <https://doi.org/10.3201/eid1309.070484>.
- Arboleda Alzate, John F., Izabela A. Rodenhuis-Zybert, Juan C. Hernández, Jolanda M. Smit, i Silvio Urcuqui-Inchima. 2017. „Human Macrophages Differentiated in the Presence of Vitamin D3 Restrict Dengue Virus Infection and Innate Responses by Downregulating Mannose Receptor Expression“. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (10): e0005904. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005904>.
- Astarié-Dequeker, Catherine, Elsa-Noah N’Diaye, Veronique Le Cabec, Michael G. Rittig, Jacques Prandi, i Isabelle Maridonneau-Parini. 1999. „The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages“. *Infection and Immunity* 67 (2): 469–77.
- Atri, Chiraz, Fatma Z. Guerfali, i Dhafer Laouini. 2018. „Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases“. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.

- Auffray, Cedric, Darin Fogg, Meriem Garfa, Gaele Elain, Olivier Join-Lambert, Samer Kayal, Sabine Sarnacki, Ana Cumano, Gregoire Lauvau, i Frederic Geissmann. 2007. „Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior“. *Science (New York, N.Y.)* 317 (5838): 666–70. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>.
- Avsic-Zupanc, T, M Petrovec, P Furlan, R Kaps, F Elgh, i A Lundkvist. 1999. „Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in the Dolenjska Region of Slovenia--a 10-Year Survey“. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 28 (4): 860–65. <https://doi.org/10.1086/515185>.
- Avsic-Zupanc, T, A Toney, K Anderson, Y K Chu, i C Schmaljohn. 1995. „Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the Hantavirus genus, family Bunyaviridae“. *The Journal of General Virology* 76 ( Pt 11) (studeni): 2801–8.
- Avšič Županc, Tatjana, Miša Korva, i Alemka Markotić. 2014. „HFRS and Hantaviruses in the Balkans/South-East Europe“. *Virus Research* 187 (srpanj): 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.042>.
- Avšič-Županc, T., A. Saksida, i M. Korva. 2019. „Hantavirus Infections“. *Clinical Microbiology and Infection* 21 (travanj): e6–16. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>.
- Azeredo, Elzinandes L., Patrícia C. Neves-Souza, Allan R. Alvarenga, Sônia R. N. I. Reis, Amanda Torrentes-Carvalho, Sonia-Marís O. Zagne, Rita M. R. Nogueira, Luzia M. Oliveira-Pinto, i Claire F. Kubelka. 2010. „Differential Regulation of Toll-like Receptor-2, Toll-like Receptor-4, CD16 and Human Leucocyte Antigen-DR on Peripheral Blood Monocytes during Mild and Severe Dengue Fever“. *Immunology* 130 (2): 202–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03224.x>.
- Backé, E., R. Schwarting, J. Gerdes, M. Ernst, i H. Stein. 1991. „Ber-MAC3: New Monoclonal Antibody That Defines Human Monocyte/Macrophage Differentiation Antigen“. *Journal of Clinical Pathology* 44 (11): 936–45. <https://doi.org/10.1136/jcp.44.11.936>.
- Bailer, R. T., B. Lee, i L. J. Montaner. 2000. „IL-13 and TNF-Alpha Inhibit Dual-Tropic HIV-1 in Primary Macrophages by Reduction of Surface Expression of CD4, Chemokine Receptors CCR5, CXCR4 and Post-Entry Viral Gene Expression“. *European Journal of Immunology* 30 (5): 1340–49. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(200005\)30:5<1340::AID-IMMU1340>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(200005)30:5<1340::AID-IMMU1340>3.0.CO;2-L).
- Bain, Calum C., Alberto Bravo-Blas, Charlotte L. Scott, Elisa Gomez Perdiguero, Frederic Geissmann, Sandrine Henri, Bernard Malissen, Lisa C. Osborne, David Artis, i Allan McI Mowat. 2014. „Constant Replenishment from Circulating Monocytes Maintains the Macrophage Pool in the Intestine of Adult Mice“. *Nature Immunology* 15 (10): 929–37. <https://doi.org/10.1038/ni.2967>.
- Ballinger, Megan N., i John W. Christman. 2016. „Pulmonary Macrophages: Overlooked and Underappreciated“. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54 (1): 1–2. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0270ED>.
- Battisti, Anthony J., Yong-Kyu Chu, Paul R. Chipman, Bärbel Kaufmann, Colleen B. Jonsson, i Michael G. Rossmann. 2011. „Structural Studies of Hantaan Virus“. *Journal of Virology* 85 (2): 835–41. <https://doi.org/10.1128/JVI.01847-10>.
- Becker, S., M. K. Warren, i S. Haskill. 1987. „Colony-Stimulating Factor-Induced Monocyte Survival and Differentiation into Macrophages in Serum-Free Cultures“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 139 (11): 3703–9.
- Belge, Kai-Uwe, Farshid Dayyani, Alexia Horelt, Maciej Siedlar, Marion Frankenberger, Bernhard Frankenberger, Terje Espevik, i Löms Ziegler-Heitbrock. 2002. „The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (7): 3536–42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3536>.
- Bennett, Shannon N., Se Hun Gu, Hae Ji Kang, Satoru Arai, i Richard Yanagihara. 2014. „Reconstructing the Evolutionary Origins and Phylogeography of Hantaviruses“. *Trends in Microbiology* 22 (8): 473–82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.008>.
- Bente, Dennis A., Judie B. Alimonti, Wun-Ju Shieh, Gaëlle Camus, Ute Ströher, Sherif Zaki, i Steven M. Jones. 2010. „Pathogenesis and Immune Response of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in a STAT-1 Knockout Mouse Model“. *Journal of Virology* 84 (21): 11089–100. <https://doi.org/10.1128/JVI.01383-10>.

- Berkhout, T. A., H. M. Sarau, K. Moores, J. R. White, N. Elshourbagy, E. Appelbaum, R. J. Reape, i ostali. 1997. „Cloning, in Vitro Expression, and Functional Characterization of a Novel Human CC Chemokine of the Monocyte Chemotactic Protein (MCP) Family (MCP-4) That Binds and Signals through the CC Chemokine Receptor 2B“. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (26): 16404–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16404>.
- Bianchi, Marco E., i Rosanna Mezzapelle. 2020. „The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration“. *Frontiers in Immunology* 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.02109>.
- Binder, Florian, Matthias Lenk, Saskia Weber, Franziska Stoek, Veronika Dill, Sven Reiche, Roland Riebe, i ostali. 2019. „Common Vole (*Microtus Arvalis*) and Bank Vole (*Myodes Glareolus*) Derived Permanent Cell Lines Differ in Their Susceptibility and Replication Kinetics of Animal and Zoonotic Viruses“. *Journal of Virological Methods* 274 (prosinac): 113729. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113729>.
- Biswas, Subhra K., i Alberto Mantovani. 2010. „Macrophage Plasticity and Interaction with Lymphocyte Subsets: Cancer as a Paradigm“. *Nature Immunology* 11 (10): 889–96. <https://doi.org/10.1038/ni.1937>.
- Björkström, Niklas K., Therese Lindgren, Malin Stoltz, Cyril Fauriat, Monika Braun, Magnus Evander, Jakob Michaëlsson, i ostali. 2011. „Rapid Expansion and Long-Term Persistence of Elevated NK Cell Numbers in Humans Infected with Hantavirus“. *The Journal of Experimental Medicine* 208 (1): 13–21. <https://doi.org/10.1084/jem.20100762>.
- Borges, Alessandra Abel, Gelse Mazzoni Campos, Marcos Lázaro Moreli, Ricardo Luiz Moro Souza, Fabiano Pinto Saggiaro, Glauciane Garcia Figueiredo, Márcia Cristina Livonesi, i Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. 2008. „Role of Mixed Th1 and Th2 Serum Cytokines on Pathogenesis and Prognosis of Hantavirus Pulmonary Syndrome“. *Microbes and Infection* 10 (10–11): 1150–57. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.06.006>.
- Botten, Jason, Katy Mirowsky, Chunyan Ye, Keith Gottlieb, Melissa Saavedra, Liana Ponce, i Brian Hjelle. 2002. „Shedding and Intracage Transmission of Sin Nombre Hantavirus in the Deer Mouse (*Peromyscus maniculatus*) Model“. *Journal of Virology* 76 (15): 7587–94. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.15.7587-7594.2002>.
- Bourquain, Daniel, Clemens Bodenstern, Stefanie Schürer, i Lars Schaade. 2019. „Puumala and Tula Virus Differ in Replication Kinetics and Innate Immune Stimulation in Human Endothelial Cells and Macrophages“. *Viruses* 11 (9). <https://doi.org/10.3390/v11090855>.
- Bowen, M D, W Gelbmann, T G Ksiazek, S T Nichol, i N Nowotny. 1997. „Puumala Virus and Two Genetic Variants of Tula Virus Are Present in Austrian Rodents“. *Journal of Medical Virology* 53 (2): 174–81.
- Braun, Monika, Niklas K. Björkström, Shawon Gupta, Karin Sundström, Clas Ahlm, Jonas Klingström, i Hans-Gustaf Ljunggren. 2014. „NK Cell Activation in Human Hantavirus Infection Explained by Virus-Induced IL-15/IL15R $\alpha$  Expression“. *PLOS Pathogens* 10 (11): e1004521. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004521>.
- Brewer, Douglas B. 1994. „Max Schultze and the Living, Moving, Phagocytosing Leucocytes: 1865“. *Medical History* 38 (1): 91–101. <https://doi.org/10.1017/S0025727300056064>.
- Brugger, W., M. Kreutz, i R. Andreesen. 1991. „Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Required for Human Monocyte Survival and Acts as a Cofactor for Their Terminal Differentiation to Macrophages in Vitro“. *Journal of Leukocyte Biology* 49 (5): 483–88. <https://doi.org/10.1002/jlb.49.5.483>.
- Brummer-Korvenkontio, M., H. Henttonen, i A. Vaheri. 1982. „Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Finland: Ecology and Virology of Nephropathia Epidemica“. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum* 36: 88–91.
- Brummer-Korvenkontio, M., A. Vaheri, T. Hovi, C. H. von Bonsdorff, J. Vuorimies, T. Manni, K. Penttinen, N. Oker-Blom, i J. Lähdevirta. 1980. „Nephropathia Epidemica: Detection of Antigen in Bank Voles and Serologic Diagnosis of Human Infection“. *The Journal of Infectious Diseases* 141 (2): 131–34. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.2.131>.
- Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellems, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, i ostali. 2009. „The MIQE Guidelines: Minimum Information for



- Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“. *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Castel, Guillaume, Noël Tordo, i Alexander Plyusnin. 2017. „Estimation of Main Diversification Time-Points of Hantaviruses Using Phylogenetic Analyses of Complete Genomes“. *Virus Research* 233 (travanj): 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.03.011>.
- Caux, C., S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. de Bouteiller, M. C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik, i A. Vicari. 2000. „Dendritic Cell Biology and Regulation of Dendritic Cell Trafficking by Chemokines“. *Springer Seminars in Immunopathology* 22 (4): 345–69. <https://doi.org/10.1007/s002810000053>.
- Cavaillon, Jean-Marc. 2011. „The Historical Milestones in the Understanding of Leukocyte Biology Initiated by Elie Metchnikoff“. *Journal of Leukocyte Biology* 90 (3): 413–24. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211094>.
- Cebalo, L., i A. Markotić. 2007. „Chemokine Production Predominates in Human Monocytes Infected with Tula Virus“. *Viral Immunology* 20 (1): 206–13. <https://doi.org/10.1089/vim.2006.0039>.
- Cerar, Dasa, Tatjana Avsic-Zupanc, Matjaz Jereb, i Franc Strle. 2007. „Case Report: Severe Neurological Manifestation of Dobrava Hantavirus Infection“. *Journal of Medical Virology* 79 (12): 1841–43. <https://doi.org/10.1002/jmv.21021>.
- Chapman, L. E., i R. F. Khabbaz. 1994. „Etiology and Epidemiology of the Four Corners Hantavirus Outbreak“. *Infectious Agents and Disease* 3 (5): 234–44.
- Chapuis, F., M. Rosenzweig, M. Yagello, M. Ekman, P. Biberfeld, i J. C. Gluckman. 1997. „Differentiation of Human Dendritic Cells from Monocytes in Vitro“. *European Journal of Immunology* 27 (2): 431–41. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270213>.
- Chávez-Galán, Leslie, Maria L. Olleros, Dominique Vesin, i Irene Garcia. 2015. „Much More than M1 and M2 Macrophages, There Are Also CD169(+) and TCR(+) Macrophages“. *Frontiers in Immunology* 6: 263. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>.
- Chen, Keqiang, Zhiyao Bao, Peng Tang, Wanghua Gong, Teizo Yoshimura, i Ji Ming Wang. 2018. „Chemokines in Homeostasis and Diseases“. *Cellular & Molecular Immunology* 15 (4): 324–34. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.134>.
- Chen, Shaodong, Edward C. So, Scott E. Strome, i Xiaoyu Zhang. 2015. „Impact of Detachment Methods on M2 Macrophage Phenotype and Function“. *Journal of Immunological Methods* 426 (studeni): 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.08.001>.
- Cheng, Erdong, i Mohammad A. Mir. 2012. „Signatures of Host mRNA 5' Terminus for Efficient Hantavirus Cap Snatching“. *Journal of Virology* 86 (18): 10173–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.05560-11>.
- Childs, J. E., G. E. Glass, G. W. Korch, i J. W. LeDuc. 1989. „Effects of Hantaviral Infection on Survival, Growth and Fertility in Wild Rat (*Rattus Norvegicus*) Populations of Baltimore, Maryland“. *Journal of Wildlife Diseases* 25 (4): 469–76. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-25.4.469>.
- Chizhikov, V. E., C. F. Spiropoulou, S. P. Morzunov, M. C. Monroe, C. J. Peters, i S. T. Nichol. 1995. „Complete Genetic Characterization and Analysis of Isolation of Sin Nombre Virus“. *Journal of Virology* 69 (12): 8132–36. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.12.8132-8136.1995>.
- Choi, Yun, Young-Chan Kwon, Soo-In Kim, Jung-Min Park, Kyung-Hee Lee, i Byung-Yoon Ahn. 2008. „A Hantavirus Causing Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Requires GC1qR/P32 for Efficient Cell Binding and Infection“. *Virology* 381 (2): 178–83. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.035>.
- Cifuentes-Muñoz, Nicolás, Natalia Salazar-Quiroz, i Nicole D. Tischler. 2014. „Hantavirus Gn and Gc Envelope Glycoproteins: Key Structural Units for Virus Cell Entry and Virus Assembly“. *Viruses* 6 (4): 1801–22. <https://doi.org/10.3390/v6041801>.
- Clement, Jan, James W. LeDuc, Graham Lloyd, Jean-Marc Reynes, Lorraine McElhinney, Marc Van Ranst, i Ho-Wang Lee. 2019. „Wild Rats, Laboratory Rats, Pet Rats: Global Seoul Hantavirus Disease Revisited“. *Viruses* 11 (7): E652. <https://doi.org/10.3390/v11070652>.
- Clement, Jan, Piet Maes, i Marc Van Ranst. 2014. „Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in the New, and Hantavirus Pulmonary Syndrome in the Old World: Paradi(Se)Gm Lost or Regained?“ *Virus Research* 187 (srpanj): 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.036>.

- Coccia, E. M., N. Del Russo, E. Stellacci, U. Testa, G. Marziali, i A. Battistini. 1999. „STAT1 Activation during Monocyte to Macrophage Maturation: Role of Adhesion Molecules“. *International Immunology* 11 (7): 1075–83. <https://doi.org/10.1093/intimm/11.7.1075>.
- Cormican, Sarah, i Matthew D. Griffin. 2020. „Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis“. *Frontiers in Immunology* 11: 1070. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01070>.
- Cros, Jérôme, Nicolas Cagnard, Kevin Woollard, Natacha Patey, Shen-Ying Zhang, Brigitte Senechal, Anne Puel, i ostali. 2010. „Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors“. *Immunity* 33 (3): 375–86. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>.
- Cvetko Krajinović, Lidija. 2014. „Rane imunoreakcije u mononuklearnim stanicama periferne krvi uzrokovane virusom Puumala (Early immunoreactions in peripheral blood mononuclear cells induced by Puumala virus)“. Doctoral thesis. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. [http://digre.pmf.unizg.hr/1054/1/Disertacija\\_Lidija%20Cvetko%20Krajinovic.pdf](http://digre.pmf.unizg.hr/1054/1/Disertacija_Lidija%20Cvetko%20Krajinovic.pdf). <http://bib.irb.hr/prikazi-rad?&rad=743981>.
- Dalrymple, Nadine A., i Erich R. Mackow. 2014. „Virus Interactions with Endothelial Cell Receptors: Implications for Viral Pathogenesis“. *Current Opinion in Virology* 7 (kolovoz): 134–40. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.06.006>.
- Dal-Secco, Daniela, Jing Wang, Zhutian Zeng, Elzbieta Kolaczkowska, Connie H. Y. Wong, Björn Petri, Richard M. Ransohoff, Israel F. Charo, Craig N. Jenne, i Paul Kubes. 2015. „A Dynamic Spectrum of Monocytes Arising from the in Situ Reprogramming of CCR2+ Monocytes at a Site of Sterile Injury“. *The Journal of Experimental Medicine* 212 (4): 447–56. <https://doi.org/10.1084/jem.20141539>.
- Das, Amitava, Mithun Sinha, Soma Datta, Motaz Abas, Scott Chaffee, Chandan K. Sen, i Sashwati Roy. 2015. „Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration“. *The American Journal of Pathology* 185 (10): 2596–2606. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.001>.
- Davis, Ian C., Allan J. Zajac, Kurt B. Nolte, Jason Botten, Brian Hjelle, i Sadis Matalon. 2002. „Elevated Generation of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome“. *Journal of Virology* 76 (16): 8347–59. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.8347-8359.2002>.
- Davis, Reece. 2019. *Cellular and Molecular Immunology*. Scientific e-Resources.
- Dekonenko, Alexander, Valeriy Yakimenko, Alexander Ivanov, Vyacheslav Morozov, Pavel Nikitin, Samara Khasanova, Tamara Dzagurova, Evgeniy Tkachenko, i Connie Schmaljohn. 2003. „Genetic Similarity of Puumala Viruses Found in Finland and Western Siberia and of the Mitochondrial DNA of Their Rodent Hosts Suggests a Common Evolutionary Origin“. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 3 (4): 245–57.
- Di Marzio, P., J. Tse, i N. R. Landau. 1998. „Chemokine Receptor Regulation and HIV Type 1 Tropism in Monocyte-Macrophages“. *AIDS Research and Human Retroviruses* 14 (2): 129–38. <https://doi.org/10.1089/aid.1998.14.129>.
- Donato, R., B. R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D. J. Weber, i C. L. Geczy. 2013. „Functions of S100 Proteins“. *Current Molecular Medicine* 13 (1): 24–57.
- Dong, Chunsheng, Constance Kwas, i Li Wu. 2009. „Transcriptional Restriction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression in Undifferentiated Primary Monocytes“. *Journal of Virology* 83 (8): 3518–27. <https://doi.org/10.1128/JVI.02665-08>.
- Dong, Chunsheng, Guoping Zhao, Mei Zhong, Yan Yue, Li Wu, i Sidong Xiong. 2013. „RNA Sequencing and Transcriptomal Analysis of Human Monocyte to Macrophage Differentiation“. *Gene* 519 (2): 279–87. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.02.015>.
- Elgueta, Raul, Micah J. Benson, Victor C. de Vries, Anna Wasiuk, Yanxia Guo, i Randolph J. Noelle. 2009. „Molecular Mechanism and Function of CD40/CD40L Engagement in the Immune System“. *Immunological Reviews* 229 (1): 152–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x>.

- Elliott, R. M., C. S. Schmaljohn, i M. S. Collett. 1991. „Bunyaviridae Genome Structure and Gene Expression“. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 169: 91–141. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-76018-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-76018-1_4).
- Escutenaire, Sophie, Patrice Chalon, Florence De Jaegere, Lucie Karelle-Bui, Georges Mees, Bernard Brochier, Francine Rozenfeld, i Paul-Pierre Pastoret. 2002. „Behavioral, Physiologic, and Habitat Influences on the Dynamics of Puumala Virus Infection in Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*)“. *Emerging Infectious Diseases* 8 (9): 930–36. <https://doi.org/10.3201/eid0809.010537>.
- Essbauer, Sandra S., Ellen Krautkrämer, Sibylle Herzog, i Martin Pfeffer. 2011. „A New Permanent Cell Line Derived from the Bank Vole (*Myodes glareolus*) as Cell Culture Model for Zoonotic Viruses“. *Virology Journal* 8 (srpanj): 339. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-339>.
- Fantuzzi, L., P. Borghi, V. Ciolli, G. Pavlakis, F. Belardelli, i S. Gessani. 1999. „Loss of CCR2 Expression and Functional Response to Monocyte Chemotactic Protein (MCP-1) during the Differentiation of Human Monocytes: Role of Secreted MCP-1 in the Regulation of the Chemotactic Response“. *Blood* 94 (3): 875–83.
- Fantuzzi, Laura, Maria Tagliamonte, Maria Cristina Gauzzi, i Lucia Lopalco. 2019. „Dual CCR5/CCR2 Targeting: Opportunities for the Cure of Complex Disorders“. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 76 (24): 4869–86. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03255-6>.
- Finsterbusch, Michaela, Mathieu-Benoit Voisin, Martina Beyrau, Timothy John Williams, i Sussan Nourshargh. 2014. „Neutrophils Recruited by Chemoattractants in Vivo Induce Microvascular Plasma Protein Leakage through Secretion of TNF“. *The Journal of Experimental Medicine* 211 (7): 1307–14. <https://doi.org/10.1084/jem.20132413>.
- Gack, Michaela U. 2017. „What Viruses Can Teach Us about the Human Immune System“. *PLOS Pathogens* 13 (7): e1006364. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006364>.
- Garcia-Zepeda, E. A., C. Combadiere, M. E. Rothenberg, M. N. Sarafi, F. Lavigne, Q. Hamid, P. M. Murphy, i A. D. Luster. 1996. „Human Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-4 Is a Novel CC Chemokine with Activities on Monocytes, Eosinophils, and Basophils Induced in Allergic and Nonallergic Inflammation That Signals through the CC Chemokine Receptors (CCR)-2 and -3“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (12): 5613–26.
- Garcin, D., M. Lezzi, M. Dobbs, R. M. Elliott, C. Schmaljohn, C. Y. Kang, i D. Kolakofsky. 1995. „The 5' Ends of Hantaan Virus (Bunyaviridae) RNAs Suggest a Prime-and-Realign Mechanism for the Initiation of RNA Synthesis“. *Journal of Virology* 69 (9): 5754–62. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.9.5754-5762.1995>.
- Gavrilovskaya, I. N., E. J. Brown, M. H. Ginsberg, i E. R. Mackow. 1999. „Cellular Entry of Hantaviruses Which Cause Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Is Mediated by Beta3 Integrins“. *Journal of Virology* 73 (5): 3951–59.
- Gavrilovskaya, I. N., M. Shepley, R. Shaw, M. H. Ginsberg, i E. R. Mackow. 1998. „Beta3 Integrins Mediate the Cellular Entry of Hantaviruses That Cause Respiratory Failure“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12): 7074–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7074>.
- Gavrilovskaya, Irina N., Elena E. Gorbunova, i Erich R. Mackow. 2010. „Pathogenic Hantaviruses Direct the Adherence of Quiescent Platelets to Infected Endothelial Cells“. *Journal of Virology* 84 (9): 4832–39. <https://doi.org/10.1128/JVI.02405-09>.
- Gavrilovskaya, Irina N., Elena E. Gorbunova, Natalie A. Mackow, i Erich R. Mackow. 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“. *Journal of Virology* 82 (12): 5797–5806. <https://doi.org/10.1128/JVI.02397-07>.
- Geijtenbeek, Teunis B. H., Ruurd Torensma, Sandra J van Vliet, Gerard C. F van Duijnhoven, Gosse J Adema, Yvette van Kooyk, i Carl G Figdor. 2000. „Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor That Supports Primary Immune Responses“. *Cell* 100 (5): 575–85. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80693-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80693-5).

- Geimonen, Erika, Sherry Neff, Tracy Raymond, Salih S. Kocer, Irina N. Gavrillovskaya, i Erich R. Mackow. 2002. „Pathogenic and Nonpathogenic Hantaviruses Differentially Regulate Endothelial Cell Responses“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21): 13837–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.192298899>.
- Gessani, Sandra, Laura Fantuzzi, i Filippo Belardelli. 2000. „Purification of Macrophages“. U *Macrophages: A Practical Approach*, Oxford University Press, 31–60. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Giebel, L. B., R. Stohwasser, L. Zöller, E. K. Bautz, i G. Darai. 1989. „Determination of the Coding Capacity of the M Genome Segment of Nephropathia Epidemica Virus Strain Hällnäs B1 by Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis“. *Virology* 172 (2): 498–505. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90192-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90192-x).
- Ginhoux, Florent, i Steffen Jung. 2014. „Monocytes and Macrophages: Developmental Pathways and Tissue Homeostasis“. *Nature Reviews. Immunology* 14 (6): 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>.
- Ginhoux, Florent, Joachim L. Schultze, Peter J. Murray, Jordi Ochando, i Subhra K. Biswas. 2016. „New Insights into the Multidimensional Concept of Macrophage Ontogeny, Activation and Function“. *Nature Immunology* 17 (1): 34–40. <https://doi.org/10.1038/ni.3324>.
- Glass, G. E., J. E. Childs, G. W. Korch, i J. W. LeDuc. 1988. „Association of Intraspecific Wounding with Hantaviral Infection in Wild Rats (*Rattus Norvegicus*)“. *Epidemiology and Infection* 101 (2): 459–72. <https://doi.org/10.1017/s0950268800054418>.
- Gorbunova, Elena E., Irina N. Gavrillovskaya, Timothy Pepini, i Erich R. Mackow. 2011. „VEGFR2 and Src Kinase Inhibitors Suppress Andes Virus-Induced Endothelial Cell Permeability“. *Journal of Virology* 85 (5): 2296–2303. <https://doi.org/10.1128/JVI.02319-10>.
- Gordon, Siamon, i Annette Plüddemann. 2019. „The Mononuclear Phagocytic System. Generation of Diversity“. *Frontiers in Immunology* 10: 1893. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01893>.
- Gordon, Siamon, i Philip R. Taylor. 2005. „Monocyte and Macrophage Heterogeneity“. *Nature Reviews. Immunology* 5 (12): 953–64. <https://doi.org/10.1038/nri1733>.
- Grieb, Gerrit, Melanie Merk, Jürgen Bernhagen, i Richard Bucala. 2010. „Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): A Promising Biomarker“. *Drug News & Perspectives* 23 (4): 257–64. <https://doi.org/10.1358/dnp.2010.23.4.1453629>.
- Guilliams, Martin, Florent Ginhoux, Claudia Jakubzick, Shalin H. Naik, Nobuyuki Onai, Barbara U. Schraml, Elodie Segura, Roxane Tussiwand, i Simon Yona. 2014. „Dendritic Cells, Monocytes and Macrophages: A Unified Nomenclature Based on Ontogeny“. *Nature Reviews. Immunology* 14 (8): 571–78. <https://doi.org/10.1038/nri3712>.
- Guo, Wen-Ping, Xian-Dan Lin, Wen Wang, Jun-Hua Tian, Mei-Li Cong, Hai-Lin Zhang, Miao-Ruo Wang, i ostali. 2013. „Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents“. *PLoS Pathogens* 9 (2): e1003159. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003159>.
- Gupta, Shawon, Monika Braun, Nicole D Tischler, Malin Stoltz, Karin B Sundström, Niklas K Björkström, Hans-Gustaf Ljunggren, i Jonas Klingström. 2013. „Hantavirus-Infection Confers Resistance to Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis“. *PLoS Pathogens* 9 (3): e1003272. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003272>.
- Handke, Wiebke, Robin Oelschlegel, Renate Franke, Detlev H. Krüger, i Andreas Rang. 2009. „Hantaan Virus Triggers TLR3-Dependent Innate Immune Responses“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (5): 2849–58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802893>.
- Haniffa, Muzlifah, Venetia Bigley, i Matthew Collin. 2015. „Human Mononuclear Phagocyte System Reunited“. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 41 (svibanj): 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.05.004>.
- Hannah, Michele F, Vladimir B Bajic, i Sabra L Klein. 2008. „Sex Differences in the Recognition of and Innate Antiviral Responses to Seoul Virus in Norway Rats“. *Brain, Behavior, and Immunity* 22 (4): 503–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.10.005>.
- Hansen, Alana, Scott Cameron, Qiyong Liu, Yehuan Sun, Philip Weinstein, Craig Williams, Gil-Soo Han, i Peng Bi. 2015. „Transmission of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome in China and the Role of Climate Factors: A Review“. *International Journal of Infectious Diseases* 33 (travanj): 212–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.02.010>.

- Hao, Siyuan, Kang Ning, Cagla Aksu Kuz, Kai Vorhies, Ziying Yan, i Jianming Qiu. 2020. „Long-Term Modeling of SARS-CoV-2 Infection of In Vitro Cultured Polarized Human Airway Epithelium“. *MBio* 11 (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02852-20>.
- Hardestam, J., M. Simon, K. O. Hedlund, A. Vaheri, J. Klingström, i A. Lundkvist. 2007. „Ex Vivo Stability of the Rodent-Borne Hantaan Virus in Comparison to That of Arthropod-Borne Members of the Bunyaviridae Family“. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (8): 2547–51. <https://doi.org/10.1128/AEM.02869-06>.
- He, Junyu, Yong Wang, Di Mu, Zhiwei Xu, Quan Qian, Gongbo Chen, Liang Wen, i ostali. 2019. „The Impacts of Climatic Factors and Vegetation on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Transmission in China: A Study of 109 Counties“. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (18): E3434. <https://doi.org/10.3390/ijerph16183434>.
- Hepojoki, Jussi, Tomas Strandin, Hilikka Lankinen, i Antti Vaheri. 2012. „Hantavirus Structure--Molecular Interactions behind the Scene“. *The Journal of General Virology* 93 (Pt 8): 1631–44. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042218-0>.
- Herbein, Georges, i Audrey Varin. 2010. „The Macrophage in HIV-1 Infection: From Activation to Deactivation?“. *Retrovirology* 7 (travanj): 33. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-33>.
- Hettinger, Jan, David M. Richards, Jenny Hansson, Melanie M. Barra, Ann-Cathrin Joschko, Jeroen Krijgsveld, i Markus Feuerer. 2013. „Origin of Monocytes and Macrophages in a Committed Progenitor“. *Nature Immunology* 14 (8): 821–30. <https://doi.org/10.1038/ni.2638>.
- Heyman, P., J. Klingström, F. de Jaegere, G. Leclercq, F. Rozenfeld, S. Escutenaire, C. Vandenvelde, M. Zizi, A. Plyusnin, i A. Lundkvist. 2002. „Tula Hantavirus in Belgium“. *Epidemiology and Infection* 128 (2): 251–56. <https://doi.org/10.1017/s0950268801006641>.
- Heyman, Paul, Bryan R Thoma, Jean-Lou Marié, Christel Cochez, i Sandra Simone Essbauer. 2012. „In Search for Factors That Drive Hantavirus Epidemics“. *Frontiers in Physiology* 3: 237. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00237>.
- Hjelle, Brian, i Fernando Torres-Pérez. 2010. „Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens“. *Viruses* 2 (12): 2559–86. <https://doi.org/10.3390/v2122559>.
- Hofmann, Jörg, Stephanie Kramer, Klaus R. Herrlinger, Kathrin Jeske, Martin Kuhns, Sabrina Weiss, Rainer G. Ulrich, i Detlev H. Krüger. 2021. „Tula Virus as Causative Agent of Hantavirus Disease in Immunocompetent Person, Germany“. *Emerging Infectious Diseases* 27 (4): 1234–37. <https://doi.org/10.3201/eid2704.203996>.
- Holmes, Edward C., i Yong-Zhen Zhang. 2015. „The Evolution and Emergence of Hantaviruses“. *Current Opinion in Virology* 10C (siječanj): 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.007>.
- Huggins, J. W., C. M. Hsiang, T. M. Cosgriff, M. Y. Guang, J. I. Smith, Z. O. Wu, J. W. LeDuc, Z. M. Zheng, J. M. Meegan, i Q. N. Wang. 1991. „Prospective, Double-Blind, Concurrent, Placebo-Controlled Clinical Trial of Intravenous Ribavirin Therapy of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *The Journal of Infectious Diseases* 164 (6): 1119–27. <https://doi.org/10.1093/infdis/164.6.1119>.
- Huiskonen, Juha T., Jussi Hepojoki, Pasi Laurinmäki, Antti Vaheri, Hilikka Lankinen, Sarah J. Butcher, i Kay Grünewald. 2010. „Electron Cryotomography of Tula Hantavirus Suggests a Unique Assembly Paradigm for Enveloped Viruses“. *Journal of Virology* 84 (10): 4889–97. <https://doi.org/10.1128/JVI.00057-10>.
- Hussein, I.T.M., A. Haseeb, A. Haque, i M.A. Mir. 2011. „Recent Advances in Hantavirus Molecular Biology and Disease“. *Advances in Applied Microbiology* 74: 35–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387022-3.00006-9>.
- „Imunologija 7.dopunjeno izdanje - Andreis, Igor: Batinić, Drago: Čulo, Filip: Grčevi | VBZonline“. bez dat. Pristupljeno 10. studeni 2015. <https://www.vbz.hr/knjiga/taradi-milan-imunologija-7dopunjeno-izdanje>.
- Italiani, Paola, i Diana Boraschi. 2014. „From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation“. *Frontiers in Immunology* 5 (listopad). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>.
- Italiani, Paola, Emilia M. C. Mazza, Davide Lucchesi, Ingrid Cifola, Claudia Gemelli, Alexis Grande, Cristina Battaglia, Silvio Bicciato, i Diana Boraschi. 2014. „Transcriptomic Profiling of the

- Development of the Inflammatory Response in Human Monocytes in Vitro". *PLoS One* 9 (2): e87680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087680>.
- Jääskeläinen, Kirsi M., Pasi Kaukinen, Ekaterina S. Minskaya, Angelina Plyusnina, Olli Vapalahti, Richard M. Elliott, Friedemann Weber, Antti Vaheri, i Alexander Plyusnin. 2007a. „Tula and Puumala Hantavirus NSs ORFs Are Functional and the Products Inhibit Activation of the Interferon-Beta Promoter“. *Journal of Medical Virology* 79 (10): 1527–36. <https://doi.org/10.1002/jmv.20948>.
- . 2007b. „Tula and Puumala Hantavirus NSs ORFs Are Functional and the Products Inhibit Activation of the Interferon-Beta Promoter“. *Journal of Medical Virology* 79 (10): 1527–36. <https://doi.org/10.1002/jmv.20948>.
- Jääskeläinen, Kirsi M., Angelina Plyusnina, Ake Lundkvist, Antti Vaheri, i Alexander Plyusnin. 2008. „Tula Hantavirus Isolate with the Full-Length ORF for Nonstructural Protein NSs Survives for More Consequent Passages in Interferon-Competent Cells than the Isolate Having Truncated NSs ORF“. *Virology Journal* 5 (sijećanj): 3. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-3>.
- Jaillon, Sébastien, Federica Moalli, Bryndis Ragnarsdottir, Eduardo Bonavita, Manoj Puthia, Federica Riva, Elisa Barbati, i ostali. 2014. „The Humoral Pattern Recognition Molecule PTX3 Is a Key Component of Innate Immunity against Urinary Tract Infection“. *Immunity* 40 (4): 621–32. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.015>.
- Jakubzick, Claudia, Emmanuel L. Gautier, Sophie L. Gibbings, Dorothy K. Sojka, Andreas Schlitzer, Theodore E. Johnson, Stoyan Ivanov, i ostali. 2013. „Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes“. *Immunity* 39 (3): 599–610. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.007>.
- Jangra, Rohit K., Andrew S. Herbert, Rong Li, Lucas T. Jae, Lara M. Kleinfelter, Megan M. Slough, Sarah L. Barker, i ostali. 2018. „Protocadherin-1 Is Essential for Cell Entry by New World Hantaviruses“. *Nature* 563 (7732): 559–63. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0702-1>.
- Johansson, Patrik, Gert E. Olsson, Hwee-Teng Low, Göran Bucht, Clas Ahlm, Per Juto, i Fredrik Elgh. 2008. „Puumala Hantavirus Genetic Variability in an Endemic Region (Northern Sweden)“. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 8 (3): 286–96. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.01.003>.
- Jonsson, Colleen B., Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, i Olli Vapalahti. 2010. „A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease“. *Clinical Microbiology Reviews* 23 (2): 412–41. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>.
- Jonsson, Colleen B., Jay Hooper, i Gregory Mertz. 2008. „Treatment of Hantavirus Pulmonary Syndrome“. *Antiviral Research* 78 (1): 162–69. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.10.012>.
- Kabwe, Emmanuel, Yuriy Davidyuk, Anton Shamsutdinov, Ekaterina Garanina, Ekaterina Martynova, Kristina Kitaeva, Moffat Malisheni, i ostali. 2020. „Orthohantaviruses, Emerging Zoonotic Pathogens“. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 9 (9). <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>.
- Kallio, Eva R., Michael Begon, Heikki Henttonen, Esa Koskela, Tapio Mappes, Antti Vaheri, i Olli Vapalahti. 2009. „Cyclic Hantavirus Epidemics in Humans--Predicted by Rodent Host Dynamics“. *Epidemics* 1 (2): 101–7. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2009.03.002>.
- Kallio, Eva R., Jonas Klingström, Elisabeth Gustafsson, Tytti Manni, Antti Vaheri, Heikki Henttonen, Olli Vapalahti, i Åke Lundkvist. 2006. „Prolonged Survival of Puumala Hantavirus Outside the Host: Evidence for Indirect Transmission via the Environment“. *The Journal of General Virology* 87 (Pt 8): 2127–34. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81643-0>.
- Kallio, Eva R., Antti Poikonen, Antti Vaheri, Olli Vapalahti, Heikki Henttonen, Esa Koskela, i Tapio Mappes. 2006. „Maternal Antibodies Postpone Hantavirus Infection and Enhance Individual Breeding Success“. *Proceedings. Biological Sciences* 273 (1602): 2771–76. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3645>.
- Kallio, Eva R., Liina Voutilainen, Olli Vapalahti, Antti Vaheri, Heikki Henttonen, Esa Koskela, i Tapio Mappes. 2007. „Endemic Hantavirus Infection Impairs the Winter Survival of Its Rodent Host“. *Ecology* 88 (8): 1911–16. <https://doi.org/10.1890/06-1620.1>.

- Kanerva, M., A. Paakkala, J. Mustonen, T. Paakkala, J. Lahtela, i A. Pasternack. 1996. „Pulmonary Involvement in Nephropathia Epidemica: Radiological Findings and Their Clinical Correlations“. *Clinical Nephrology* 46 (6): 369–78.
- Kang, Hae Ji, Shannon N. Bennett, Andrew G. Hope, Joseph A. Cook, i Richard Yanagihara. 2011. „Shared Ancestry between a Newfound Mole-Borne Hantavirus and Hantaviruses Harbored by Cricetid Rodents“. *Journal of Virology* 85 (15): 7496–7503. <https://doi.org/10.1128/JVI.02450-10>.
- Kang, Hae Ji, Shannon N. Bennett, Laarni Sumibcay, Satoru Arai, Andrew G. Hope, Gabor Mocz, Jin-Won Song, Joseph A. Cook, i Richard Yanagihara. 2009. „Evolutionary Insights from a Genetically Divergent Hantavirus Harbored by the European Common Mole (Talpa Europaea)“. *PloS One* 4 (7): e6149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006149>.
- Kaplan, G., i G. Gaudernack. 1982. „In Vitro Differentiation of Human Monocytes. Differences in Monocyte Phenotypes Induced by Cultivation on Glass or on Collagen“. *The Journal of Experimental Medicine* 156 (4): 1101–14. <https://doi.org/10.1084/jem.156.4.1101>.
- Kaufmann, Stefan H. E. 2008. „Elie Metchnikoff’s and Paul Ehrlich’s Impact on Infection Biology“. *Microbes and Infection* 10 (14–15): 1417–19. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.08.012>.
- Kell, Alison M. 2022. „Innate Immunity to Orthohantaviruses: Could Divergent Immune Interactions Explain Host-Specific Disease Outcomes?“ *Journal of Molecular Biology* 434 (6): 167230. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167230>.
- Khaiboullina, Svetlana F., Dale M. Netski, Peter Krumpe, i Stephen C. St. Jeor. 2000. „Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Sin Nombre Virus Infection In Vitro“. *Journal of Virology* 74 (24): 11966–71.
- Khaiboullina, Svetlana F., Albert A. Rizvanov, Vincent C. Lombardi, Sergey P. Morzunov, Helton J. Reis, András Palotás, i Stephen St Jeor. 2013. „Andes-Virus-Induced Cytokine Storm Is Partially Suppressed by Ribavirin“. *Antiviral Therapy* 18 (4): 575–84. <https://doi.org/10.3851/IMP2524>.
- Klein, S. L., B. H. Bird, i G. E. Glass. 2000. „Sex Differences in Seoul Virus Infection Are Not Related to Adult Sex Steroid Concentrations in Norway Rats“. *Journal of Virology* 74 (17): 8213–17. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.17.8213-8217.2000>.
- Klein, S L, B H Bird, i G E Glass. 2001. „Sex Differences in Immune Responses and Viral Shedding Following Seoul Virus Infection in Norway Rats“. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65 (1): 57–63.
- Klein, Sabra L., Anne Jedlicka, i Andrew Pekosz. 2010. „The Xs and Y of Immune Responses to Viral Vaccines“. *The Lancet. Infectious Diseases* 10 (5): 338–49. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70049-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70049-9).
- Klein, S.L., i K.L. Flanagan. 2016. „Sex Differences in Immune Responses“. *Nature Reviews Immunology* 16 (10): 626–38. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>.
- Klein, S.L., i C.W. Roberts. 2010. *Sex Hormones and Immunity to Infection*. Sex Hormones and Immunity to Infection. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02155-8>.
- Kleinfelder, Lara M., Rohit K. Jangra, Lucas T. Jae, Andrew S. Herbert, Eva Mittler, Katie M. Stiles, Ariel S. Wirchnianski, i ostali. 2015. „Haploid Genetic Screen Reveals a Profound and Direct Dependence on Cholesterol for Hantavirus Membrane Fusion“. *MBio* 6 (4): e00801. <https://doi.org/10.1128/mBio.00801-15>.
- Klempa, Boris. 2018. „Reassortment Events in the Evolution of Hantaviruses“. *Virus Genes* 54 (5): 638–46. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1590-z>.
- Klempa, Boris, Tatjana Avsic-Zupanc, Jan Clement, Tamara K Dzagurova, Heikki Henttonen, Paul Heyman, Ferenc Jakab, i ostali. 2013. „Complex Evolution and Epidemiology of Dobrava-Belgrade Hantavirus: Definition of Genotypes and Their Characteristics“. *Archives of Virology* 158 (3): 521–29. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1514-5>.
- Klempa, Boris, Helga Meisel, Silvana R ath, Jan Bartel, Rainer Ulrich, i Detlev H. Kr uger. 2003. „Occurrence of Renal and Pulmonary Syndrome in a Region of Northeast Germany Where Tula Hantavirus Circulates“. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (10): 4894–97. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4894-4897.2003>.
- Kletenkov, Konstantin, Ekaterina Martynova, Yuriy Davidyuk, Emmanuel Kabwe, Anton Shamsutdinov, Ekaterina Garanina, Venera Shakirova, i ostali. 2019. „Δccr5 Genotype Is

- Associated with Mild Form of Nephropathia Epidemica“. *Viruses* 11 (7): 675. <https://doi.org/10.3390/v11070675>.
- Klingström, J., A. Plyusnin, A. Vaheri, i A. Lundkvist. 2002. „Wild-Type Puumala Hantavirus Infection Induces Cytokines, C-Reactive Protein, Creatinine, and Nitric Oxide in Cynomolgus Macaques“. *Journal of Virology* 76 (1): 444–49. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.1.444-449.2002>.
- Klingström, J., A. Smed-Sörensen, K. T. Maleki, C. Solà-Riera, C. Ahlm, N. K. Björkström, i H. G. Ljunggren. 2019. „Innate and Adaptive Immune Responses against Human Puumala Virus Infection: Immunopathogenesis and Suggestions for Novel Treatment Strategies for Severe Hantavirus-Associated Syndromes“. *Journal of Internal Medicine* 285 (5): 510–23. <https://doi.org/10.1111/joim.12876>.
- Klingström, Jonas, Therese Lindgren, i Clas Ahlm. 2008. „Sex-Dependent Differences in Plasma Cytokine Responses to Hantavirus Infection“. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 15 (5): 885–87. <https://doi.org/10.1128/CVI.00035-08>.
- Kobak, Lidija, Martin J. Raftery, Sebastian Voigt, Anja A. Köhl, Ergin Kilic, Andreas Kurth, Peter Witkowski, i ostali. 2015. „Hantavirus-Induced Pathogenesis in Mice with a Humanized Immune System“. *The Journal of General Virology* 96 (Pt 6): 1258–63. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000087>.
- Korva, M., A. Saksida, N. Kežar, C. Schmaljohn, i T. Avšič-Županc. 2013. „Viral Load and Immune Response Dynamics in Patients with Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19 (8): E358-366. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12218>.
- Korva, Misa, Darja Duh, Ajda Puterle, Tomi Trilar, i Tatjana Avsic Zupanc. 2009. „First Molecular Evidence of Tula Hantavirus in Microtus Voles in Slovenia“. *Virus Research* 144 (1–2): 318–22. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.04.021>.
- Korva, Misa, Ana Saksida, Sabina Kunilo, Blanka Vidan Jeras, i Tatjana Avsic-Zupanc. 2011. „HLA-Associated Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Disease Progression in Slovenian Patients“. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 18 (9): 1435–40. <https://doi.org/10.1128/CVI.05187-11>.
- Korva, Miša, Nataša Knap, Katarina Resman Rus, Luka Fajs, Gašper Grubelnik, Matejka Bremec, Tea Knapič, Tomi Trilar, i Tatjana Avšič Županc. 2013. „Phylogeographic Diversity of Pathogenic and Non-Pathogenic Hantaviruses in Slovenia“. *Viruses* 5 (12): 3071–87. <https://doi.org/10.3390/v5123071>.
- Krakauer, T., J. W. Leduc, i H. Krakauer. 1995. „Serum Levels of Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-1, and Interleukin-6 in Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *Viral Immunology* 8 (2): 75–79.
- Kramski, Marit, Katharina Achazi, Boris Klempa, i Detlev H. Krüger. 2009. „Nephropathia Epidemica with a 6-Week Incubation Period after Occupational Exposure to Puumala Hantavirus“. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 44 (1): 99–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.005>.
- Kraus, Annette A., Christina Priemer, Harald Heider, Detlev H. Kruger, i Rainer Ulrich. 2005. „Inactivation of Hantaan Virus-Containing Samples for Subsequent Investigations Outside Biosafety Level 3 Facilities“. *Intervirology* 48 (4): 255–61. <https://doi.org/10.1159/000084603>.
- Kraus, Annette A., Martin J. Raftery, Thomas Giese, Rainer Ulrich, Rainer Zawatzky, Stefan Hippenstiel, Norbert Suttorp, Detlev H. Krüger, i Günther Schönrich. 2004. „Differential Antiviral Response of Endothelial Cells after Infection with Pathogenic and Nonpathogenic Hantaviruses“. *Journal of Virology* 78 (12): 6143–50. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6143-6150.2004>.
- Krautkrämer, Ellen, i Martin Zeier. 2008. „Hantavirus Causing Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Enters from the Apical Surface and Requires Decay-Accelerating Factor (DAF/CD55)“. *Journal of Virology* 82 (9): 4257–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.02210-07>.



- Kruger, Detlev H, Gunther Schonrich, i Boris Klempa. 2011. „Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection“. *Human Vaccines* 7 (6): 685–93. <https://doi.org/10.4161/hv.7.6.15197>.
- Kukkonen, S. K. J., A. Vaheri, i A. Plyusnin. 2005. „L Protein, the RNA-Dependent RNA Polymerase of Hantaviruses“. *Archives of Virology* 150 (3): 533–56. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0414-8>.
- Kyriakidis, Ioannis, i Anna Papa. 2013. „Serum TNF- $\alpha$ , STNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 Levels in Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *Virus Research* 175 (1): 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.03.020>.
- Laenen, Lies, Valentijn Vergote, Charles H. Calisher, Boris Klempa, Jonas Klingström, Jens H. Kuhn, i Piet Maes. 2019. „Hantaviridae: Current Classification and Future Perspectives“. *Viruses* 11 (9). <https://doi.org/10.3390/v11090788>.
- Laenen, Lies, Valentijn Vergote, Liana Eleni Kafetzopoulou, Tony Bokalanga Wawina, Despoina Vassou, Joseph A Cook, Jean-Pierre Hugot, i ostali. 2017. „A Novel Hantavirus of the European Mole, Bruges Virus, Is Involved in Frequent Nova Virus Coinfections“. *Genome Biology and Evolution* 10 (1): 45–55. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx268>.
- Laenen, Lies, Valentijn Vergote, Bert Vanmechelen, Katrien Tersago, Guy Baele, Philippe Lemey, Herwig Leirs, Simon Dellicour, Bram Vrancken, i Piet Maes. 2019. „Identifying the Patterns and Drivers of Puumala Hantavirus Enzootic Dynamics Using Reservoir Sampling“. *Virus Evolution* 5 (1): vez009. <https://doi.org/10.1093/ve/vez009>.
- Ledina, Dragan. 2011. „Markeri Endotelne Disfunkcije i Kronične Bubrežne Promjene u Hrvatskih Vojnika Inficiranih Hantavirusima u Domovinskom Ratu“. <https://www.bib.irb.hr/541489>.
- LeDuc, James W., Thomas G. Ksiazek, Cynthia A. Rossi, i Joel M. Dalrymple. 1990. „A Retrospective Analysis of Sera Collected by the Hemorrhagic Fever Commission during the Korean Conflict“. *The Journal of Infectious Diseases* 162 (5): 1182–84.
- Lee, Andrew C. Y., Kelvin K. W. To, Houshun Zhu, Hin Chu, Can Li, Winger W. N. Mak, Anna J. X. Zhang, i Kwok-Yung Yuen. 2017. „Avian Influenza Virus A H7N9 Infects Multiple Mononuclear Cell Types in Peripheral Blood and Induces Dysregulated Cytokine Responses and Apoptosis in Infected Monocytes“. *The Journal of General Virology* 98 (5): 922–34. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000751>.
- Lee, H. W., G. R. French, P. W. Lee, L. J. Baek, K. Tsuchiya, i R. S. Foulke. 1981. „Observations on Natural and Laboratory Infection of Rodents with the Etiologic Agent of Korean Hemorrhagic Fever“. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30 (2): 477–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.477>.
- Lee, H. W., P. W. Lee, L. J. Baek, C. K. Song, i I. W. Seong. 1981. „Intraspecific Transmission of Hantaan Virus, Etiologic Agent of Korean Hemorrhagic Fever, in the Rodent Apodemus Agrarius“. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30 (5): 1106–12. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.1106>.
- Lee, Hw. 1982. „Hemorrhagic-Fever with Renal Syndrome (Hfrs) - History, Hantaan Virus and Epidemiological Features“. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 82–85.
- Lee, P. W., R. Yanagihara, C. J. Gibbs, i D. C. Gajdusek. 1986. „Pathogenesis of Experimental Hantaan Virus Infection in Laboratory Rats“. *Archives of Virology* 88 (1–2): 57–66.
- Lescoat, Alain, Alice Ballerie, Yu Augagneur, Claudie Morzadec, Laurent Vernhet, Olivier Fardel, Patrick Jégo, Stéphane Jouneau, i Valérie Lecreur. 2018. „Distinct Properties of Human M-CSF and GM-CSF Monocyte-Derived Macrophages to Simulate Pathological Lung Conditions In Vitro: Application to Systemic and Inflammatory Disorders with Pulmonary Involvement“. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3): 894. <https://doi.org/10.3390/ijms19030894>.
- Li, Jianwei, James P. McGettigan, Milosz Faber, Matthias J. Schnell, i Bernhard Dietzschold. 2008. „Infection of Monocytes or Immature Dendritic Cells (DCs) with an Attenuated Rabies Virus Results in DC Maturation and a Strong Activation of the NFkappaB Signaling Pathway“. *Vaccine* 26 (3): 419–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.072>.
- Li, J.-L., J.-X. Ling, L.-J. Chen, F. Wei, F. Luo, Y.-Y. Liu, H.-R. Xiong, W. How, i Z.-Q. Yang. 2013. „An Efficient Method for Isolation of Hantaan Virus through Serial Passages in Suckling Mice“. *Intervirology* 56 (3): 172–77. <https://doi.org/10.1159/000345444>.

- Li, XiaoHua, Na Du, Guang Xu, Peng Zhang, Rongjing Dang, Yanfang Jiang, i Kaiyu Zhang. 2018. „Expression of CD206 and CD163 on Intermediate CD14++CD16+ Monocytes Are Increased in Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Are Correlated with Disease Severity“. *Virus Research* 253 (srpanj): 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.05.021>.
- Li, Yaoni, Chuansong Quan, Weijia Xing, Peihan Wang, Jiming Gao, Zhenjie Zhang, Xiaolin Jiang, i ostali. 2020. „Rapid Humoral Immune Responses Are Required for Recovery from Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome Patients“. *Emerging Microbes & Infections* 9 (1): 2303–14. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1830717>.
- Lin, Xian-Dan, Wen Wang, Wen-Ping Guo, Xiao-He Zhang, Jian-Guang Xing, Sheng-Ze Chen, Ming-Hui Li, i ostali. 2012. „Cross-Species Transmission in the Speciation of the Currently Known Murinae-Associated Hantaviruses“. *Journal of Virology* 86 (20): 11171–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.00021-12>.
- Linderholm, M., C. Ahlm, B. Settergren, A. Waage, i A. Tärnvik. 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“. *Journal of Infectious Diseases* 173 (1): 38–43.
- Linderholm, M., i F. Elgh. 2001. „Clinical Characteristics of Hantavirus Infections on the Eurasian Continent“. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 256: 135–51. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7_8).
- Linderholm, M., P. H. Groeneveld, i A. Tärnvik. 1996. „Increased Production of Nitric Oxide in Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome--Relation to Arterial Hypotension and Tumor Necrosis Factor“. *Infection* 24 (5): 337–40. <https://doi.org/10.1007/BF01716075>.
- Lindgren, Therese, Clas Ahlm, Nahla Mohamed, Magnus Evander, Hans-Gustaf Ljunggren, i Niklas K. Björkström. 2011. „Longitudinal Analysis of the Human T Cell Response during Acute Hantavirus Infection“. *Journal of Virology* 85 (19): 10252–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.05548-11>.
- Liphardt, Schuyler W., Hae Ji Kang, Laurie J. Dizney, Luis A. Ruedas, Joseph A. Cook, i Richard Yanagihara. 2019. „Complex History of Codiversification and Host Switching of a Newfound Soricid-Borne Orthohantavirus in North America“. *Viruses* 11 (7). <https://doi.org/10.3390/v11070637>.
- Liu, Hongtao, Bo Shi, Chiang-Ching Huang, Polikseni Eksarko, i Richard M. Pope. 2008. „Transcriptional Diversity during Monocyte to Macrophage Differentiation“. *Immunology Letters* 117 (1): 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.12.012>.
- Liu, Mingli, Shanchun Guo, Jacqueline M. Hibbert, Vidhan Jain, Neeru Singh, Nana O. Wilson, i Jonathan K. Stiles. 2011. „CXCL10/IP-10 in Infectious Diseases Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications“. *Cytokine & growth factor reviews* 22 (3): 121–30. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>.
- Llah, Sibghat T., Sheema Mir, Sumaiya Sharif, Salman Khan, i Mohammed A. Mir. 2018. „Hantavirus Induced Cardiopulmonary Syndrome: A Public Health Concern“. *Journal of Medical Virology* 90 (6): 1003–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.25054>.
- Lu, Q., Z. Zhu, i J. Weng. 1996. „Immune Responses to Inactivated Vaccine in People Naturally Infected with Hantaviruses“. *Journal of Medical Virology* 49 (4): 333–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199608\)49:4<333::AID-JMV13>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199608)49:4<333::AID-JMV13>3.0.CO;2-B).
- Lugo-Villarino, Geanncarlo, Anthony Troegeler, Luciana Balboa, Claire Lastrucci, Carine Duval, Ingrid Mercier, Alan Bénard, i ostali. 2018. „The C-Type Lectin Receptor DC-SIGN Has an Anti-Inflammatory Role in Human M(IL-4) Macrophages in Response to Mycobacterium tuberculosis“. *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01123>.
- Lukashevich, I. S., R. Maryankova, A. S. Vladyko, N. Nashkevich, S. Koleda, M. Djavani, D. Horejsh, N. N. Voitenok, i M. S. Salvato. 1999. „Lassa and Mopeia Virus Replication in Human Monocytes/Macrophages and in Endothelial Cells: Different Effects on IL-8 and TNF-Alpha Gene Expression“. *Journal of Medical Virology* 59 (4): 552–60.
- Lundkvist, A., Y. Cheng, K. B. Sjölander, B. Niklasson, A. Vaheri, i A. Plyusnin. 1997. „Cell Culture Adaptation of Puumala Hantavirus Changes the Infectivity for Its Natural Reservoir, Clethrionomys glareolus, and Leads to Accumulation of Mutants with Altered Genomic RNA

- S Segment". *Journal of Virology* 71 (12): 9515–23. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9515-9523.1997>.
- Lundkvist, A., A. Fatouros, i B. Niklasson. 1991. „Antigenic Variation of European Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome Virus Strains Characterized Using Bank Vole Monoclonal Antibodies“. *The Journal of General Virology* 72 ( Pt 9) (rujan): 2097–2103. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-9-2097>.
- Lundkvist, A., H. Kallio-Kokko, K. B. Sjölander, H. Lankinen, B. Niklasson, A. Vaheri, i O. Vapalahti. 1996. „Characterization of Puumala Virus Nucleocapsid Protein: Identification of B-Cell Epitopes and Domains Involved in Protective Immunity“. *Virology* 216 (2): 397–406. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0075>.
- Mackow, E. R., i I. N. Gavrillovskaia. 2001. „Cellular Receptors and Hantavirus Pathogenesis“. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 256: 91–115. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7_6).
- Mackow, Erich R., i Irina N. Gavrillovskaia. 2009. „Hantavirus Regulation of Endothelial Cell Functions“. *Thrombosis and Haemostasis* 102 (6): 1030–41. <https://doi.org/10.1160/TH09-09-0640>.
- Mackow, Erich R., Elena E. Gorbunova, i Irina N. Gavrillovskaia. 2014. „Endothelial Cell Dysfunction in Viral Hemorrhage and Edema“. *Frontiers in Microbiology* 5: 733. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00733>.
- Macneil, Adam, Stuart T. Nichol, i Christina F. Spiropoulou. 2011. „Hantavirus Pulmonary Syndrome“. *Virus Research* 162 (1–2): 138–47. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.017>.
- Maes, Piet, Scott Adkins, Sergey V. Alkhovskiy, Tatjana Avšič-Županc, Matthew J. Ballinger, Dennis A. Bente, Martin Beer, i ostali. 2019. „Taxonomy of the Order Bunyavirales: Second Update 2018“. *Archives of Virology* 164 (3): 927–41. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04127-3>.
- Maes, Piet, Sergey V. Alkhovskiy, Yīmíng Bào, Martin Beer, Monica Birkhead, Thomas Briese, Michael J. Buchmeier, i ostali. 2018. „Taxonomy of the Family Arenaviridae and the Order Bunyavirales: Update 2018“. *Archives of Virology* 163 (8): 2295–2310. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5>.
- Mair, Florian, i Thomas Liechti. 2020. „Comprehensive Phenotyping of Human Dendritic Cells and Monocytes“. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, studeni. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24269>.
- Mäkelä, S., M. Hurme, I. Ala-Houhala, J. Mustonen, A. M. Koivisto, J. Partanen, O. Vapalahti, A. Vaheri, i A. Pasternack. 2001. „Polymorphism of the Cytokine Genes in Hospitalized Patients with Puumala Hantavirus Infection“. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16 (7): 1368–73. <https://doi.org/10.1093/ndt/16.7.1368>.
- Malyshev, Igor, i Yuri Malyshev. 2015. „Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype“. *BioMed Research International* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/341308>.
- Mantovani, Alberto, Raffaella Bonecchi, i Massimo Locati. 2006. „Tuning Inflammation and Immunity by Chemokine Sequestration: Decoys and More“. *Nature Reviews. Immunology* 6 (12): 907–18. <https://doi.org/10.1038/nri1964>.
- Markotić, A., G. Dasić, A. Gagro, A. Sabioncello, S. Rabatić, I. Kuzman, R. Zgorelec, i ostali. 1999. „Role of Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Phenotype Changes in the Pathogenesis of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS)“. *Clinical and Experimental Immunology* 115 (2): 329–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00790.x>.
- Markotić, A, S T Nichol, I Kuzman, A J Sanchez, T G Ksiazek, A Gagro, S Rabatić, i ostali. 2002. „Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia“. *Journal of Medical Virology* 66 (4): 542–51.
- Markotić, Alemka, Alenka Gagro, Gorana Dasić, Ilija Kuzman, Davorka Lukas, Stuart Nichol, Thomas G. Ksiazek, i ostali. 2002. „Immune Parameters in Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome during the Incubation and Acute Disease: Case Report“. *Croatian Medical Journal* 43 (5): 587–90.

- Markotić, Alemka, Lisa Hensley, Kathleen Daddario, Kristin Spik, Kevin Anderson, i Connie Schmaljohn. 2007a. „Pathogenic Hantaviruses Elicit Different Immunoreactions in THP-1 Cells and Primary Monocytes and Induce Differentiation of Human Monocytes to Dendritic-like Cells“. *Collegium Antropologicum* 31 (4): 1159–67.
- . 2007b. „Pathogenic Hantaviruses Elicit Different Immunoreactions in THP-1 Cells and Primary Monocytes and Induce Differentiation of Human Monocytes to Dendritic-like Cells“. *Collegium Antropologicum* 31 (4): 1159–67.
- Markotić, Alemka, i Connie Schmaljohn. 2008. „Immunoreactions to Hantaviruses“. U *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH*, uredio Vassil St. Georgiev, Karl A. Western, i John J. McGowan, 435–44. Infectious Disease. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-569-5\\_47](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-569-5_47).
- Marsac, Delphine, Stephanie García, Alexandra Fournet, Adam Aguirre, Karla Pino, Marcela Ferres, Alexis M. Kalergis, Marcelo Lopez-Lastra, i Francisco Veas. 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“. *Virology Journal* 8 (svibanj): 223. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-223>.
- Martinez, Fernando O., i Siamon Gordon. 2014. „The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment“. *F1000prime Reports* 6: 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
- Martinez, Fernando O., Siamon Gordon, Massimo Locati, i Alberto Mantovani. 2006. „Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression“. *The Journal of Immunology* 177 (10): 7303–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>.
- Martinez-Pomares, Luisa. 2012. „The Mannose Receptor“. *Journal of Leukocyte Biology* 92 (6): 1177–86. <https://doi.org/10.1189/jlb.0512231>.
- Matthys, Valery, Elena E. Gorbunova, Irina N. Gavrilovskaya, Timothy Pepini, i Erich R. Mackow. 2011. „The C-Terminal 42 Residues of the Tula Virus Gn Protein Regulate Interferon Induction“. *Journal of Virology* 85 (10): 4752–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.01945-10>.
- Matthys, Valery, i Erich R. Mackow. 2012. „Hantavirus Regulation of Type I Interferon Responses“. *Advances in Virology* 2012: 524024. <https://doi.org/10.1155/2012/524024>.
- Mccarty, Cayson. 2018. *Immunology: Essential and Fundamental*. Scientific e-Resources.
- McCormick, J. B., D. R. Sasso, E. L. Palmer, i M. P. Kiley. 1982. „Morphological Identification of the Agent of Korean Haemorrhagic Fever (Hantaan Virus) as a Member of the Bunyaviridae“. *Lancet (London, England)* 1 (8275): 765–68. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(82\)91812-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(82)91812-8).
- Medved, M Miletić, A Markotić, L Cebalo, B Turković, i T Avsic Zupanc. 2002. „Haemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia“. *Lancet* 360 (9330): 415–16.
- Mendez-Enriquez, E., i E. A. García-Zepeda. 2013. „The Multiple Faces of CCL13 in Immunity and Inflammation“. *Inflammopharmacology* 21 (6): 397–406. <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0177-5>.
- Mertens, Marc, Jörg Hofmann, Rasa Petraityte-Burneikiene, Mario Ziller, Kestutis Sasnauskas, Robert Friedrich, Olaf Niederstrasser, i ostali. 2011. „Seroprevalence study in forestry workers of a non-endemic region in eastern Germany reveals infections by Tula and Dobrava-Belgrade hantaviruses“. *Medical Microbiology and Immunology* 200 (4): 263–68. <https://doi.org/10.1007/s00430-011-0203-4>.
- Mir, M. A., W. A. Duran, B. L. Hjelle, C. Ye, i A. T. Panganiban. 2008. „Storage of Cellular 5' MRNA Caps in P Bodies for Viral Cap-Snatching“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (49): 19294–99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807211105>.
- Mir, M.A., B. Brown, B. Hjelle, W.A. Duran, i A.T. Panganiban. 2006. „Hantavirus N protein exhibits genus-specific recognition of the viral RNA Panhandle“. *Journal of Virology* 80 (22): 11283–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00820-06>.
- Mir, M.A., i A.T. Panganiban. 2006. „Characterization of the RNA chaperone activity of hantavirus nucleocapsid protein“. *Journal of Virology* 80 (13): 6276–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.00147-06>.

- Mittler, Eva, Maria Eugenia Dieterle, Lara M. Kleinfelter, Megan M. Slough, Kartik Chandran, i Rohit K. Jangra. 2019. „Hantavirus Entry: Perspectives and Recent Advances“. *Advances in Virus Research* 104: 185–224. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.07.002>.
- Monchatre-Leroy, E., S. Murri, G. Castel, D. Calavas, F. Boué, V. Hénaux, i P. Marianneau. 2018. „First Insights into Puumala Orthohantavirus Circulation in a Rodent Population in Alsace, France“. *Zoonoses and Public Health* 65 (5): 540–51. <https://doi.org/10.1111/zph.12464>.
- Moniuszko, Marcin, Anna Bodzenta-Lukaszyk, Krzysztof Kowal, Danuta Lenczewska, i Milena Dabrowska. 2009. „Enhanced Frequencies of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, but Not CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, Peripheral Blood Monocytes in Severe Asthmatic Patients“. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 130 (3): 338–46. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.09.011>.
- Monsinjon, Tiphaine, Philippe Gasque, Philippe Chan, Alexander Ischenko, Jennifer J. Brady, i Marc C. Fontaine. 2003. „Regulation by Complement C3a and C5a Anaphylatoxins of Cytokine Production in Human Umbilical Vein Endothelial Cells“. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (9): 1003–14. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0737com>.
- Monteiro, João T., i Bernd Lepenies. 2017. „Myeloid C-Type Lectin Receptors in Viral Recognition and Antiviral Immunity“. *Viruses* 9 (3): E59. <https://doi.org/10.3390/v9030059>.
- Moreli, Marcos L., Ariany C. Marques-Silva, Vagner A. Pimentel, i Vivaldo G. da Costa. 2014. „Effectiveness of the Ribavirin in Treatment of Hantavirus Infections in the Americas and Eurasia: A Meta-Analysis“. *Virusdisease* 25 (3): 385–89. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0219-7>.
- Morzunov, Sergey P., Svetlana F. Khaiboullina, Stephen St Jeor, Albert A. Rizvanov, i Vincent C. Lombardi. 2015. „Multiplex Analysis of Serum Cytokines in Humans with Hantavirus Pulmonary Syndrome“. *Frontiers in Immunology* 6: 432. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00432>.
- Mosser, David M., i Justin P. Edwards. 2008. „Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation“. *Nature Reviews. Immunology* 8 (12): 958–69. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- Murphy, Kenneth, Paul Travers, Mark Walport, i Charles Janeway. 2012. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science.
- Mustonen, J., H. Helin, K. Pietilä, M. Brummer-Korvenkontio, K. Hedman, A. Vaheri, i A. Pasternack. 1994. „Renal Biopsy Findings and Clinicopathologic Correlations in Nephropathia Epidemica“. *Clinical Nephrology* 41 (3): 121–26.
- Mustonen, J., J. Partanen, M. Kanerva, K. Pietilä, O. Vapalahti, A. Pasternack, i A. Vaheri. 1996. „Genetic Susceptibility to Severe Course of Nephropathia Epidemica Caused by Puumala Hantavirus“. *Kidney International* 49 (1): 217–21. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.29>.
- Muyangwa, Musalwa, Ekaterina V. Martynova, Svetlana F. Khaiboullina, Sergey P. Morzunov, i Albert A. Rizvanov. 2015. „Hantaviral Proteins: Structure, Functions, and Role in Hantavirus Infection“. *Frontiers in Microbiology* 6: 1326. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01326>.
- Nagai, T., O. Tanishita, Y. Takahashi, T. Yamanouchi, K. Domae, K. Kondo, J. R. Dantas, M. Takahashi, i K. Yamanishi. 1985. „Isolation of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome Virus from Leukocytes of Rats and Virus Replication in Cultures of Rat and Human Macrophages“. *The Journal of General Virology* 66 ( Pt 6) (lipanj): 1271–78.
- Nemirov, Kirill, Ake Lundkvist, Antti Vaheri, i Alexander Plyusnin. 2003. „Adaptation of Puumala Hantavirus to Cell Culture Is Associated with Point Mutations in the Coding Region of the L Segment and in the Noncoding Regions of the S Segment“. *Journal of Virology* 77 (16): 8793–8800. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8793-8800.2003>.
- Nemirov, Kirill, Olli Vapalahti, Anna Papa, Angelina Plyusnina, Ake Lundkvist, Antonis Antoniadis, Antti Vaheri, i Alexander Plyusnin. 2003. „Genetic characterization of new Dobrava hantavirus isolate from Greece“. *Journal of Medical Virology* 69 (3): 408–16. <https://doi.org/10.1002/jmv.10304>.
- Netski, D., B. H. Thran, i S. C. St Jeor. 1999. „Sin Nombre Virus Pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*“. *Journal of Virology* 73 (1): 585–91.
- Niikura, M., A. Maeda, T. Ikegami, M. Saijo, I. Kurane, i S. Morikawa. 2004. „Modification of Endothelial Cell Functions by Hantaan Virus Infection: Prolonged Hyper-Permeability

- Induced by TNF-Alpha of Hantaan Virus-Infected Endothelial Cell Monolayers“. *Archives of Virology* 149 (7): 1279–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0306-y>.
- Nikitina, E., I. Larionova, E. Choinzonov, i J. Kzhyshkowska. 2018. „Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs“. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092821>.
- Niklasson, B., E. Tkachenko, A. P. Ivanov, G. van der Groen, D. Wiger, H. K. Andersen, J. LeDuc, T. Kjelsson, i K. Nyström. 1990. „Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Evaluation of ELISA for Detection of Puumala-Virus-Specific IgG and IgM“. *Research in Virology* 141 (6): 637–48. [https://doi.org/10.1016/0923-2516\(90\)90036-i](https://doi.org/10.1016/0923-2516(90)90036-i).
- Noack, Danny, Marco Goeijenbier, Chantal B. E. M. Reusken, Marion P. G. Koopmans, i Barry H. G. Rockx. 2020. „Orthohantavirus Pathogenesis and Cell Tropism“. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10 (kolovoz). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00399>.
- Nussenzweig, Michel C. bez dat. „Ralph Steinman and the Discovery of Dendritic Cells“, 31.
- Ohradanova-Repic, Anna, Christian Machacek, Michael B. Fischer, i Hannes Stockinger. 2016. „Differentiation of Human Monocytes and Derived Subsets of Macrophages and Dendritic Cells by the HLDA10 Monoclonal Antibody Panel“. *Clinical & Translational Immunology* 5 (1): e55. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.39>.
- Outinen, T. K., S. Mäkelä, H. Huhtala, M. Hurme, S. Meri, I. Pörsti, J. Sane, A. Vaheri, J. Syrjänen, i J. Mustonen. 2012. „High Pentraxin-3 Plasma Levels Associate with Thrombocytopenia in Acute Puumala Hantavirus-Induced Nephropathia Epidemica“. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 31 (6): 957–63. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1392-x>.
- Outinen, Tuula K., Satu M. Mäkelä, Ilpo O. Ala-Houhala, Heini Sa Huhtala, Mikko Hurme, Antti S. Paakkala, Ilkka H. Pörsti, Jaana T. Syrjänen, i Jukka T. Mustonen. 2010. „The Severity of Puumala Hantavirus Induced Nephropathia Epidemica Can Be Better Evaluated Using Plasma Interleukin-6 than C-Reactive Protein Determinations“. *BMC Infectious Diseases* 10 (svibanj): 132. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-132>.
- Paakkala, A., J. Mustonen, M. Viander, H. Huhtala, i A. Pasternack. 2000. „Complement Activation in Nephropathia Epidemica Caused by Puumala Hantavirus“. *Clinical Nephrology* 53 (6): 424–31.
- Padilla, Consuelo M. López de, i Timothy B. Niewold. 2016. „The Type I Interferons: Basic Concepts and Clinical Relevance in Immune-mediated Inflammatory Diseases“. *Gene* 576 (1 0 1): 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.058>.
- Padula, P. J., A. Edelstein, S. D. Miguel, N. M. López, C. M. Rossi, i R. D. Rabinovich. 1998. „Hantavirus Pulmonary Syndrome Outbreak in Argentina: Molecular Evidence for Person-to-Person Transmission of Andes Virus“. *Virology* 241 (2): 323–30. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8976>.
- Park, Keeho, Chang Soo Kim, i Ki-Tae Moon. 2004. „Protective Effectiveness of Hantavirus Vaccine“. *Emerging Infectious Diseases* 10 (12): 2218–20. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040684>.
- Passaro, D. J., W. J. Shieh, J. K. Hacker, C. L. Fritz, S. R. Hogan, M. Fischer, R. M. Hendry, i D. J. Vugia. 2001. „Predominant Kidney Involvement in a Fatal Case of Hantavirus Pulmonary Syndrome Caused by Sin Nombre Virus“. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 33 (2): 263–64. <https://doi.org/10.1086/321832>.
- Passlick, B., D. Flieger, i H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. „Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood“. *Blood* 74 (7): 2527–34.
- Patel, Amit A., Yan Zhang, James N. Fullerton, Lies Boelen, Anthony Rongvaux, Alexander A. Maini, Venetia Bigley, i ostali. 2017. „The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation“. *The Journal of Experimental Medicine* 214 (7): 1913–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>.
- Peiser, Leanne, Subhankar Mukhopadhyay, i Siamon Gordon. 2002. „Scavenger Receptors in Innate Immunity“. *Current Opinion in Immunology* 14 (1): 123–28. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(01\)00307-7](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(01)00307-7).

- Penttinen, K., J. Lähdevirta, R. Kekomäki, B. Ziola, A. Salmi, A. Hautanen, P. Lindström, A. Vaheri, M. Brummer-Korvenkontio, i O. Wager. 1981. „Circulating Immune Complexes, Immunoconglutinins, and Rheumatoid Factors in Nephropathia Epidemica“. *The Journal of Infectious Diseases* 143 (1): 15–21. <https://doi.org/10.1093/infdis/143.1.15>.
- Pettersson, L., T. Thunberg, J. Rocklöv, J. Klingström, M. Evander, i C. Ahlm. 2014. „Viral Load and Humoral Immune Response in Association with Disease Severity in Puumala Hantavirus-Infected Patients--Implications for Treatment“. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (3): 235–41. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12259>.
- Pickl, W. F., O. Majdic, P. Kohl, J. Stöckl, E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, i W. Knapp. 1996. „Molecular and Functional Characteristics of Dendritic Cells Generated from Highly Purified CD14+ Peripheral Blood Monocytes“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (9): 3850–59.
- Plyusnin, A. 2002. „Genetics of Hantaviruses: Implications to Taxonomy“. *Archives of Virology* 147 (4): 665–82. <https://doi.org/10.1007/s007050200017>.
- Plyusnin, A., Y. Cheng, O. Vapalahti, M. Pejcoch, J. Unar, Z. Jelinkova, H. Lehvälaiho, A. Lundkvist, i A. Vaheri. 1995. „Genetic Variation in Tula Hantaviruses: Sequence Analysis of the S and M Segments of Strains from Central Europe“. *Virus Research* 39 (2–3): 237–50. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)00086-0](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00086-0).
- Plyusnin, A., O. Vapalahti, H. Lankinen, H. Lehvälaiho, N. Apekina, Y. Myasnikov, H. Kallio-Kokko, H. Henttonen, A. Lundkvist, i M. Brummer-Korvenkontio. 1994. „Tula Virus: A Newly Detected Hantavirus Carried by European Common Voles“. *Journal of Virology* 68 (12): 7833–39. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.12.7833-7839.1994>.
- Plyusnin, Alexander, Sami K. J. Kukkonen, Angelina Plyusnina, Olli Vapalahti, i Antti Vaheri. 2002. „Transfection-Mediated Generation of Functionally Competent Tula Hantavirus with Recombinant S RNA Segment“. *The EMBO Journal* 21 (6): 1497–1503. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1497>.
- Plyusnin, Alexander, i Tarja Sironen. 2014. „Evolution of Hantaviruses: Co-Speciation with Reservoir Hosts for More than 100 MYR“. *Virus Research* 187 (srpanj): 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.008>.
- Plyusnina, Angelina, Emöke Ferenczi, Gábor R Rácz, Kirill Nemirov, Ake Lundkvist, Antti Vaheri, Olli Vapalahti, i Alexander Plyusnin. 2009. „Co-Circulation of Three Pathogenic Hantaviruses: Puumala, Dobrava, and Saaremaa in Hungary“. *Journal of Medical Virology* 81 (12): 2045–52. <https://doi.org/10.1002/jmv.21635>.
- Polancec, Darija Stupin. 2011. „The effects of azithromycin on monocyte differentiation toward macrophages and dendritic cells“. Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. <http://bib.irb.hr/prikazi-rad?&rad=525348>.
- Pounder, Kieran C., Michael Begon, Tarja Sironen, Heikki Henttonen, Phillip C. Watts, Liina Voutilainen, Olli Vapalahti, Boris Klempa, Anthony R. Fooks, i Lorraine M. McElhinney. 2013. „Novel Hantavirus in Wildlife, United Kingdom“. *Emerging Infectious Diseases* 19 (4): 673–75. <https://doi.org/10.3201/eid1904.121057>.
- Prescott, Joseph, Heinz Feldmann, i David Safronetz. 2017. „Amending Koch’s Postulates for Viral Disease: When ‘Growth in Pure Culture’ Leads to a Loss of Virulence“. *Antiviral Research* 137 (siječanj): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.002>.
- Qu, Chunfeng, Nanna-Sophie Brinck-Jensen, Mengya Zang, i Kun Chen. 2014. „Monocyte-Derived Dendritic Cells: Targets as Potent Antigen-Presenting Cells for the Design of Vaccines against Infectious Diseases“. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 19 (veljača): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.09.023>.
- Quezada, Sergio A., Lamis Z. Jarvinen, Evan F. Lind, i Randolph J. Noelle. 2004. „CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity“. *Annual Review of Immunology* 22: 307–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104533>.
- Radosa, Lukáš, Mathias Schlegel, Petra Gebauer, Hermann Ansorge, Marta Heroldová, Eva Jánová, Michal Stanko, i ostali. 2013. „Detection of Shrew-Borne Hantavirus in Eurasian Pygmy Shrew (*Sorex Minutus*) in Central Europe“. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of*

- Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 19 (listopad): 403–10. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.008>.
- Raftery, Martin J., Annette A. Kraus, Rainer Ulrich, Detlev H. Krüger, i Günther Schönrich. 2002a. „Hantavirus Infection of Dendritic Cells“. *Journal of Virology* 76 (21): 10724–33.
- . 2002b. „Hantavirus Infection of Dendritic Cells“. *Journal of Virology* 76 (21): 10724–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.21.10724-10733.2002>.
- Raftery, Martin J., Pritesh Lalwani, Ellen Krautkrämer, Thorsten Peters, Karin Scharffetter-Kochanek, Renate Krüger, Jörg Hofmann, Karl Seeger, Detlev H. Krüger, i Günther Schönrich. 2014. „B2 Integrin Mediates Hantavirus-Induced Release of Neutrophil Extracellular Traps“. *The Journal of Experimental Medicine* 211 (7): 1485–97. <https://doi.org/10.1084/jem.20131092>.
- Raftery, Martin J., Pritesh Lalwani, Nina Lütteke, Lidija Kobak, Thomas Giese, Rainer G. Ulrich, Lukas Radosa, Detlev H. Krüger, i Günther Schönrich. 2020. „Replication in the Mononuclear Phagocyte System (MPS) as a Determinant of Hantavirus Pathogenicity“. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10: 281. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00281>.
- Rajaram, Murugesan V. S., Michelle N. Brooks, Jessica D. Morris, Jordi B. Torrelles, Abul K. Azad, i Larry S. Schlesinger. 2010. „Mycobacterium Tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (2): 929–42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000866>.
- Rajasekaran, Deepa, Sabine Gröning, Corinna Schmitz, Swen Zierow, Natalie Drucker, Maria Bakou, Kristian Kohl, i ostali. 2016. „Macrophage Migration Inhibitory Factor-CXCR4 Receptor Interactions: EVIDENCE FOR PARTIAL ALLOSTERIC AGONISM IN COMPARISON WITH CXCL12 CHEMOKINE“. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (30): 15881–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.717751>.
- Ramanathan, Harish N., Dong-Hoon Chung, Steven J. Plane, Elizabeth Sztul, Yong-Kyu Chu, Mary C. Gutteri, Michael McDowell, Georgia Ali, i Colleen B. Jonsson. 2007. „Dynein-Dependent Transport of the Hantaan Virus Nucleocapsid Protein to the Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment“. *Journal of Virology* 81 (16): 8634–47. <https://doi.org/10.1128/JVI.00418-07>.
- Ramsden, Cadhla, Edward C. Holmes, i Michael A. Charleston. 2009. „Hantavirus Evolution in Relation to Its Rodent and Insectivore Hosts: No Evidence for Codivergence“. *Molecular Biology and Evolution* 26 (1): 143–53. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn234>.
- Rasmuson, J., C. Andersson, E. Norrman, M. Haney, M. Evander, i C. Ahlm. 2011. „Time to Revise the Paradigm of Hantavirus Syndromes? Hantavirus Pulmonary Syndrome Caused by European Hantavirus“. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 30 (5): 685–90. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1141-6>.
- Rasmuson, J., J. Pourazar, N. Mohamed, K. Lejon, M. Evander, A. Blomberg, i C. Ahlm. 2016. „Cytotoxic Immune Responses in the Lungs Correlate to Disease Severity in Patients with Hantavirus Infection“. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 35 (4): 713–21. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2592-1>.
- Razzauti, Maria, Angelina Plyusnina, Heikki Henttonen, i Alexander Plyusnin. 2008. „Accumulation of Point Mutations and Reassortment of Genomic RNA Segments Are Involved in the Microevolution of Puumala Hantavirus in a Bank Vole (*Myodes Glareolus*) Population“. *The Journal of General Virology* 89 (Pt 7): 1649–60. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001248-0>.
- . 2013. „Microevolution of Puumala Hantavirus during a Complete Population Cycle of Its Host, the Bank Vole (*Myodes Glareolus*)“. *PloS One* 8 (5): e64447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064447>.
- Razzauti, Maria, Angelina Plyusnina, Jukka Niemimaa, Heikki Henttonen, i Alexander Plyusnin. 2012. „Co-Circulation of Two Puumala Hantavirus Lineages in Latvia: A Russian Lineage Described Previously and a Novel Latvian Lineage“. *Journal of Medical Virology* 84 (2): 314–18. <https://doi.org/10.1002/jmv.22263>.
- Razzauti, Maria, Angelina Plyusnina, Tarja Sironen, Heikki Henttonen, i Alexander Plyusnin. 2009. „Analysis of Puumala Hantavirus in a Bank Vole Population in Northern Finland: Evidence



- for Co-Circulation of Two Genetic Lineages and Frequent Reassortment between Strains". *The Journal of General Virology* 90 (Pt 8): 1923–31. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011304-0>.
- Reis e Sousa, Caetano. 2004. „Activation of Dendritic Cells: Translating Innate into Adaptive Immunity“. *Current Opinion in Immunology* 16 (1): 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.007>.
- Relloso, Miguel, Amaya Puig-Kröger, Oscar Muñoz Pello, José Luis Rodríguez-Fernández, Gonzalo de la Rosa, Natividad Longo, Joaquín Navarro, Mari Angeles Muñoz-Fernández, Paloma Sánchez-Mateos, i Angel L. Corbí. 2002. „DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF-Beta, and Anti-Inflammatory Agents“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (6): 2634–43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2634>.
- Resman Rus, Katarina, Andreja Nataša Kopitar, Miša Korva, Alojz Ihan, Miroslav Petrovec, i Tatjana Avšič-Županc. 2020. „Comparison of Lymphocyte Populations in Patients With Dobrava or Puumala Orthohantavirus Infection“. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10: 566149. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.566149>.
- Reynes, Jean Marc, Damien Carli, Nourredine Boukezia, Monique Debruyne, i Samir Herti. 2015. „Tula Hantavirus Infection in a Hospitalised Patient, France, June 2015“. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 20 (50). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.50.30095>.
- Robinson, Matthew J., David Sancho, Emma C. Slack, Salomé LeibundGut-Landmann, i Caetano Reis e Sousa. 2006. „Myeloid C-Type Lectins in Innate Immunity“. *Nature Immunology* 7 (12): 1258–65. <https://doi.org/10.1038/ni1417>.
- Rodero, Mathieu P., Fabrice Licata, Lucie Poupel, Pauline Hamon, Kiarash Khosrotehrani, Christophe Combadiere, i Alexandre Boissonnas. 2014. „In Vivo Imaging Reveals a Pioneer Wave of Monocyte Recruitment into Mouse Skin Wounds“. *PLoS One* 9 (10): e108212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108212>.
- Rossol, Manuela, Stephan Kraus, Matthias Pierer, Christoph Baerwald, i Ulf Wagner. 2012. „The CD14(Bright) CD16+ Monocyte Subset Is Expanded in Rheumatoid Arthritis and Promotes Expansion of the Th17 Cell Population“. *Arthritis and Rheumatism* 64 (3): 671–77. <https://doi.org/10.1002/art.33418>.
- Rowe, Regina K., Jason W. Suszko, i Andrew Pekosz. 2008. „Roles for the Recycling Endosome, Rab8, and Rab11 in Hantavirus Release from Epithelial Cells“. *Virology* 382 (2): 239–49. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.021>.
- Ruo, S. L., A. Sanchez, L. H. Elliott, L. S. Brammer, J. B. McCormick, i S. P. Fisher-Hoch. 1991. „Monoclonal Antibodies to Three Strains of Hantaviruses: Hantaan, R22, and Puumala“. *Archives of Virology* 119 (1–2): 1–11. <https://doi.org/10.1007/BF01314318>.
- Saavedra, Farides, Fabián E. Díaz, Angello Retamal-Díaz, Camila Covián, Pablo A. González, i Alexis M. Kalergis. 2021. „Immune Response during Hantavirus Diseases: Implications for Immunotherapies and Vaccine Design“. *Immunology, veljača*. <https://doi.org/10.1111/imm.13322>.
- Safronetz, David, Hideki Ebihara, Heinz Feldmann, i Jay W. Hooper. 2012. „The Syrian Hamster Model of Hantavirus Pulmonary Syndrome“. *Antiviral Research* 95 (3): 282–92. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.06.002>.
- Saha, Banishree, Karen Kodys, i Gyongyi Szabo. 2016. „Hepatitis C Virus-Induced Monocyte Differentiation Into Polarized M2 Macrophages Promotes Stellate Cell Activation via TGF-β“. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2 (3): 302-316.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.12.005>.
- Saha, Prakash, i Frederic Geissmann. 2011. „Toward a Functional Characterization of Blood Monocytes“. *Immunology and Cell Biology* 89 (1): 2–4. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.130>.
- Saksida, Ana, Darja Duh, Misa Korva, i Tatjana Avsic-Zupanc. 2008. „Dobrava Virus RNA Load in Patients Who Have Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *The Journal of Infectious Diseases* 197 (5): 681–85. <https://doi.org/10.1086/527485>.
- Salentin, Robert, Diethard Gemsa, Hans Sprenger, i Andreas Kaufmann. 2003. „Chemokine Receptor Expression and Chemotactic Responsiveness of Human Monocytes after Influenza A Virus Infection“. *Journal of Leukocyte Biology* 74 (2): 252–59. <https://doi.org/10.1189/jlb.1102565>.

- Sanada, Takahiro, Takahiro Seto, Yuka Ozaki, Ngonda Saasa, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Kentaro Yoshii, i Hiroaki Kariwa. 2012. „Isolation of Hokkaido Virus, Genus Hantavirus, Using a Newly Established Cell Line Derived from the Kidney of the Grey Red-Backed Vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*)“. *The Journal of General Virology* 93 (Pt 10): 2237–46. <https://doi.org/10.1099/vir.0.045377-0>.
- Sane, J., J. Ollgren, P. Makary, O. Vapalahti, M. Kuusi, i O. Lyytikäinen. 2016. „Regional Differences in Long-Term Cycles and Seasonality of Puumala Virus Infections, Finland, 1995-2014“. *Epidemiology and Infection* 144 (13): 2883–88. <https://doi.org/10.1017/S0950268816000765>.
- Sane, Jussi, Outi Laine, Satu Mäkelä, Antti Paakkala, Hanna Jarva, Jukka Mustonen, Olli Vapalahti, Seppo Meri, i Antti Vaheri. 2012. „Complement Activation in Puumala Hantavirus Infection Correlates with Disease Severity“. *Annals of Medicine* 44 (5): 468–75. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.573500>.
- Santiago, J., J. L. Hernández-Cruz, M. E. Manjarrez-Zavala, R. Montes-Vizuet, D. P. Rosete-Olvera, A. M. Tapia-Díaz, H. Zepeda-Peney, i L. M. Terán. 2008. „Role of Monocyte Chemotactic Protein-3 and -4 in Children with Virus Exacerbation of Asthma“. *The European Respiratory Journal* 32 (5): 1243–49. <https://doi.org/10.1183/09031936.00085107>.
- Scharninghausen, Jerrold J, Martin Pfeffer, Hermann Meyer, Donald S Davis, Rodney L Honeycutt, i Michael Faulde. 2002. „Genetic Evidence for Tula Virus in *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis* Populations in Croatia“. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 2 (1): 19–27.
- Schauer, Dominic, Patrick Starlinger, Philipp Zajc, Lejla Alidzanovic, Thomas Maier, Elisabeth Buchberger, Lorand Pop, Birgit Gruenberger, Thomas Gruenberger, i Christine Brostjan. 2014. „Monocytes with Angiogenic Potential Are Selectively Induced by Liver Resection and Accumulate near the Site of Liver Regeneration“. *BMC Immunology* 15 (listopad): 50. <https://doi.org/10.1186/s12865-014-0050-3>.
- Schinnerling, Katina, Paulina García-González, i Juan Carlos Aguillón. 2015. „Gene Expression Profiling of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells - Searching for Molecular Regulators of Tolerogenicity“. *Frontiers in Immunology* 6: 528. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00528>.
- Schlegel, Mathias, Eveline Kindler, Sandra S. Essbauer, Ronny Wolf, Jörg Thiel, Martin H. Groschup, Gerald Heckel, Rainer M. Oehme, i Rainer G. Ulrich. 2012. „Tula Virus Infections in the Eurasian Water Vole in Central Europe“. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 12 (6): 503–13. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0784>.
- Schmaljohn, A. L., D. Li, D. L. Negley, D. S. Bressler, M. J. Turell, G. W. Korch, M. S. Ascher, i C. S. Schmaljohn. 1995. „Isolation and Initial Characterization of a Newfound Hantavirus from California“. *Virology* 206 (2): 963–72. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1019>.
- Schmaljohn, C, i B Hjelle. 1997. „Hantaviruses: A Global Disease Problem“. *Emerging Infectious Diseases* 3 (2): 95–104. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970202>.
- Schmaljohn, C. S., i J. M. Dalrymple. 1983. „Analysis of Hantaan Virus RNA: Evidence for a New Genus of Bunyaviridae“. *Virology* 131 (2): 482–91. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90514-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90514-7).
- Schmaljohn, C S, S E Hasty, J M Dalrymple, J W LeDuc, H W Lee, C H von Bonsdorff, M Brummer-Korvenkontio, A Vaheri, T F Tsai, i H L Regnery. 1985. „Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome“. *Science (New York, N.Y.)* 227 (4690): 1041–44.
- Schmaljohn, C. S., S. E. Hasty, S. A. Harrison, i J. M. Dalrymple. 1983. „Characterization of Hantaan Virions, the Prototype Virus of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *The Journal of Infectious Diseases* 148 (6): 1005–12. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.6.1005>.
- Schmaljohn, Connie. 2009. „Vaccines for Hantaviruses“. *Vaccine* 27 Suppl 4 (studenti): D61-64. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.096>.
- Schmaljohn, Connie S., Kristin W. Spik, i Jay W. Hooper. 2014. „DNA Vaccines for HFRS: Laboratory and Clinical Studies“. *Virus Research* 187 (srpanj): 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.020>.
- Schmidt-Chanasit, Jonas, Sandra Essbauer, Rasa Petraityte, Kumiko Yoshimatsu, Kirsten Tackmann, Franz J Conraths, Kestutis Sasnauskas, i ostali. 2010. „Extensive Host Sharing of Central

- European Tula Virus“. *Journal of Virology* 84 (1): 459–74. <https://doi.org/10.1128/JVI.01226-09>.
- Scholz, Saskia, Faezzah Baharom, Gregory Rankin, Kimia T. Maleki, Shawon Gupta, Sindhu Vangeti, Jamshid Pourazar, i ostali. 2017. „Human Hantavirus Infection Elicits Pronounced Redistribution of Mononuclear Phagocytes in Peripheral Blood and Airways“. *PLoS Pathogens* 13 (6): e1006462. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006462>.
- Schönrich, Günther, Detlev H. Krüger, i Martin J. Raftery. 2015. „Hantavirus-Induced Disruption of the Endothelial Barrier: Neutrophils Are on the Payroll“. *Frontiers in Microbiology* 6: 222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00222>.
- Schönrich, Günther, i Martin J. Raftery. 2019. „Dendritic Cells (DCs) as ‚Fire Accelerants‘ of Hantaviral Pathogenesis“. *Viruses* 11 (9). <https://doi.org/10.3390/v11090849>.
- Schönrich, Günther, Andreas Rang, Nina Lütteke, Martin J Raftery, Nathalie Charbonnel, i Rainer G Ulrich. 2008. „Hantavirus-Induced Immunity in Rodent Reservoirs and Humans“. *Immunological Reviews* 225 (listopad): 163–89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00694.x>.
- Schraml, Barbara U., i Caetano Reis e Sousa. 2015. „Defining Dendritic Cells“. *Current Opinion in Immunology* 32 (veljača): 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.11.001>.
- Schreur, Paul J. Wichgers, i Jeroen Kortekaas. 2016. „Single-Molecule FISH Reveals Non-Selective Packaging of Rift Valley Fever Virus Genome Segments“. *PLOS Pathogens* 12 (8): e1005800. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005800>.
- Schultze, D., A. Lundkvist, U. Blauenstein, i P. Heyman. 2002. „Tula Virus Infection Associated with Fever and Exanthema after a Wild Rodent Bite“. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 21 (4): 304–6. <https://doi.org/10.1007/s10096-002-0705-5>.
- Schwarz, Anne Caroline, Ulrich Ranft, Isolde Piechotowski, James E. Childs, i Stefan O. Brockmann. 2009. „Risk Factors for Human Infection with Puumala Virus, Southwestern Germany“. *Emerging Infectious Diseases* 15 (7): 1032–39. <https://doi.org/10.3201/eid1507.081413>.
- Seillet, Cyril, Sophie Laffont, Florence Trémollières, Nelly Rouquié, Claude Ribot, Jean-François Arnal, Victorine Douin-Echinard, Pierre Gourdy, i Jean-Charles Guéry. 2012. „The TLR-Mediated Response of Plasmacytoid Dendritic Cells Is Positively Regulated by Estradiol in Vivo through Cell-Intrinsic Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling“. *Blood* 119 (2): 454–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371831>.
- Serbina, Natalya V., Ting Jia, Tobias M. Hohl, i Eric G. Pamer. 2008. „Monocyte-Mediated Defense against Microbial Pathogens“. *Annual Review of Immunology* 26: 421–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>.
- Seth, Rashu B., Lijun Sun, i Zhijian J. Chen. 2006. „Antiviral Innate Immunity Pathways“. *Cell Research* 16 (2): 141–47. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310019>.
- Sever, Krunoslav, Željko Škvorc, Daniel Krstonošić, Maša Ostrogović, i Jozo Franjić. 2013. „Koji ekofiziološki čimbenici utječu na reprodukciju šumskoga drveća i da li je ono u prošlosti radalo sjemenom češće i obilnije?“ *Radovi - Šumarski institut Jastrebarsko* 45 (2): 175–94.
- Shi, Chao, i Eric G. Pamer. 2011. „Monocyte recruitment during infection and inflammation“. *Nature reviews. Immunology* 11 (11): 762–74. <https://doi.org/10.1038/nri3070>.
- Shi, Xiaohong, i Richard M. Elliott. 2004. „Analysis of N-Linked Glycosylation of Hantaan Virus Glycoproteins and the Role of Oligosaccharide Side Chains in Protein Folding and Intracellular Trafficking“. *Journal of Virology* 78 (10): 5414–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.10.5414-5422.2004>.
- Shim, So Hee, Man-Seong Park, Sungsil Moon, Kwang Sook Park, Jin-Won Song, Ki-Joon Song, i Luck Ju Baek. 2011. „Comparison of Innate Immune Responses to Pathogenic and Putative Non-Pathogenic Hantaviruses in Vitro“. *Virus Research* 160 (1–2): 367–73. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.07.013>.
- Shin, Ok Sarah, Richard Yanagihara, i Jin-Won Song. 2012. „Distinct Innate Immune Responses in Human Macrophages and Endothelial Cells Infected with Shrew-Borne Hantaviruses“. *Virology* 434 (1): 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.004>.
- Sibold, C., H. Meisel, D. H. Krüger, M. Labuda, J. Lysy, O. Kozuch, M. Pejcoch, A. Vaheri, i A. Plyusnin. 1999. „Recombination in Tula Hantavirus Evolution: Analysis of Genetic Lineages

- from Slovakia". *Journal of Virology* 73 (1): 667–75. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.667-675.1999>.
- Sibold, C, S Sparr, A Schulz, M Labuda, O Kozuch, J Lysý, D H Krüger, i H Meisel. 1995. „Genetic Characterization of a New Hantavirus Detected in *Microtus Arvalis* from Slovakia“. *Virus Genes* 10 (3): 277–81.
- Sica, Antonio, i Alberto Mantovani. 2012. „Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas“. *The Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 787–95. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>.
- Sims, Amy C., Susan E. Burkett, Boyd Yount, i Raymond J. Pickles. 2008. „SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium“. *Virus Research* 133 (1): 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.013>.
- Sironen, T., A. Vaheri, i A. Plyusnin. 2001. „Molecular Evolution of Puumala Hantavirus“. *Journal of Virology* 75 (23): 11803–10. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11803-11810.2001>.
- Sironen, Tarja, Jonas Klingström, Antti Vaheri, Leif C. Andersson, Åke Lundkvist, i Alexander Plyusnin. 2008. „Pathology of Puumala Hantavirus Infection in Macaques“. *PLoS ONE* 3 (8): e3035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003035>.
- Song, G. 1999. „Epidemiological Progresses of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in China“. *Chinese Medical Journal* 112 (5): 472–77.
- Song, Jin-Won, Se Hun Gu, Shannon N. Bennett, Satoru Arai, Maria Puorger, Monika Hilbe, i Richard Yanagihara. 2007. „Seewis Virus, a Genetically Distinct Hantavirus in the Eurasian Common Shrew (*Sorex Araneus*)“. *Virology Journal* 4: 114. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-114>.
- Song, Jin-Won, Hae Ji Kang, Ki-Joon Song, Thang T. Truong, Shannon N. Bennett, Satoru Arai, Ninh U. Truong, i Richard Yanagihara. 2007. „Newfound Hantavirus in Chinese Mole Shrew, Vietnam“. *Emerging Infectious Diseases* 13 (11): 1784–87. <https://doi.org/10.3201/eid1311.070492>.
- Song, Ki-Joon, Luck Ju Baek, Sungsil Moon, Si Jung Ha, Sang Hyun Kim, Kwang Sook Park, Terry A. Klein, i ostali. 2007. „Muju Virus, a Novel Hantavirus Harboured by the Arvicolid Rodent *Myodes Regulus* in Korea“. *The Journal of General Virology* 88 (Pt 11): 3121–29. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83139-0>.
- Spiropoulou, Christina F., César G. Albariño, Thomas G. Ksiazek, i Pierre E. Rollin. 2007. „Andes and Prospect Hill Hantaviruses Differ in Early Induction of Interferon Although Both Can Downregulate Interferon Signaling“. *Journal of Virology* 81 (6): 2769–76. <https://doi.org/10.1128/JVI.02402-06>.
- Steppich, B., F. Dayyani, R. Gruber, R. Lorenz, M. Mack, i H. W. Ziegler-Heitbrock. 2000. „Selective Mobilization of CD14(+)CD16(+) Monocytes by Exercise“. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 279 (3): C578-586. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.3.C578>.
- Stoltz, Malin, Karin B Sundström, Åsa Hidmark, Conny Tolf, Sirkka Vene, Clas Ahlm, A Michael Lindberg, Åke Lundkvist, i Jonas Klingström. 2011. „A Model System for in Vitro Studies of Bank Vole Borne Viruses“. *PloS One* 6 (12): e28992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028992>.
- Strandin, Tomas, Satu Mäkelä, Jukka Mustonen, i Antti Vaheri. 2018. „Neutrophil Activation in Acute Hemorrhagic Fever With Renal Syndrome Is Mediated by Hantavirus-Infected Microvascular Endothelial Cells“. *Frontiers in Immunology* 9 (rujan): 2098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02098>.
- Ströher, U., E. West, H. Bugany, H. D. Klenk, H. J. Schnittler, i H. Feldmann. 2001. „Infection and Activation of Monocytes by Marburg and Ebola Viruses“. *Journal of Virology* 75 (22): 11025–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11025-11033.2001>.
- Stupin Polancec, Darija. 2011. „Učinak azitromicina na diferencijaciju monocita u makrofage i dendritičke stanice“. <https://www.bib.irb.hr/525348?rad=525348>.
- Sundstrom, J.B., L.K. McMullan, C.F. Spiropoulou, W.C. Hooper, A.A. Ansari, C.J. Peters, i P.E. Rollin. 2001. „Hantavirus Infection Induces the Expression of RANTES and IP-10 without Causing Increased Permeability in Human Lung Microvascular Endothelial Cells“. *Journal of Virology* 75 (13): 6070–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6070-6085.2001>.
- Sundström, Karin B., Malin Stoltz, Nina Lagerqvist, Åke Lundkvist, Kirill Nemirov, i Jonas Klingström. 2011. „Characterization of Two Substrains of Puumala Virus That Show

- Phenotypes That Are Different from Each Other and from the Original Strain". *Journal of Virology* 85 (4): 1747–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.01428-10>.
- Svoboda, Petra, Gerhard Dobler, Alemka Markotić, Ivan-Christian Kurolt, Stephanie Speck, Josipa Habuš, Marko Vucelja, i ostali. 2014. „Survey for Hantaviruses, Tick-Borne Encephalitis Virus, and Rickettsia Spp. in Small Rodents in Croatia“. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, svibanj. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1457>.
- Tadin, A., L. Bjedov, J. Margaletic, B. Zibrat, L. Cvetko Krajinovic, P. Svoboda, I. C. Kurolt, i ostali. 2014. „High Infection Rate of Bank Voles (*Myodes glareolus*) with Puumala Virus Is Associated with a Winter Outbreak of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Croatia“. *Epidemiology and Infection* 142 (9): 1945–51. <https://doi.org/10.1017/S095026881300321X>.
- Tadin, Ante, Nenad Turk, Miša Korva, Josip Margaletić, Relja Beck, Marko Vucelja, Josipa Habuš, i ostali. 2012. „Multiple Co-Infections of Rodents with Hantaviruses, *Leptospira*, and *Babesia* in Croatia“. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 12 (5): 388–92. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0632>.
- Tamassia, Nicola, Federica Calzetti, Thornin Ear, Alexandre Cloutier, Sara Gasperini, Flavia Bazzoni, Patrick P. McDonald, i Marco A. Cassatella. 2007. „Molecular Mechanisms Underlying the Synergistic Induction of CXCL10 by LPS and IFN-Gamma in Human Neutrophils“. *European Journal of Immunology* 37 (9): 2627–34. <https://doi.org/10.1002/eji.200737340>.
- Tang, Kang, Chunmei Zhang, Yusi Zhang, Yun Zhang, Ran Zhuang, Boquan Jin, i Ying Ma. 2015. „Elevated Plasma Soluble CD14 Levels Correlate with the Monocyte Response Status During Hantaan Virus Infection in Humans“. *Viral Immunology* 28 (8): 442–47. <https://doi.org/10.1089/vim.2015.0040>.
- Taylor, Philip R., Siamon Gordon, i Luisa Martinez-Pomares. 2005. „The Mannose Receptor: Linking Homeostasis and Immunity through Sugar Recognition“. *Trends in Immunology* 26 (2): 104–10. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.001>.
- Temonen, M., H. Lankinen, O. Vapalahti, T. Ronni, I. Julkunen, i A. Vaheri. 1995. „Effect of Interferon-Alpha and Cell Differentiation on Puumala Virus Infection in Human Monocyte/Macrophages“. *Virology* 206 (1): 8–15.
- Temonen, M., J. Mustonen, H. Helin, A. Pasternack, A. Vaheri, i H. Holthöfer. 1996. „Cytokines, Adhesion Molecules, and Cellular Infiltration in Nephropathia Epidemica Kidneys: An Immunohistochemical Study“. *Clinical Immunology and Immunopathology* 78 (1): 47–55.
- Temonen, M., O. Vapalahti, H. Holthöfer, M. Brummer-Korvenkontio, A. Vaheri, i H. Lankinen. 1993. „Susceptibility of Human Cells to Puumala Virus Infection“. *The Journal of General Virology* 74 ( Pt 3) (ožujak): 515–18.
- Terajima, M., J. D. Hendershot, H. Kariwa, F. T. Koster, B. Hjelle, D. Goade, M. C. DeFronzo, i F. A. Ennis. 1999. „High Levels of Viremia in Patients with the Hantavirus Pulmonary Syndrome“. *The Journal of Infectious Diseases* 180 (6): 2030–34. <https://doi.org/10.1086/315153>.
- Terajima, Masanori, Daisuke Hayasaka, Ken Maeda, i Francis A. Ennis. 2007. „Immunopathogenesis of Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Do CD8+ T Cells Trigger Capillary Leakage in Viral Hemorrhagic Fevers?“ *Immunology Letters* 113 (2): 117–20. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.08.003>.
- Terajima, Masanori, Olli Vapalahti, Heather L. Van Epps, Antti Vaheri, i Francis A. Ennis. 2004. „Immune Responses to Puumala Virus Infection and the Pathogenesis of Nephropathia Epidemica“. *Microbes and Infection* 6 (2): 238–45. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.10.017>.
- Tersago, K., R. Verhagen, A. Servais, P. Heyman, G. Ducoffre, i H. Leirs. 2009. „Hantavirus Disease (Nephropathia Epidemica) in Belgium: Effects of Tree Seed Production and Climate“. *Epidemiology and Infection* 137 (2): 250–56. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000940>.
- Tersago, Katrien, Ron Verhagen, i Herwig Leirs. 2011. „Temporal Variation in Individual Factors Associated with Hantavirus Infection in Bank Voles during an Epizootic: Implications for Puumala Virus Transmission Dynamics“. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 11 (6): 715–21. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0007>.
- Tkachenko, Evgeniy A., Peter T. Witkowski, Lukas Radosa, Tamara K. Dzagurova, Nataliya M. Okulova, Yulia V. Yunicheva, Ludmila Vasilenko, i ostali. 2015. „Adler Hantavirus, a New Genetic Variant of Tula Virus Identified in Major’s Pine Voles (*Microtus Majori*) Sampled in

- Southern European Russia“. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 29 (siječanj): 156–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.018>.
- Uphoff, Cord C., i Hans G. Drexler. 2013. „Detection of Mycoplasma Contaminations“. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 946: 1–13. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8_1).
- Urra, Xabier, Neus Villamor, Sergio Amaro, Manuel Gómez-Choco, Víctor Obach, Laura Oleaga, Anna M. Planas, i Angel Chamorro. 2009. „Monocyte Subtypes Predict Clinical Course and Prognosis in Human Stroke“. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29 (5): 994–1002. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.25>.
- Vaheri, Antti, Heikki Henttonen, Liina Voutilainen, Jukka Mustonen, Tarja Sironen, i Olli Vapalahti. 2013. „Hantavirus Infections in Europe and Their Impact on Public Health“. *Reviews in Medical Virology* 23 (1): 35–49. <https://doi.org/10.1002/rmv.1722>.
- Vaheri, Antti, Tomas Strandin, Jussi Hepojoki, Tarja Sironen, Heikki Henttonen, Satu Mäkelä, i Jukka Mustonen. 2013. „Uncovering the Mysteries of Hantavirus Infections“. *Nature Reviews. Microbiology* 11 (8): 539–50.
- Van Epps, Heather L., Masanori Terajima, Jukka Mustonen, T. Petteri Arstila, Elizabeth A. Corey, Antti Vaheri, i Francis A. Ennis. 2002. „Long-lived Memory T Lymphocyte Responses After Hantavirus Infection“. *The Journal of Experimental Medicine* 196 (5): 579–88. <https://doi.org/10.1084/jem.20011255>.
- Vangeti, Sindhu, Tomas Strandin, Sang Liu, Johanna Tauriainen, Anne Räisänen-Sokolowski, Luz Cabrera, Antti Hassinen, i ostali. 2021. „Monocyte Subset Redistribution from Blood to Kidneys in Patients with Puumala Virus Caused Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *PLoS Pathogens* 17 (3): e1009400. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009400>.
- Vapalahti, K., A.-M. Virtala, A. Vaheri, i O. Vapalahti. 2010. „Case-Control Study on Puumala Virus Infection: Smoking Is a Risk Factor“. *Epidemiology and Infection* 138 (4): 576–84. <https://doi.org/10.1017/S095026880999077X>.
- Vapalahti, O., A. Lundkvist, S. K. Kukkonen, Y. Cheng, M. Gilljam, M. Kanerva, T. Manni, i ostali. 1996a. „Isolation and Characterization of Tula Virus, a Distinct Serotype in the Genus Hantavirus, Family Bunyaviridae“. *The Journal of General Virology* 77 ( Pt 12) (prosinac): 3063–67. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-12-3063>.
- . 1996b. „Isolation and Characterization of Tula Virus, a Distinct Serotype in the Genus Hantavirus, Family Bunyaviridae“. *The Journal of General Virology* 77 ( Pt 12) (prosinac): 3063–67. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-12-3063>.
- Vazirinejad, Reza, Zahra Ahmadi, Mohammad Kazemi Arababadi, Gholamhossein Hassanshahi, i Derek Kennedy. 2014. „The Biological Functions, Structure and Sources of CXCL10 and Its Outstanding Part in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis“. *Neuroimmunomodulation* 21 (6): 322–30. <https://doi.org/10.1159/000357780>.
- Vial, Pablo A., Francisca Valdivieso, Mario Calvo, M. Luisa Rioseco, Raul Riquelme, Andres Araneda, Vinko Tomicic, i ostali. 2015. „A Non-Randomized Multicentre Trial of Human Immune Plasma for Treatment of Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome Caused by Andes Virus“. *Antiviral Therapy* 20 (4): 377–86. <https://doi.org/10.3851/IMP2875>.
- Villani, Alexandra-Chloé, Rahul Satija, Gary Reynolds, Siranush Sarkizova, Karthik Shekhar, James Fletcher, Morgane Griesbeck, i ostali. 2017. „Single-Cell RNA-Seq Reveals New Types of Human Blood Dendritic Cells, Monocytes, and Progenitors“. *Science* 356 (6335). <https://doi.org/10.1126/science.aah4573>.
- Vogel, Daphne Y. S., Judith E. Glim, Andrea W. D. Stavenuiter, Marjolein Breur, Priscilla Heijnen, Sandra Amor, Christine D. Dijkstra, i Robert H. J. Beelen. 2014. „Human Macrophage Polarization in Vitro: Maturation and Activation Methods Compared“. *Immunobiology* 219 (9): 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>.
- Voutilainen, Liina, Tarja Sironen, Elina Tonteri, Anne Tuiskunen Bäck, Maria Razzauti, Malin Karlsson, Maria Wahlström, Jukka Niemimaa, Heikki Henttonen, i Åke Lundkvist. 2015. „Life-Long Shedding of Puumala Hantavirus in Wild Bank Voles (Myodes Glareolus)“. *The Journal of General Virology* 96 (Pt 6): 1238–47. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000076>.

- Wang, Junning, Weijuan Guo, Hong Du, Haitao Yu, Wei Jiang, Ting Zhu, Xuefan Bai, i Pingzhong Wang. 2014. „Elevated Soluble CD163 Plasma Levels Are Associated with Disease Severity in Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *PloS One* 9 (11): e112127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112127>.
- Wang, M. L., J. H. Lai, Y. Zhu, H. B. Zhang, C. Li, J. P. Wang, Y. M. Li, A. G. Yang, i B. Q. Jin. 2009. „Genetic Susceptibility to Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome Caused by Hantaan Virus in Chinese Han Population“. *International Journal of Immunogenetics* 36 (4): 227–29. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2009.00848.x>.
- Wang, P.-Z., Z.-D. Li, H.-T. Yu, Y. Zhang, W. Wang, W. Jiang, i X.-F. Bai. 2012. „Elevated Serum Concentrations of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Patients with Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome“. *The Journal of International Medical Research* 40 (2): 648–56. <https://doi.org/10.1177/147323001204000227>.
- Wang, Yuanfan, Long Cui, Waldemar Gonsiorek, Soo-Hong Min, Gopinadhan Anilkumar, Stuart Rosenblum, Joseph Kozlowski, Daniel Lundell, Jay S Fine, i Ethan P Grant. 2009. „CCR2 and CXCR4 regulate peripheral blood monocyte pharmacodynamics and link to efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis“. *Journal of Inflammation (London, England)* 6 (studenti): 32. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-6-32>.
- Wang, Yue, Naoya Kato, Yujin Hoshida, Hideo Yoshida, Hiroyoshi Taniguchi, Tadashi Goto, Masaru Moriyama, i ostali. 2003. „Interleukin-1beta Gene Polymorphisms Associated with Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis C Virus Infection“. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 37 (1): 65–71. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50017>.
- Weber, C., K. U. Belge, P. von Hundelshausen, G. Draude, B. Steppich, M. Mack, M. Frankenberger, K. S. Weber, i H. W. Ziegler-Heitbrock. 2000. „Differential Chemokine Receptor Expression and Function in Human Monocyte Subpopulations“. *Journal of Leukocyte Biology* 67 (5): 699–704. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.5.699>.
- Weiss, Sabrina, Peter T. Witkowski, Brita Auste, Kathrin Nowak, Natalie Weber, Jakob Fahr, Jean-Vivien Mombouli, i ostali. 2012. „Hantavirus in Bat, Sierra Leone“. *Emerging Infectious Diseases* 18 (1): 159–61. <https://doi.org/10.3201/eid1801.111026>.
- West, Sonlee D., Daniel Goldberg, Anna Ziegler, Michael Krencicki, Terry W. Du Clos, i Carolyn Mold. 2012. „Transforming Growth Factor- $\beta$ , Macrophage Colony-Stimulating Factor and C-Reactive Protein Levels Correlate with CD14(High)CD16+ Monocyte Induction and Activation in Trauma Patients“. *PloS One* 7 (12): e52406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052406>.
- Wichgers Schreur, Paul J., Richard Kormelink, i Jeroen Kortekaas. 2018. „Genome Packaging of the Bunyavirales“. *Current Opinion in Virology* 33 (prosinac): 151–55. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.011>.
- Wigren Byström, J., J. Näslund, F. Trulsson, M. Evander, O. Wesula Lwande, C. Ahlm, i G. Bucht. 2018. „Quantification and kinetics of viral RNA transcripts produced in Orthohantavirus infected cells“. *Virology Journal* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0932-8>.
- Williams, R. J., R. T. Bryan, J. N. Mills, R. E. Palma, I. Vera, F. De Velasquez, E. Baez, i ostali. 1997. „An Outbreak of Hantavirus Pulmonary Syndrome in Western Paraguay“. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57 (3): 274–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.274>.
- Wisniewski, T., E. Bayne, J. Flanagan, Q. Shao, R. Wnek, S. Matheravidathu, P. Fischer, i ostali. 2010. „Assessment of Chemokine Receptor Function on Monocytes in Whole Blood: In Vitro and Ex Vivo Evaluations of a CCR2 Antagonist“. *Journal of Immunological Methods* 352 (1–2): 101–10. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.10.010>.
- Witkowski, P.T., D. Bourquain, K. Bankov, B. Auste, P.W. Dabrowski, A. Nitsche, D.H. Krüger, i L. Schaade. 2016. „Infection of human airway epithelial cells by different subtypes of Dobrava-Belgrade virus reveals gene expression patterns corresponding to their virulence potential“. *Virology* 493: 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.018>.
- Wójcik, J.M., A. Kawałko, S. Marková, J.B. Searle, i P. Kotlík. 2010. „Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens“. *Journal of Zoology* 281 (4): 249–62. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2010.00699.x>.

- Wong, Kok Loon, June Jing-Yi Tai, Wing-Cheong Wong, Hao Han, Xiaohui Sem, Wei-Hseun Yeap, Philippe Kourilsky, i Siew-Cheng Wong. 2011. „Gene Expression Profiling Reveals the Defining Features of the Classical, Intermediate, and Nonclassical Human Monocyte Subsets“. *Blood* 118 (5): e16-31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>.
- Xiao, Ruobing, Shu Yang, Fred Koster, Chunyan Ye, Chris Stidley, i Brian Hjelle. 2006. „Sin Nombre Viral RNA Load in Patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome“. *The Journal of Infectious Diseases* 194 (10): 1403–9. <https://doi.org/10.1086/508494>.
- Yanagihara, R., i D. J. Silverman. 1990. „Experimental Infection of Human Vascular Endothelial Cells by Pathogenic and Nonpathogenic Hantaviruses“. *Archives of Virology* 111 (3–4): 281–86. <https://doi.org/10.1007/BF01311063>.
- Yanagihara, Richard, Se Hun Gu, Satoru Arai, Hae Ji Kang, i Jin-Won Song. 2014. „Hantaviruses: Rediscovery and New Beginnings“. *Virus Research* 187 (srpanj): 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.038>.
- Yao, J. S., H. Kariwa, I. Takashima, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, i N. Hashimoto. 1992. „Antibody-Dependent Enhancement of Hantavirus Infection in Macrophage Cell Lines“. *Archives of Virology* 122 (1–2): 107–18.
- Yashina, Liudmila N., Sergey A. Abramov, Valery V. Gutorov, Tamara A. Dupal, Anton V. Krivopalov, Victor V. Panov, Galina A. Danchinova, i ostali. 2010. „Seewis Virus: Phylogeography of a Shrew-Borne Hantavirus in Siberia, Russia“. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10 (6): 585–91. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0154>.
- Yashiro, Takuya, Shiori Nakano, Kurumi Nomura, Yuna Uchida, Kazumi Kasakura, i Chiharu Nishiyama. 2019. „A Transcription Factor PU.1 Is Critical for Ccl22 Gene Expression in Dendritic Cells and Macrophages“. *Scientific Reports* 9 (1): 1161. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37894-9>.
- Yeruva, Sunil, Giuliano Ramadori, i Dirk Raddatz. 2008. „NF- $\kappa$ B-Dependent Synergistic Regulation of CXCL10 Gene Expression by IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  in Human Intestinal Epithelial Cell Lines“. *International Journal of Colorectal Disease* 23 (3): 305–17. <https://doi.org/10.1007/s00384-007-0396-6>.
- Yi, Jing, Zhuwei Xu, Ran Zhuang, Jiuping Wang, Yusi Zhang, Ying Ma, Bei Liu, i ostali. 2013. „Hantaan Virus RNA Load in Patients Having Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Correlation with Disease Severity“. *The Journal of Infectious Diseases* 207 (9): 1457–61. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis475>.
- Zaki, S. R., P. W. Greer, L. M. Coffield, C. S. Goldsmith, K. B. Nolte, K. Foucar, R. M. Feddersen, R. E. Zumwalt, G. L. Miller, i A. S. Khan. 1995. „Hantavirus Pulmonary Syndrome. Pathogenesis of an Emerging Infectious Disease“. *The American Journal of Pathology* 146 (3): 552–79.
- Zande, Hendrik J. P. van der, Dominik Nitsche, Laura Schlautmann, Bruno Guigas, i Sven Burgdorf. 2021. „The Mannose Receptor: From Endocytic Receptor and Biomarker to Regulator of (Meta)Inflammation“. *Frontiers in Immunology* 12: 765034. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.765034>.
- Zelená, Hana, Jakub Mrázek, i Tomáš Kuhn. 2013. „Tula Hantavirus Infection in Immunocompromised Host, Czech Republic“. *Emerging Infectious Diseases* 19 (11): 1873–75. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130421>.
- Zhang, Dan, Rui Guo, Lei Lei, Hongjuan Liu, Yawen Wang, Yili Wang, Hongbo Qian, i ostali. 2021. „Frontline Science: COVID-19 Infection Induces Readily Detectable Morphologic and Inflammation-Related Phenotypic Changes in Peripheral Blood Monocytes“. *Journal of Leukocyte Biology* 109 (1): 13–22. <https://doi.org/10.1002/JLB.4HI0720-470R>.
- Zhang, Yusi, Bei Liu, Ying Ma, Jing Yi, Chunmei Zhang, Yun Zhang, Zhuwei Xu, i ostali. 2014. „Hantaan Virus Infection Induces CXCL10 Expression through TLR3, RIG-I, and MDA-5 Pathways Correlated with the Disease Severity“. Research Article. *Mediators of Inflammation*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/697837>.
- Zhang, Zhipeng, Qi Wang, Yulong Liu, Qiu Sun, Hua Li, Daniel M. Czajkowsky, i Zhifeng Shao. 2020. „Massive Reorganization of the Genome during Primary Monocyte Differentiation into Macrophage“. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 52 (5): 546–53. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa026>.



- Zhou, L. J., i T. F. Tedder. 1996. „CD14+ Blood Monocytes Can Differentiate into Functionally Mature CD83+ Dendritic Cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (6): 2588–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2588>.
- Zhou, Lu, Rajesh Somasundaram, Rosa F. Nederhof, Gerard Dijkstra, Klaas Nico Faber, Maikel P. Peppelenbosch, i Gwenny M. Fuhler. 2012. „Impact of Human Granulocyte and Monocyte Isolation Procedures on Functional Studies“. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 19 (7): 1065–74. <https://doi.org/10.1128/CVI.05715-11>.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., G. Fingerle, M. Ströbel, W. Schraut, F. Stelter, C. Schütt, B. Passlick, i A. Pforte. 1993. „The Novel Subset of CD14+/CD16+ Blood Monocytes Exhibits Features of Tissue Macrophages“. *European Journal of Immunology* 23 (9): 2053–58. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230902>.
- Ziegler-Heitbrock, Loems. 2015. „Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions“. *Frontiers in Immunology* 6 (kolovoz). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00423>.
- Ziegler-Heitbrock, Loems, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, Derek N. Hart, Pieter J. M. Leenen, i ostali. 2010a. „Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood“. *Blood* 116 (16): e74-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>.
- . 2010b. „Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood“. *Blood* 116 (16): e74–80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>.
- Ziegler-Heitbrock, Loems, i Thomas P. J. Hofer. 2013. „Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets“. *Frontiers in Immunology* 4: 23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00023>.

## 8. PRILOZI

### 8.1. Popis kratica

°C	Celzijev stupanj
$\alpha$	grčko slovo alfa
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (od engl. <i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
ADE	pojačavajući signal posredovan protutijelima (od engl. <i>antibody-dependent enhancement</i> )
AF	Alexa Fluor
ANDV	<i>Andes orthohantavirus</i>
APC	antigen prezentirajuće stanice (od engl. <i>antigen presenting cells</i> )
$\beta$	grčko slovo beta
BALB/c	BALB/c soj miševa (od engl. <i>Bagg and Albino mouse stain; albino laboratory-bred strain of the house mouse</i> )
BSL-2	laboratorij 2. stupnja biosigurnosti (od engl. <i>biosafety level 2 laboratory</i> )
BSL-3	laboratorij 3. stupnja biosigurnosti (od engl. <i>biosafety level 3 laboratory</i> )
CCHFV	virus krimsko-kongoanske hemoragijske vrućice (od engl. <i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i> )
CCL	kemokinski ligand C-C uzorka (od engl. <i>C-C motif chemokine ligand</i> )
CCR	kemokinski receptor C-C uzorka (od engl. <i>C-C motif chemokine receptor</i> )
CD	stanične površinske molekule (od engl. <i>cluster of differentiation</i> )
cDC	mijeloidne dendritičke stanice (od engl. <i>conventional dendritic cells</i> )
cDNA	komplementarna DNA (od engl. <i>complementary DNA</i> )
CLEC	od engl. <i>calcium-dependent lectin domain family that acts as a pattern recognition receptor (PRR)</i>
CPD	citrat fosfat dekstroza (od engl. <i>citrate phosphate dextrose</i> )
C <sub>q</sub>	ciklus kvantifikacije (od engl. <i>quantification cycle</i> )
CSF1R	od engl. <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
C <sub>t</sub>	ciklus prelaska praga (od engl. <i>cycle threshold</i> )
CXCL	kemokinski ligand C-X-C uzorka (od engl. <i>C-X-C motif chemokine ligand</i> )
CXCR	kemokinski receptor C-X-C uzorka (od engl. <i>C-X-C motif chemokine receptor</i> )
CX3CL	kemokinski ligand C-X3-C uzorka (od engl. <i>C-X3-C motif chemokine ligand</i> )

CX3CR	kemokinski receptor C-X3-C uzorka (od engl. <i>C-X3-C motif chemokine receptor</i> )
$\Delta$	grčko slovo delta
DAF/CD55	čimbenik ubrzavanja propadanja komplementa (od engl. <i>complement decay-accelerating factor</i> )
DAPI	4',6'-diaminidin-2'-fenilindol dihidroklorid
DC	dendritičke stanice (od engl. <i>dendritic cells</i> )
DOBV	<i>Dobrava-Belgrade orthohantavirus</i>
$\varepsilon$	grčko slovo epsilon
EDTA	etilendiamin tetraoctena kiselina (od engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
eF	eFluor
ELISA	kolorimetrijski imunoenzimski postupak (od engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EM	elektronska mikroskopija (od engl. <i>electron microscopy</i> )
EMEM	medij EMEM (od engl. <i>minimum essential medium eagle with earle's balanced salt solution</i> )
ERGIC	Endoplazmatski retikulum-Golgijev intermedijarni odjeljak (od engl. <i>endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment</i> )
EU	Europska unija
FACS	fluorescencijom aktivirano razvrstavanje stanica (od engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FBS	fetalni goveđi serum (od engl. <i>fetal bovine serum</i> )
FcR	Fc receptor
FFU	od engl. <i>focus-forming units</i>
FITC	fluorescein izotiocijanat (od engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
FMO	mješavina protutijela u kojima nedostaje jedno protutijelo iz panela za kojeg se određuje prag pozitivnosti (od engl. <i>fluorescence minus one</i> )
FSC	rasap svjetlosti prema naprijed (od engl. <i>forward-scatter</i> )
$\gamma$	grčko slovo gamma
g	gravitacija
Gc	C-terminalna podjedinica glikoproteina ortohantavirusa
gC1qR/p32	receptor za globularnu domenu komponente komplementa C1q
G-CSF	čimbenik stimulacije kolonija granulocita (od engl. <i>granulocyte colony stimulating factor</i> )

GFP	zeleni fluorescentni protein (od engl. <i>green fluorescent protein</i> )
GFR $\alpha$ 2	od engl. <i>GDNF family receptor alpha-2</i>
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GM-CSF	čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (od engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> )
Gn	N-terminalna podjedinica glikoproteina ortohantavirusa
GPC	prekursor glikoproteina (od engl. <i>glycoprotein precursor</i> )
h	sat, sati
HBV	virus hepatitisa B (od engl. <i>hepatitis B virus</i> )
HCV	virus hepatitisa C (od engl. <i>hepatitis C virus</i> )
HCPS	hantavirusni kardiopulmonarni sindrom (od engl. <i>hantavirus cardiopulmonary syndrome</i> )
HIV-1	virus humane imunodeficijencije (od engl. <i>human immunodeficiency virus</i> )
HLA	ljudski leukocitni antigen (od engl. <i>human leukocyte antigen</i> )
hNSG/HLA-A2	soj miševa s ljudskim imunskim sustavom i funkcionalnim ljudskim CD8+ T-limfocitima (od engl. <i>NOD scid gamma mice expressing human leukocyte antigen (HLA)-A2</i> )
HSV-1	virus herpesa simplex tipa 1
HTNV	<i>Hantaan orthohantavirus</i>
HTV	ortohantavirusi
HVBS	hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom
ICAM-1	od engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICTV	međunarodni odbor za taksonomiju virusa (od engl. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
IFITM	transmembranski proteini inducirani putem interferona (od engl. <i>interferon-induced transmembrane proteins</i> )
IFN	interferon
IgG	imunoglobulini klase G
IgM	imunoglobulini klase M
IIFT	indirektna imunofluorescencija
IL	interleukin
IP-10	protein 10 induciran putem IFN- $\gamma$ (od engl. <i>IFN-<math>\gamma</math>-inducible protein 10</i> )
IR	infracrveno (od engl. <i>infrared</i> )
ISG	interferonom stimulirani geni (od engl. <i>interferon-stimulated genes</i> )

IU	internacionalna jedinica (od engl. <i>international unit</i> )
IUIS	međunarodna unija imunoloških društava (od engl. <i>International Union of Immunological Societies</i> )
κ	grčko slovo kappa
kb	kilo baza
kDa	kilo Dalton
km	kilometar
KO	od engl. Krome Orange
LPS	lipopolisaharid (od engl. <i>lipopolysaccharide</i> )
μg	mikrogram
μl	mikrolitar
μm	mikrometar
MACS	od engl. <i>magnetic-activated cell sorting</i>
MCP-1	protein 1 kemoatraktant monocita (od engl. <i>monocyte chemoattractant protein 1</i> )
M-CSF	čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (od engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )
MDC	makrofagni kemokin (od engl. <i>macrophage-derived chemokine</i> ), CCL22
MDDC	monocitne DC (od engl. <i>monocyte-derived dendritic cells</i> )
MDM	monocitni makrofagi (od engl. <i>monocyte-derived macrophages</i> )
MFI	medijan intenziteta fluorescencije (od engl. <i>median fluorescence intensity</i> )
MHC II	molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti razreda II (od engl. <i>major histocompatibility complex, class II</i> )
MIF	inhibitor migracije makrofaga (od engl. <i>macrophage migration inhibitory factor</i> )
min	minuta
MIP-1-α	upalni protein 1-α makrofaga (od engl. <i>macrophage inflammatory protein 1-α</i> )
MIP-1-β	upalni protein 1-β makrofaga (od engl. <i>macrophage inflammatory protein 1-β</i> )
ml	mililitar
MOI	višestrukost infekcije (od engl. <i>multiplicity of infection</i> )
MR	manozni receptor (engl. <i>mannose receptor</i> )
MRC1	manozni receptor tip C 1 (engl. <i>mannose receptor C-type 1</i> )
MZU	mikrobiološki zaštitni uređaj klase 2, model KTB-NS-II
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (od engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )

MxA	protein MxA (od engl. <i>Myxovirus resistance protein 1</i> )
N	nukleokapsidni protein
NCRs	nekodirajuće regije (od engl. <i>non-coding regions</i> )
NETs	neutrofilne izvanstanične klopke (od engl. <i>neutrophil extracellular traps</i> )
NF-κB	jezgreni čimbenik κB (od engl. <i>nuclear factor κB</i> )
n.i.	nakon infekcije
NK	prirodno ubilačke stanice (od engl. <i>natural killer cells</i> )
nm	nanometar
NO	dušikovi oksidi (od engl. <i>nitric oxide</i> )
NSs	nestrukturni proteini (od engl. <i>nonstructural proteins</i> )
ω	grčko slovo omega
OAZ1	od engl. <i>ornithine decarboxylase antizyme 1</i>
ORF	otvoreni okvir čitanja (od engl. <i>open reading frame</i> )
P2RX1	od engl. purinergic receptor P2X 1
p-vrijednost	od engl. <i>probability value</i>
PBMC	mononuklearne stanice periferne krvi (od engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	otopina fosfatnog pufera (od engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PC7	fikoeritrin cijanin 7 (od engl. <i>phycoerythrin cyanin 7</i> )
PCDH1	protokaderin-1 (od engl. <i>protocadherin-1</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (od engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
pDC	plazmocitoidne dendritičke stanice (od engl. <i>plasmacytoid dendritic cells</i> )
PE	fikoeritrin (od engl. <i>phycoerythrin</i> )
PerCP	peridinin klorofil protein (od engl. <i>peridinin chlorophyll protein</i> )
PFU/ml	jedinica razvoja plaka po mililitru (PFU/ml od engl. <i>plaque-forming units per mililiter</i> )
PHV	<i>Prospect Hill orthohantavirus</i>
PPARγ	receptor γ aktiviran proliferacijom peroksisoma (od engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i> )
PPIA	od engl. <i>peptidylprolyl isomerase A</i>
PRR	receptor za prepoznavanje općih struktura (od engl. <i>pattern recognition receptor</i> )
PTX3	protein 3 srodan s pentaksinom (od engl. <i>pentraxin-related protein 3</i> )
PUUV	<i>Puumala orthohantavirus</i>

PVC	polivinil klorid (od engl. <i>polyvinyl chloride</i> )
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (od engl. <i>quantitative PCR</i> )
RANTES	protein reguliran aktivacijom, izražen i izlučivan iz limfocita T (od engl. <i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i> )
RdRp	RNA-ovisna RNA polimeraza (od engl. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> )
RIN <sup>c</sup>	broj integriteta RNA (od engl. <i>RNA integrity number</i> )
RNA	ribonukleinska kiselina
RNP	ribonukleoprotein
ROS	reaktivne kisikove vrste (od engl. <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	rotacije po minuti (od engl. <i>rotations per minute</i> )
RPMI	medij RPMI (od engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i> )
RT	sobna temperatura (od engl. <i>room temperature</i> )
RT-qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu (od engl. <i>reverse transcription quantitative PCR</i> )
SBA	natrijeva borna kiselina (od engl. <i>sodium boric acid</i> )
sek	sekundi
SEM	standardna pogreška srednje vrijednosti (od engl. <i>standard error of mean</i> )
SEOV	<i>Seoul orthohantavirus</i>
SLAN	od engl. <i>6-sulfo LacNAc</i>
SNV	<i>Sin Nombre orthohantavirus</i>
SSC	bočni rasap svjetlosti (od engl. <i>side-scatter</i> )
STAT	transkripcijski čimbenik pretvarač signala i aktivator transkripcije (od engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
STNT	supernatant
SWSV	<i>Seewis orthohantavirus</i>
TBP	od engl. <i>TATA-box binding protein</i>
TGF-β1	transformirajući čimbenik rasta β1 (od engl. <i>transforming growth factor β1</i> )
THP-1	ljudska monomijelocitna stanična linija
TLR	receptor nalik Tollu (od engl. <i>Toll-like receptor</i> )
TNF-α	čimbenik nekroze tumora α (od engl. <i>tumor necrosis factor α</i> )
TULV	<i>Tula orthohantavirus</i>
UV	ultraljubičasto (od engl. <i>ultraviolet</i> )
V	volt

VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (od engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VE-kadherin	vaskularni endotelni kadherin ( od engl. <i>vascular endothelial cadherin</i> )
Vero E6	epitelne stanice bubrega afričkog zelenog majmuna <i>Chlorocebus aethiops</i> (Linnaeus, 1758.), klon E6
vRNA	virusna RNA
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. <i>World Health Organization</i> )



## 9. ŽIVOTOPIS

Petra Svoboda rođena je 13.8.1984. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek upisala je 2003. godine te diplomirala 2009. godine (dipl.ing. biologije, smjer ekologija). Od ožujka 2010. godine zaposlena je kao tehnološki asistent u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ na projektima „Centar za emergentne i re-emergentne zarazne bolesti“ (J-29-2007, voditeljica: prof.dr.sc. Alemka Markotić) te od travnja 2011. godine na projektu „Šumski ekosustavi na području Uprava šuma Podružnice Požega i Našice kao prirodna žarišta zoonoza“ (voditelj: prof.dr.sc. Josip Margaletić). Od siječnja 2012. godine zaposlena je kao znanstveni novak na znanstvenom projektu „Imunoreakcije na hantaviruse i leptospire“ (143-1430115-0103, voditeljica: prof.dr.sc. Alemka Markotić) u sklopu kojeg upisuje poslijediplomski sveučilišni studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od srpnja 2014. godine zaposlena je kao znanstveni novak na znanstvenom projektu „Innate immunity to Hantaviruses“ (IP-2013-11-4393, voditeljica: prof.dr.sc. Alemka Markotić) u sklopu kojeg joj je 2016. godine odobrena tema doktorskog rada. Od studenog 2017. godine u Klinici za infektivne bolesti dobiva stalnu poziciju kao VSS djelatnik (biolog) koji sudjeluje u procesu dijagnostike i liječenja. Tijekom zaposlenja sudjelovala je kao suradnik na više znanstvenih projekata te pohađala više stručnih usavršavanja u Hrvatskoj i inozemstvu. Od 2014. sudjeluje kao suradnik na znanstvenom projektu Znanstveni centar izvrsnosti „Centre of excellence for Research in Viral Immunology and the Development of New Vaccines“ te od 2017. godine na projektu „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji“ (KK.01.1.1.01.0006, voditelj: prof.dr.sc. Stipan Jonjić). Prvi je autor na jednom i koautor na šest znanstvenih radova objavljenih u časopisima koji su indeksirani u bazi Web of Science, koautor jednog rada objavljenog u časopisu koji je indeksiran u bazi Scopus, jednog rada u ostalim časopisima te koautor jednog poglavlja u knjizi. Aktivno je sudjelovala na više konferencija i simpozija te održala više znanstvenih i stručnih predavanja. Sudjeluje kao asistent u održavanju nastave specijalističkog studija infektologije Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Član je više stručnih društava (HID, HDBIB, udruga Hyla, Mladi istraživači, DVD Zagreb, udruga Magis). Primila je potporu „Stjecanje iskustva“ financiranu od strane fonda Jedinstvo uz pomoć znanja - Unity through Knowledge Fund (No. 75/10) za četveromjesečni boravak u Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Njemačka, a dobila je i dvije putne nagrade za sudjelovanje na međunarodnim konferencijama.

## BIBLIOGRAFIJA

### ZNANSTVENI RADOVI OBJAVLJENI U ČASOPISIMA KOJI SU INDEKSIRANI U BAZI WEB OF SCIENCE

1. Papić N, Šamadan L, Vrsaljko N, Radmanić L, Jeličić K, Šimičić P, **Svoboda P**, Židovec Lepej S, Vince A. Distinct Cytokine Profiles in Severe COVID-19 and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Life** **2022**; 12(6):795. (IF 3.778; citiranost 0)
2. Mihelčić M, Habuš J, Vucelja M, **Svoboda P**, Kurolt IK, Markotić A, Turk N, Margaletić J, Šantić M. Prevalence of Francisella tularensis in the population of small mammals species in continental forests of Croatia. **Šumarski list: znanstveno-stručno i staleško glasilo Hrvatskoga šumarskog društva** **2018**; 142(9-10): 481–486. (IF 0.421; citiranost 2)
3. Tadin A\*, Tokarz R\*, Markotić A, Margaletić J, Turk N, Habuš J, **Svoboda P**, Vucelja M, Desai A, Jain K, Lipkin WI. Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. **2016**; 94(2):466-73. (IF 2.549; citiranost 37)
4. Bjedov L, **Svoboda P**, Tadin A, Habuš J, Štritof Z, Labaš N, Vucelja M, Markotić A, Turk N, Margaletić J. Utjecaj uroda sjemena obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) na populacije sitnih glodavaca i pojavnosti hantavirusa u šumama Nacionalnog parka „Plitvička jezera“ i Parka prirode „Medvednica“ [Influence of beech mast on small rodent populations and hantavirus prevalence in National Park „Plitvice lakes“ and Nature Park „Medvednica“]. **Šumarski list: znanstveno-stručno i staleško glasilo Hrvatskoga šumarskog društva** **2016**; 140(9-10):455-464. (IF 0.409; citiranost 3)
5. Tadin A, Bjedov L, Margaletić J, Žibrat B, Cvetko Krajinović L, **Svoboda P**, Kurolt IC, Majetić Štritof Z, Turk N, Đaković Rode O, Čivljak R, Kuzman I, Markotić A. High infection rate of bank voles (*Myodes glareolus*) with Puumala virus is associated with a winter outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. **Epidemiology and Infection**. **2014**;142(9):1945-51. (IF 2.535; citiranost 10)
6. **Svoboda P**, Dobler G, Markotić A, Kurolt I-C, Speck S, Habuš J, Vucelja M, Cvetko Krajinović L, Tadin A, Margaletić J, Essbauer S. Survey for hantaviruses, tick-borne encephalitis virus and Rickettsia spp. in small rodents in Croatia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. **2014**; 14(7): 523-530. (IF 2.298; citiranost 12)
7. Tadin A, Turk N, Korva M, Margaletić J, Beck R, Vucelja M, Habuš J, **Svoboda P**, Avšič Županc T, Henttonen H, Markotić A. Multiple Co-infections of Rodents with

Hantaviruses, *Leptospira* and *Babesia* in Croatia. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. **2012**; 12(5):388-92. (IF 2.277; citiranost 38)

#### **ZNANSTVENI RADOVI OBJAVLJENI U ČASOPISIMA KOJI SU INDEKSIRANI U BAZI SCOPUS**

1. Miletić-Medved M, Svoboda P, Markotić A. **Encefalitis zapadnog Nila – Postoji li opasnost od ove re-emergentne bolesti u Hrvatskoj?** (Pregledni rad) **Infektološki Glasnik 2011**; 31(4): 189-193.

#### **OSTALI ZNANSTVENI RADOVI**

1. Koren T, Burić I, Lauš B, Rojko I, Svoboda P, Šerić Jelaska L. Carabidae, Cerambycidae and Scaraboidea (Coleoptera, Insecta) fauna of Kornat, Lavsa and Žut islands, Croatia. **Entomologia Croatica 2010**; 14(3-4): 53-62.

#### **POGLAVLJA U KNJIZI**

1. Margaletić J, Markotić A, Vucelja M, Bjedov L, Svoboda P, Pisačić M. Sitni glodavci kao rezervoari virusa Puumala i Dobrava. U knjizi: Korunić Javorka (ur.) DDD i ZUPP nova ozračja. Korunić d.o.o Zagreb, 2016. Str. 281-292.